

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VITOR HUGO PANHÓCA

**AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM BIOFILME DENTAL “*IN
SITU*”.**

São Carlos

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VITOR HUGO PANHÓCA

**AVALIAÇÃO “*IN VITRO*” DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE
STREPTOCOCCUS MUTANS EM BIOFILME DENTAL “*IN
SITU*”.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato
(IFSC/USP e PPG Biotec/UFSCar)

Prof.^a Dr.^a Cristina Kurachi
(IFSC/USP e PPG Biotec/UFSCar)

São Carlos

2011

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar

P191av

Panhóca, Vitor Hugo.

Avaliação "*in vitro*" da atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans* em biofilme denteal "*in situ*" / Vitor Hugo Panhóca. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

74 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Terapia fotodinâmica. 2. LED. 3. *Streptococcus mutans*.
I. Título.

CDD: 660.6 (20ª)

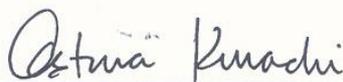
FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Hugo Panhóca

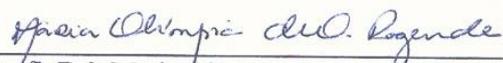
Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em: 26/07/2011

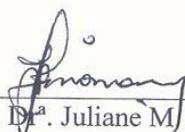
BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Cristina Kurachi (Orientadora)
(USP)



Profª. Drª. Maria Olímpia de Oliveira Rezende
(USP)



Profª. Drª. Juliane M.G. Tanomaru
(UNESP)

Aos meus pais, Heitor e Neide, pelo apoio diário em minha vida e por terem me dado o bem mais precioso que possuo: minha educação; algo que me torna uma pessoa forte para a luta diária e melhor para compreender a vida.

A Maria Eneida, minha mulher, pelo carinho e apoio em todos os momentos, o que tornou possível cumprir meus afazeres do cotidiano e os trabalhos acadêmicos para que eu pudesse obter meu título de Mestre.

Ao meu filho, Lorenzo, pelos momentos de alegria e convivência, que me estimulam na luta para superar as dificuldades diárias.

Meu eterno agradecimento a eles.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha criação e formação, que permitiu a graça e a capacidade de poder evoluir como pessoa e profissionalmente.

Aos meus pais, meu filho, familiares e, em especial, a minha mulher, pelas palavras de incentivo, carinho, que me proporcionam alicerce firme para construir e desenvolver meu trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente – entre eles: professores, mestrandos, professores convidados, alunos, secretarias, funcionários –, colaboraram com a realização deste trabalho.

Meu sincero agradecimento ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato, por ter aberto as portas da Universidade de São Paulo (USP) e de seu laboratório, para que eu pudesse aprimorar meus conhecimentos científicos e evoluir também profissionalmente. Suas orientações permitiram-me aprimorar meus estudos e despertaram meu interesse pela pesquisa na área de aplicação da PDT em desinfecção bucal.

A Prof^ª. Dr^ª. Cristina Kurachi, pela transmissão de conhecimentos sobre terapia fotodinâmica, que enriqueceram meus estudos na área. E também pelos ensinamentos e pela orientação objetiva que fizeram com que meu raciocínio fluísse de maneira mais lógica, contribuindo significativamente para a completa realização deste trabalho.

A Prof^ª. Dr^ª. Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli, pelos ensinamentos e orientações em Biofotônica que me permitiram realizar meu mestrado e evoluir profissionalmente.

Aos companheiros do laboratório de Biofotônica que me ajudaram direta e indiretamente em meu trabalho. Tenho que agradecer muito a vocês: Natália, Dirceu, Mardo, Dennis, Juçaira, Clóvis, Raquel, Ana Paula, Vitória, Emery, Lilian, Gustavo (Gaúcho), Hilde, Francisco, Carla, Gustavo (Grilo), Sebastião, Geison e Everton.

Ao pessoal do LAT que forneceu apoio em eletrônica para os aparelhos usados em minha pesquisa e, portanto, me auxiliaram na realização deste trabalho. Obrigado, Orlando e equipe!

Ao amigo e cirurgião-dentista Fernando L. E. Florez, sempre atencioso para responder minhas dúvidas sobre biofotônica no laboratório, o que estimulou meu aprofundamento no conhecimento da aplicação da PDT em Odontologia.

Ao Clóvis e Henrique, que me ajudaram a fazer os gráficos e as tabelas deste estudo, facilitando a interpretação dos resultados obtidos.

A Prof^ª. Dr^ª. Juliane G. Tanomaru e seu assistente, o doutorando Norberto, que muito me auxiliaram na realização da coleta e análise microbiológica de meus experimentos no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Unesp).

A doutoranda Fernanda Paolillo pela grande ajuda em realizar a análise estatística deste trabalho.

Ao protético da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Unesp), Vanderlei, que confeccionou as placas com as amostras de dente bovino para este estudo “in situ”.

Ao pessoal da secretaria do Grupo de Óptica, por estarem sempre dispostos a ajudar. Muito obrigado, Isabel, Bene e Cristiane!

À jornalista Izabel Moraes Baio e à Infojr (Empresa Júnior de Biblioteconomia e Ciência da Informação), por ter formatado e corrigido este texto, permitindo melhor entendimento para os que lerem este trabalho.

Aos colegas de turma, pela convivência agradável e pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

Ao projeto Finep/GNATUS pelo apoio financeiro para desenvolver meu experimento e ao CNPq que me proporcionou a bolsa de estudo para que eu pudesse desenvolver minha pesquisa em desinfecção bucal.

"A verdade é como um lustre.

Todos na sala podem vê-lo, mas cada qual de um ângulo diferente."

Peter Ustinov

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) antimicrobiana tem se mostrado uma promissora alternativa para a desinfecção bucal. Os objetivos deste trabalho *in situ* foram de investigar o efeito antimicrobiano em biofilme dental por meio da TFD, utilizando-se bochecho e aerosol contendo, respectivamente, curcumina e Photogen[®]. Nesta pesquisa, foram selecionados 18 voluntários de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos e de forma aleatória na população. Esses voluntários usaram uma placa contendo blocos de esmalte bovino, durante 4 dias. Após a formação de biofilme dental sobre a superfície dos blocos, as amostras foram submetidas ao tratamento com TFD. O efeito da TFD foi avaliado pela redução de *Streptococcus mutans* em meio de cultura *Mitis Salivarius* com Bacitracina e sacarose. Os grupos experimentais investigados foram, Grupo II: tratado com solução de curcumina (1.500µg/mL); Grupo III: tratado com TFD ($\lambda=450\pm 5\text{nm}$) e solução de curcumina (1.500µg/mL); Grupo IV: que recebeu TFD ($\lambda=640\pm 5\text{nm}$) com solução contendo Photogen[®] (1.000µg/mL) comparados com o grupo controle (Grupo I), o qual não recebeu tratamento. Os dados resultantes obtidos foram submetidos ao teste de análise estatística ANOVA a nível de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística mostrou que houve redução significativa na quantidade de *S. mutans* no grupo tratado com a curcumina + luz ($p=0,04$) e no grupo com Photogen[®] + luz ($p=0,02$). Ocorreu redução de *S. mutans* quando comparamos o Grupo I com os demais grupos experimentais, nas seguintes proporções: 8% para o Grupo II, 15% para o Grupo III e 18% para o Grupo IV. Em conclusão, sugere-se que há efeito antimicrobiano em biofilme dental por meio da TFD quando do uso de solução de curcumina (1.500µg/mL) e ou de Photogen[®] (1.000µg/mL) seguidos da irradiação com sistema LED ($\lambda=640\pm 5\text{nm}$).

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. LED. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

The Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) has shown that is a promising alternative for buccal disinfection. The objective of this in situ work is to investigate the antimicrobial effect of photodynamic therapy over biofilms by the use of curcumine and Photogem[®] presented in a solution. In this research 18 volunteers were selected randomly from both sexes, with age over than 18 years. These patients wore a removable palatine device that contained six enamel/dentin specimens of 5 square millimeters by 2 millimeters of thickness. Those patients wore those devices during the period of four days, after that the biofilm created over the specimens were treated using different PACT protocols. The effect of the PACT treatments was evaluated by the microbial reduction of the *Streptococcus mutans* by UFC counting. This study compared a control group with the curcumine group that didn't received light irradiation with another group that was treated with the PACT protocol using curcumine solution, and other group that used the photosensitizer presented in solution with Photogem[®]. The obtained results of this investigation showed the reduction of the amount of the *S. mutans* UFC. The highest reduction ($p=0.02$) was observed when the PACT is applied with solution using Photogem as the photosensitizer. In conclusion, this study suggests that there is a antimicrobial effect of photodynamic therapy over biofilms by the use of curcumine (1.500 μ g/mL) and Photogem[®] (1.000 μ g/mL) followed by LED system irradiation ($\lambda=640\pm 5$ nm).

Keywords: Microbiological analysis. LED. Photochemotherapy. *Streptococcus mutans*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho esquemático de desenvolvimento da cárie dentária	17
FIGURA 2 - Estrutura molecular do Photogem [®]	19
FIGURA 3 - Estrutura molecular da Curcumina	20
FIGURA 4 - Diagrama de Jablonski: estados energéticos de uma molécula e as transições entre eles	24
FIGURA 5 - LEDs (aparelhos desenvolvidos pelo Grupo de Óptica)	32
FIGURA 6 - Desenho da placa acrílica com os blocos de esmalte bovino (5mmx5mm)	34
FIGURA 7 - Gotejamento com sacarose a 2% sobre cada bloco de esmalte bovino	34
FIGURA 8 - Vórtex (Tubo de ensaio + pérolas de vidro + bloco de esmalte + solução salina tamponada – PBS)	35
FIGURA 9 - Diluições seriadas em Eppendorfs dentro de câmara de fluxo laminar	36
FIGURA 10 - Desenho esquemático do processo de diluições seriadas	37
FIGURA 11 - Meio de cultura bacteriana: ágar <i>Mitis Salivarius</i> , Bacitracina e sacarose	37
FIGURA 12 - Placa de Petri semeada pela técnica da gota	38
FIGURA 13 - Aspecto da microflora (<i>S. mutans</i>) após incubação de 48 horas	39
FIGURA 14 - Esquema representativo da sequência do experimento	40

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Expressão dos resultados da ação antibacteriana relacionando grupo controle e grupos com aplicação de apenas curcumina, TFD-curcumina e TFD-Photogen[®] sobre o biofilme dental desta pesquisa 41

GRÁFICO 2 - Resultados da avaliação microbiológica relacionando grupo controle e grupos com aplicação de apenas curcumina, luz+curcumina e luz+Photogen[®] sobre o biofilme dental 43

GRAFICO 3 - Resultados da avaliação microbiológica do grupo controle e grupos com aplicação de curcumina, TFD-curcumina e TFD-Photogen[®] sobre o biofilme formado em blocos de esmalte bovino contido em placa intrabucal 44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Parâmetros utilizados no procedimento experimental 33
- Tabela 2 - Tabela dos dados expressos em médias e desvios padrão (normalizados por log) 42
- Tabela 3 - Análise da diferença entre os grupos Controle-curcumina+luz e Controle-Photogem[®]+luz utilizando a análise de variância (ANOVA OneWay) 42

LISTA DE ABREVIATURAS

FS	Fotossensibilizador (Agente fotossensibilizador)
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado
LED	Light Emitting Diode (Diodo emissor de luz)
PDT	Photodynamic Therapy
PDI	Photodynamic Inactivation
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
IFD	Inativação Fotodinâmica
TBO	Toluidine Blue O (Azul de toluidina)
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
EROS	Espécies reativas de oxigênio
PACT	Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
3 OBJETIVO GERAL.....	29
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 SELEÇÃO DE SERES HUMANOS.....	30
4.2 FOTOSSENSIBILIZADOR.....	30
4.3 IRRADIAÇÃO	31
4.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	33
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	35
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 RESULTADOS	41
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO.....	50
8 ESTUDOS FUTUROS	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A	58
ANEXO B	60
ANEXO C	62
ANEXO D	64
ANEXO E	65
ANEXO F	66

1 INTRODUÇÃO

A modalidade de tratamento denominada Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sua origem no termo em inglês *Photodynamic Therapy* (PDT). É uma técnica muito utilizada para o tratamento do câncer de pele, uma vez que, quando é comparada aos tratamentos cirúrgicos convencionais para esse tipo de lesão, pode ser considerada como ultraconservadora e minimamente invasiva, não exigindo a remoção do tecido afetado e preservando sua arquitetura e função após o tratamento ter sido realizado.

Essa técnica tem como base a utilização combinada de luz visível com comprimento de onda específico, com certos tipos de drogas que são denominadas de fotossensibilizadores (FS), que, quando utilizados em conjunto, produzem uma reação de oxidação das células cancerígenas que provocará a lise das células-alvo e, por consequência, a indução da morte tumoral. (GAD. et al, 2004)

A TFD pode ser uma modalidade terapêutica antibacteriana alternativa como podemos ver na literatura (WAINWRIGHT, 1998; HAMBLIN; HASAN, 2004 ; JORI, 2006, FEDERICO, 2002; DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009). Esta terapia, utilizada no controle bacteriano, pode também ser chamada de Inativação Fotodinâmica (IFD), nome este que também deriva do termo utilizado em inglês *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy* (PACT) (WAINWRIGHT, 1998).

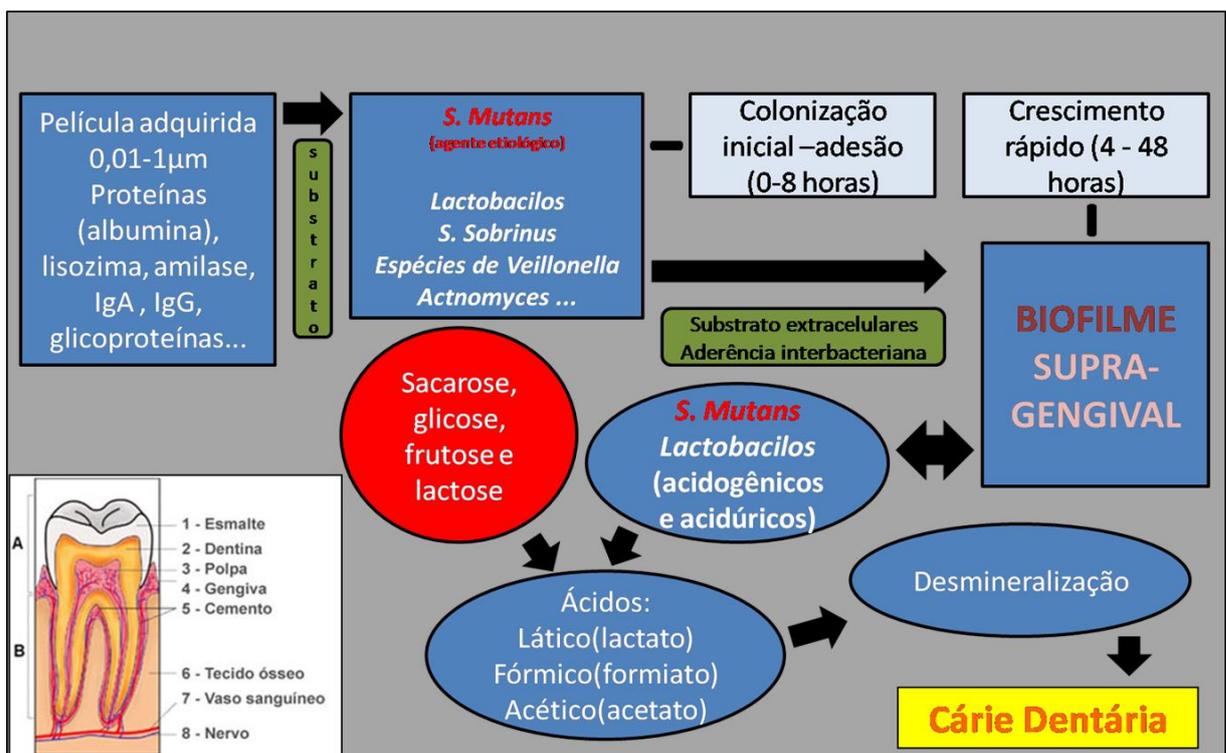
A cavidade bucal pode funcionar como uma porta de entrada e depósito de microrganismos causadores de doenças infecciosas no próprio hospedeiro, bem como também provocadores de doenças por meio de contaminação cruzadas em outros pacientes e também nos profissionais da saúde, tais como cirurgiões-dentistas, protéticos e seus auxiliares. Por isso, a desinfecção bucal tornou-se um problema de amplo estudo na Odontologia com interesse de se evitar doenças na cavidade oral, como a cárie dental, gengivite, periodontite, candidose, entre outras; e também doenças sistêmicas como pneumonia e endocardite bacteriana (WAINWRIGHT, 1998; MIMA, 2009; GARCEZ et al, 2003; MARCOTTE; LAVOIE, 1998; WILLIANS et al, 2003, GIUSTI, et al, 2008). A diminuição da ocorrência de infecções cruzadas no ambiente do consultório odontológico pode acontecer diante de uma eficaz terapia de descontaminação bucal prévia às intervenções clínicas na boca do paciente.

Entre as doenças infecciosas que acometem a cavidade bucal, a de maior prevalência citada na literatura é a cárie dental, sendo também uma das principais doenças crônicas na Saúde Pública no Brasil, assim como doenças cardiovasculares e neoplásicas (NARVAI;

CASTELLANOS; FRAZÃO, 2000) A cárie dental é também considerada a maior causa de perda dentária em todo o mundo (CAUFIELD; GRIFFEN, 2000; AOBA; FEJERSKOV, 2002). O Brasil, apesar de apresentar uma redução na prevalência da cárie dental nos últimos anos, ainda se encontra entre os países com os índices mais altos dessa enfermidade (PINTO, 2000; NARVAI; CASTELLANOS; FRAZÃO, 2000; AAS et al, 2008).

A microbiota bucal dos seres humanos compreende uma diversidade de 400 espécies bacterianas aproximadamente (MARCOTTE; LAVOIE, 1998), além de fungos, protozoários e vírus, porém, o desenvolvimento das patologias bucais, como cárie dental e gengivite (LINS et al, 2007; GREENWELL; BISSADA, 2011), só ocorre quando acontece um desequilíbrio no biofilme bacteriano dental do hospedeiro. O indivíduo que apresenta ingestão de alimentos ricos em sacarose desenvolve um aumento de espécies de bactérias sacarolíticas e acidogênicas, tais como *Streptococcus mutans* e lactobacilos, propiciando um biofilme dental que produz ácidos que provocam a desmineralização dental e, conseqüentemente, a cárie. Portanto, para ocorrer a lesão cariosa, são necessários três componentes, como descrito por Keyes (1960), o hospedeiro, dieta rica em carboidratos e os microrganismos (Fig.01). Newbrum, em 1978, acrescentou um quarto fator na etiologia da cárie: o tempo.

Figura 1 – Desenho esquemático de desenvolvimento da cárie dentária



Fonte: <http://www.saberweb.com.br/wp-content/uploads/imagens/anatomia/dente/01g.jpg>

Com relação à prevenção da cárie dental, ela pode ser feita pelo dentista por meio de tratamento conservador no consultório dentário, utilizando instrumentos rotatórios, jatos de bicarbonato, aplicação tópica de flúor, entre outros, e pode ser feita também pelo próprio indivíduo pelo uso caseiro de dentifrícios ou de colutórios que contêm agentes antimicrobianos, tais como a clorexidina, triclosan, própolis ou mesmo o flúor (CAUFIELD; DASANAYAKE; LI, 2001; MARCH, 1969; JOHARJI; 2001; SWERTS; COSTA; FIRINI, 2005). Quando a prevenção à cárie dental é ineficaz e a lesão cariosa se estabelece, o tratamento envolve procedimentos invasivos - necessitando-se da remoção de tecido dental contaminado - que são realizados por meio de instrumentos rotatórios e, atualmente, podem ser feitos também pelo uso de ultrassom (VIEIRA; VIEIRA, 2002) e Papacárie[®] (CORRÊA et al, 2007). Em seguida, o dente recebe restauração com uma variedade de materiais diretos, como, por exemplo, amálgama e resinas compostas (SUMMITT, 2002).

O biofilme dental, que pode ser dividido em supra ou subgingival, é o agente precursor da cárie dental e das doenças periodontais. O biofilme de um paciente com higiene deficiente pode resultar em uma alta concentração de patógenos na cavidade bucal, que, por mecanismo de aspiração ou mesmo penetração na corrente sanguínea, pode provocar doenças em pacientes imunodeprimidos ou mesmo em indivíduos saudáveis - doenças estas que podem ser, por exemplo, pneumonia e endocardite bacteriana. No sentido de se prevenir e tratar as doenças infectocontagiosas provocadas pelos microrganismos presentes na cavidade bucal, a TFD surgiu como uma promissora terapia alternativa (MIMA, 2009; BURNS; WILSON; PEARSON, 1993; DOBSON; WILSON, 1992; OKAMOTO; IWASE; MORIOKA, 1992; SIBATA, 2000; WOODBURN, 1996; GARCEZ, 2003).

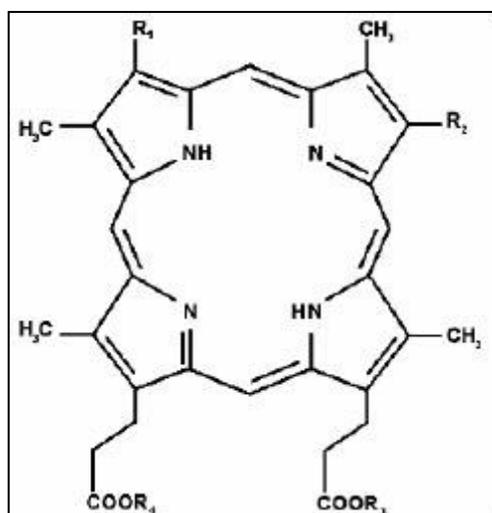
A TFD vem se mostrando eficaz para reduzir os microrganismos patogênicos na cavidade bucal, prevenindo e evitando doenças odontológicas até então tratadas de maneira convencional, como apresentado acima, tornando-se, assim, uma terapia inovadora em tratamento de descontaminação bucal (MIMA, 2009, WILSON, 1993a; WILSON et al., 1995).

Para a realização da TFD, as drogas ou FSs são administradas previamente à aplicação de luz, sendo que os FSs podem ter origem sintética ou natural. Como exemplo de FSs de origem natural (HAUKVIK et al, 2009), podemos citar as hematoporfirinas, que são derivadas de componentes do sangue, e a curcumina, derivada de um corante alimentar natural conhecido como curcuma. Outros corantes, como o azul de metileno e o azul de toluidina, são alguns exemplos de FSs de origem sintética que podem ser utilizados para a TFD (USACHEVA, et al, 2001).

Diversos FSs com finalidade antimicrobiana estão sendo estudados e testados na Odontologia. Os mais comuns são os da família das fenotiazinas, como o azul de metileno e o azul de toluidina (USACHEVA, et al, 2001; WILLIANS et al, 2003). Um FS eficaz deve apresentar certas características, como: estabilidade biológica, eficiência fotoquímica, seletividade e mínimo efeito citotóxico às células normais. Para a seleção de um composto como agente FS, uma série de características devem ser estudadas. Entre as características mais importantes do FS, estão: a banda e intensidade de absorção, bem como sua eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio, permeabilidade em tecido e facilidade de obtenção em escala industrial com custos reduzidos.

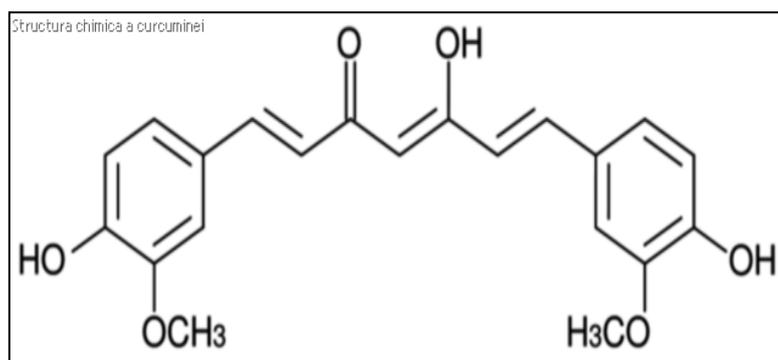
O Photofrin[®] foi a primeira droga fotossensibilizadora aprovada em tratamento de alguns tipos de neoplasias (MALDONADO, 2000). Novas gerações de drogas estão sendo estudadas, não apenas em tratamento oncológico, como também em outras aplicações nas áreas da Dermatologia, Hematologia e Odontologia. Devido ao fato de ainda não existir um consenso na utilização dos agentes fotoativos para TFD na descontaminação bucal, neste trabalho, optamos por utilizar o Photogem[®] (Figura 02) e a Curcumina (Figura 03).

Figura 2 - Estrutura molecular do Photogem[®]



Fonte: Estudos espectroscópios e citotóxicos do Photogem[®] fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser¹

¹ MENEZES, P.F.C de. Estudos espectroscópios e citotóxicos do Photogem[®] fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser. São Carlos, 2006. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2006.

Figura 3 - Estrutura molecular da Curcumina

Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Curcumina>

Várias fontes de luz podem ser utilizadas na TFD; a literatura descreve o emprego de diferentes sistemas de Laser, com intensidades de alta e baixa potência, operando nos regimes contínuos (CW) e pulsados (PW), e considerando diferentes meios ativos, os sistemas de Laser de estado gasoso, sólido e líquido (corante) (MALDONADO, 2000). O Laser é a fonte de luz nos últimos anos mais empregada para ativar os fotossensibilizadores (WAINWRIGHT, 1998; DOBSON; WILSON, 1992; WILLIAMS et al, 2003) na Terapia Fotodinâmica (TFD), porém, com o desenvolvimento dos diodos emissores de luz (LEDs), surgiram estudos que utilizam essa fonte de luz aplicada à TFD (WAINWRIGHT, 1998; DOBSON, J. & WILSON; 1992; GIUSTI et al, 2008). O uso do LED como fonte de luz na TFD tem sido discutido em estudos recentes (DOBSON, J. & WILSON; 1992; GIUSTI et al, 2008) e quando comparados aos sistemas de Lasers disponíveis, estes apresentam vantagens como menor custo, são portáteis, consomem pouca energia elétrica e ainda possuem um tempo de vida maior. Por esses motivos, essa técnica tornou-se mais atraente, permitindo sua maior implementação.

Existem algumas vantagens da desinfecção bucal com a utilização de TFD em relação ao uso de agentes antimicrobianos convencionais, em que um dos principais problemas é desenvolver resistência bacteriana (COUVARTIN, 1996; BIDAULT; CHANDAD; GRENIER, 2007; CHONDROS et al, 2009). A TFD não está ligada à mediação de radicais químicos com ação a um único ponto de ataque, ao contrário, o FS age produzindo oxigênio singlete, que não possui especificidade por sítio de ação, reagindo com vários substratos biomoleculares; isso torna o desenvolvimento de cepas resistentes improvável (FONTANA et al, 2009). Existem estudos que demonstram a eficácia e a baixa probabilidade de a TFD provocar resistência bacteriana (HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI, 2006; FEDERICO, 2002).

Outra vantagem da TFD é a morte bacteriana rápida, diminuindo a necessidade da manutenção de altas concentrações de substâncias químicas por longos períodos, como no caso do uso de antibióticos e antissépticos bucais. Finalmente, como nem o fotossensibilizador nem a luz empregada são bactericidas quando utilizados isoladamente, a morte das bactérias pode ser controlada restringindo-se a região irradiada, evitando a destruição da microbiota normal em outros locais.

A TFD apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, porém um fator limitante deve ser considerado: a presença de microrganismos bucais em biofilme dificulta a eficácia da técnica, pois isto diminui a absorção do FS e luz pelos microrganismos dentro da estrutura formada pelo biofilme (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; SOUKOS et al, 2003; SPTRATT et al, 2001; FONTANA et al, 2009).

Portanto, a TFD pode ser considerada uma promissora terapia de controle bacteriano bucal, já que é utilizada com essa finalidade desde a década de 90 (DOBSON, J. & WILSON, 1992; SPTRATT et al, 2001; WILLIAMS et al, 2003; WILSON, 1993a; WILSON et al, 1995; WILSON, 2004b), e recentes estudos vêm comprovando sua eficácia na Odontologia (MIMA, 2009; LIMA et al, 2009; GIUSTI et al, 2008; WILSON, 2004b). Sendo assim, a proposta desta pesquisa é estudar a atividade antimicrobiana do fotossensibilizador sobre o biofilme dental formado sobre esmalte bovino por meio da utilização da TFD e também comparar os efeitos obtidos com essa técnica quando se usa curcumina ou Photogem[®]. Espera-se alcançar, após este estudo *in situ*, resultados que evidenciem uma diminuição da colonização bacteriana no biofilme das superfícies dentárias tratadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Desde aproximadamente 3.500 anos atrás, a terapia com base em luz é utilizada. O uso de fotossensibilizadores exógenos, para melhorar a eficácia da fototerapia, foi descrito no *Atharva Veda*, um livro indiano sagrado que compõe um dos quatro livros dos Vedas, datado de 1400 a.C. Civilizações antigas como a Índia, o Egito e a China usavam a ação fotodinâmica, pela ingestão de plantas contendo psoralenos, associadas à exposição da luz solar, para tratamento de doenças de pele, como vitiligo e psoríase, tratamento denominado pelo filósofo grego Heródoto de Helioterapia (GOLDMAN, 2007). Ao longo da História, inúmeras vezes os povos morreram por causa das infecções microbianas. Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723) foi um comerciante de tecidos, cientista e construtor de microscópios de Delft, nos Países Baixos. Leeuwenhoek foi o primeiro a observar e descrever bactérias, fibras musculares, protozoários e o fluxo de sangue nos capilares sanguíneos de peixes. Com a criação do microscópio, conseguiu provar que a Biogênese estava correta, já que encontrou microrganismos na experiência feita por Francesco Redi (ZUCKERBERG, 2001; WIKIPÉDIA).

O conceito da Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*) foi introduzido por Oscar Raab em 1900 (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000) e a era moderna da PDT iniciou-se na década de 60 com os estudos de Lipson, Baldes e Olsen (1964), que observaram fluorescência em lesões neoplásicas induzida por injeção de hematoporfirina em estado natural, com conseqüente melhor observação das lesões durante as cirurgias. Desde então, muitos estudos têm sido realizados para entender a eficácia e os mecanismos desse processo.

Em 1903, Von Tappeiner e Albert Jesionek realizaram o tratamento de carcinomas de células basais com a aplicação de solução 5% de eosina, por via tópica, e posterior exposição à luz branca ou à luz solar (TEDESCO, 2007). O termo *Photodynamische Wirkung* (Efeito Fotodinâmico) foi, então, cunhado por Tappeiner e Jodlbauer, para todas as reações fotobiológicas envolvendo um fotossensibilizador, que ocorrem na presença de oxigênio molecular e levam à destruição de células.

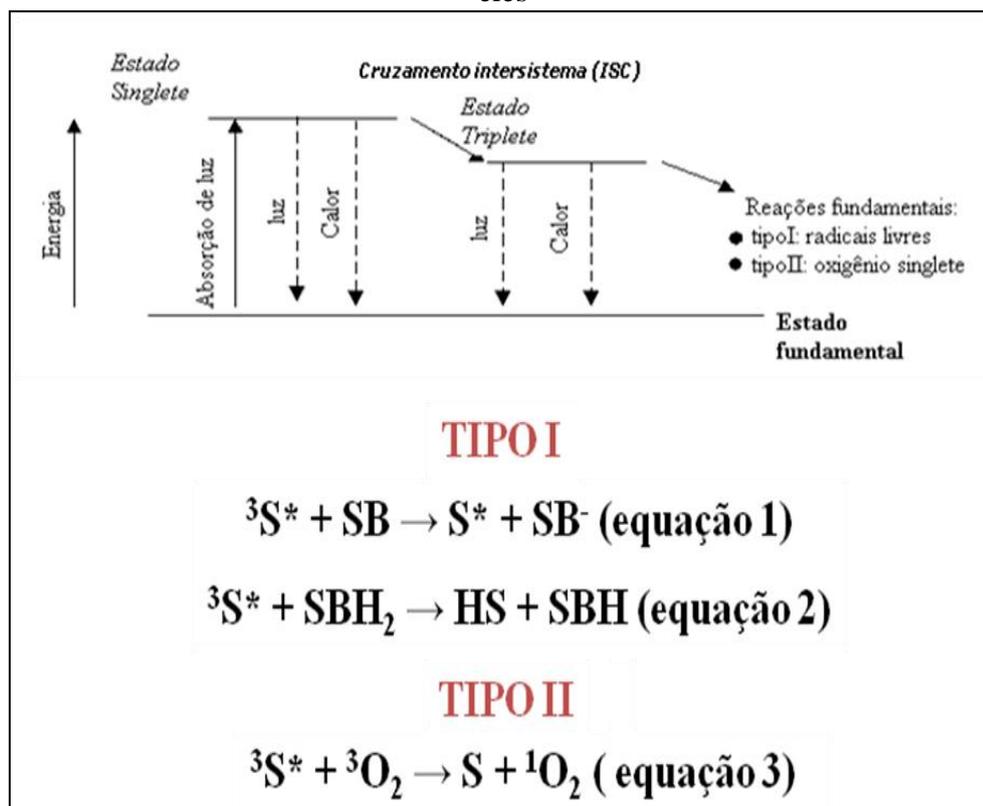
O Laser para uso comercial surgiu em 1960, e seus efeitos biomédicos passaram a interessar a comunidade científica. A utilização do Laser e outras fontes de luz nas ciências da vida baseiam-se em uma grande variedade de fenômenos associados à interação da luz com os tecidos biológicos (AMERICAN WELDING SOCIETY, 1987).

O grande avanço da TFD teve início com a descoberta da primeira geração de fotossensibilizadores, os derivados da hematoporfirina, começando com Schwartz, no início

da década de 50. Ele mostrou que, nos experimentos de Meyer-Betz, o princípio ativo não era a hematoporfirina, pois esse composto é facilmente eliminado do organismo, mas, na realidade, tratava-se de uma mistura de diversas substâncias oligoméricas provenientes do método original de síntese e isolamento da hematoporfirina. Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros (chamou o preparado de hematoporfirina D), e Lipson, sob orientação de Schwartz, na década de 60, investigou o acúmulo preferencial deles em tumores, implantados em camundongos e ratos, e observou que a incidência de luz proporcionava regressão da doença. Como resultado desses estudos, no final da década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama com a utilização de hematoporfirina D e irradiando seletivamente o tumor; marcando, assim, o início da terapia fotodinâmica como terapia clínica para o câncer (ACKROYD et al, 2001).

Em 1976, Weishaupt e colaboradores postularam que o oxigênio singlete, gerado por sensibilização, a partir da transferência da energia do agente fototerapêutico no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela morte celular. Em resumo, o que ocorreria na TFD, é que células ou tecidos neoplásicos expostos a um fármaco (FS) não tóxico de maneira sistêmica ou local, após irradiação de luz, visível em comprimento de onda específico e com espectro de absorção do fármaco próximo e compatível ao da luz, geram-se espécies reativas de oxigênio (EROS), como oxigênio singlete e superóxido que são tóxicos para a célula destruindo constituintes celulares como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando a morte celular. O FS com a irradiação de luz absorve energia e sai do estado fundamental e alcança o estado excitado, podendo retornar ao estado fundamental, liberando luz e calor, ou ainda podendo realizar um cruzamento intersistema, passando a um estado intermediário, denominado tripleto, que pode retornar ao estado fundamental, liberando luz e calor, ou nesse estado ocorre emissão de elétrons que reagem com o oxigênio formando EROS (Figura 4). Os EROS podem ser dos tipos I e II. Em uma reação tipo I, a transferência direta de elétron do FS para um substrato gera diferentes tipos de espécies reativas, após são interceptadas por produtos do oxigênio que geram oxidação, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ou radical hidroxila. Em um tipo II de reação, o FS excitado reage diretamente com o oxigênio molecular podendo então reagir com o oxigênio tripleto normal para produzir o oxigênio singlete. O oxigênio singlete altamente reativo inicia mais adiante reações oxidativas em um ambiente fechado, como a parede celular bacteriana, membrana lipídica, enzimas ou ácidos nucleicos.

Figura 4 - Diagrama de Jablonski: estados energéticos de uma molécula e as transições entre eles



Fonte: <http://microscopy.berkeley.edu/courses/TLM/fluor/index.html>

Dahl (et al., 1989), em um estudo sobre fototoxicidade da curcumina, relatam que esse composto tem coloração amarelo-alaranjado, é extraído da raiz da curcuma longa (família *Zingiberaceae*) e tem sido usada como remédio, tempero e corante. Nesse estudo, mostraram que a curcumina provou ser atóxica em uma série de culturas de células e em todos os estudos animais. Relataram também que a curcumina mostrou ter efeito bactericida em concentrações muito elevadas e, quando iluminada, exerceu potentes efeitos fototóxicos em quantidades micro molares. As bactérias Gram-negativas apresentaram maior resistência à fototoxicidade da curcumina em relação às bactérias Gram-positivas; sugerindo que a curcumina possui efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios e imunomoduladores que poderiam ser exacerbados com sua iluminação em comprimento de onda adequado.

Em um estudo da década de 90, mostrou-se que um grande número de bactérias bucais, incluindo-se as periodontopatogênicas e as cariogênicas, era suscetível à TFD (BURNS; WILSON; PEARSON, 1993). Assim sendo, adaptou-se a utilização de uma técnica empregada a pacientes oncológicos para combater bactérias orais, surgindo daí o interesse em desenvolver um método de descontaminação bucal com base na TFD.

Estudos de Okamoto (et al., 1992) mostraram inicialmente o efeito bactericida da terapia Laser sobre microrganismos em suspensão ; demonstrando que essa terapia podia ser apropriada para aplicações clínicas em Odontologia como prevenção à cárie.

A morte de microrganismos por meio do fotossensibilizador foi descrito por Wainwright, em 1998. Bactérias, fungos e vírus podem ser eliminados após tratamento adequado com um fotossensibilizador apropriado e luz, processo esse atualmente denominado de Inativação Fotodinâmica (IFD), termo proveniente do inglês *Photodynamic Inactivation* (PDI).

O'Neill (et al., 2002), em um dos primeiros estudos sobre IFD em bactérias bucais, avaliaram a sua ação em microrganismos planctônicos(saliva) e em biofilme. Tendo como pressuposto que os microrganismos em biofilme apresentavam refração a IFD, observou neste estudo que as bactérias bucais foram sensíveis a fotossensibilização mesmo em biofilme. Os biofilmes foram expostos ao azul de toluidina e luz de Laser Hélio/neônio. Concluíram que um número significativo de microrganismos inativados através da TFD aplicada, podendo ser útil no tratamento de doenças odontológicas relacionadas com o biofilme dental.

Wilson, em 2004, em estudo sobre o potencial letal bacteriano na aplicação da PDT em infecções bucais, como cáries, doenças periodontais e infecções do conduto dentário, concluiu que as vantagens dessa terapia são: a bactéria pode ser erradicada em um curto espaço de tempo (segundos ou minutos), o desenvolvimento de resistência nas bactérias-alvo é improvável, e danos aos tecidos adjacentes e perturbação da microflora normal podem ser evitados. Além disso, ressalta que essa terapia pode ser uma alternativa útil aos antibióticos e antissépticos bucais e também para a desinfecção de canais radiculares (TAVARES et al, 2010).

Allison (et al., 2004) enfatizaram que a TFD é uma ferramenta clínica potencial para uso clínico, porém mais estudos devem ser feitos no sentido de se encontrarem fotossensibilizadores ideais, assim como para determinar uma correta dosimetria. O conhecimento dos mecanismos fundamentais da TFD e de suas propriedades específicas se faz necessário para a evolução da técnica (ALLISON et al, 2004).

Recentemente, novos estudos começaram a avaliar a efetividade da TFD em microrganismos presentes em biofilme, aderidos à dentina e à matriz de colágeno. Em 2004, Williams et al. utilizaram um Laser de diodo de $\lambda = 633 \pm 2 \text{nm}$, com energia variando entre 1,8 e 14,4J, associado ao azul de toluidina (TBO) na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$, e obtiveram redução de *S. mutans* em matriz de colágeno e dentina humana cariada, embora na dentina a redução microbiana tenha sido mais efetiva do que em matriz de colágeno (AAS et al, 2008).

Ushoa (et al., 2007) destacam que uma das linhas de pesquisas fundamentais para a evolução da TFD é o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. É preciso buscar novos compostos que apresentem melhorias em relação aos já existentes, contribuindo para uma maior atividade, menor custo e maior popularização da TFD.

Em 2007, um estudo de Konopka e Goslinski enfocou a TFD como temática, realizando extensa revisão de literatura sobre o tema; avaliando a reação fotodinâmica, a utilização de FS, fontes de luz, estudos *in situ* e *in vivo*, mecanismo de inativação dos microrganismos, efeitos da terapia em biofilmes e direções futuras. Encontraram que a TFD oferece vantagens para a inativação de microrganismos, tais como o baixo potencial mutagênico das células expostas, o amplo espectro de ação e a capacidade de promover citotoxicidade sobre grande variedade de bactérias, fungos e protozoários.

A mudança no perfil das pesquisas na aplicação do TFD para inativação de microrganismo ocorreu devido ao conhecimento da importância do efeito da interação da luz com o tecido-alvo, uma vez que essa terapia tem se mostrado menos efetiva na redução de bactérias presentes em dentina e em matriz de colágeno do que em suspensão. Estudo realizado em 2008, por Giusti et al., confirmou dados obtidos anteriormente, em que se verificou que o sucesso da TFD com finalidade antimicrobiana depende da difusão do fotossensibilizador por meio da dentina e da penetração e do espalhamento da luz no tecido; portanto, concluíram que o tempo de contato do microrganismo e do fotossensibilizador pode ser um fator crítico (GIUSTI et al, 2008).

Mima (2009), pesquisando a viabilidade da utilização da TFD no tratamento da estomatite protética, realizaram estudos *in vivo*, com os seguintes objetivos: 1) avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica (TFD) na inativação de *Candida albicans* em um modelo murino de candidose bucal; 2) comparar a eficácia clínica e microbiológica da TFD com a da terapia antifúngica tópica (nistatina suspensão oral) no tratamento da estomatite protética, assim como identificar e determinar a prevalência das espécies de *Candida* dessa patologia. Na primeira investigação, camundongos foram imunossuprimidos com injeções subcutâneas de prednisolona. Tetraciclina foi fornecida na água de beber para promover alteração da microbiota bucal dos camundongos. Os animais foram sedados com injeção de cloridrato de clorpromazina e um swab oral embebido em uma suspensão de *C. albicans* (107 UFC/mL) foi esfregado na cavidade bucal dos animais. Quatro dias após a inoculação, a TFD foi realizada no dorso lingual, utilizando-se administração tópica de Photogem[®] a 400, 500 ou 1000 mg/L e, após 30 minutos, iluminação com 305 J/cm² de luz de LED a 455 ou 630 nm. Posteriormente, a quantidade de fungos viáveis foi determinada (UFC/mL) e analisada pelos

testes de Anova e Holm-Sidak ($p < 0,05$). Os camundongos foram sacrificados, e as línguas foram removidas e processadas para avaliação histológica da presença de fungos e reação inflamatória. No estudo clínico, pacientes ($n = 40$) foram aleatoriamente atribuídos a um dos seguintes grupos de 20 indivíduos cada: grupo NYS: pacientes receberam tratamento tópico com nistatina (100.000 UI), quatro vezes ao dia, por 15 dias; e grupo TFD: prótese total superior e o palato dos pacientes foram borrifados pelo Photogem[®] a 500 mg/L e, após 30 minutos de incubação, iluminado por luz de LED a 455 nm (37,5 e 122 J/cm², respectivamente), três vezes por semana, durante 15 dias. Culturas micológicas de amostras das próteses e das mucosas palatinas e fotografias padronizadas dos palatos foram realizadas no *baseline* (dia 0), ao fim do tratamento (dia 15) e no período de acompanhamento (dias 30, 60 e 90). As colônias foram quantificadas (UFC/mL) e identificadas por testes bioquímicos. Não houve diferença entre as concentrações de Photogem[®] e os comprimentos de onda de luz LED utilizados. A análise histológica das línguas revelou que a TFD não promoveu efeitos adversos à mucosa local. Os resultados do ensaio clínico demonstraram que ambos os tratamentos reduziram significativamente os valores de UFC/mL ao final dos tratamentos e no dia 30 do acompanhamento, comparados com *baseline*. Apenas o tempo de uso da prótese foi um fator predisponente significativo associado ao grau de inflamação do palato. Os grupos NYS e PDT demonstraram índice de sucesso de 53 e 45%, respectivamente. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente identificada, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Esses resultados sugerem que a TFD pode ser um tratamento alternativo para a candidose bucal.

Lima et al., em uma pesquisa *in situ*, no ano de 2009, aplicando terapia antimicrobiana fotodinâmica avaliaram o efeito da TFD em cárie em dentina, ao longo de 14 dias, em 20 voluntários que usavam dispositivos intrabucais, contendo pequenos quadrados de dentina humana. Os autores encontraram redução bacteriana significativa com a utilização de azul de toluidina e aplicação de luz (LED) em ambas as densidades de energia, 47 J/cm² e 90 J/cm². Concluíram que a TFD pode ser utilizada de maneira eficaz para eliminação de bactérias na dentina cariada antes da restauração dentária.

Haukvik (et al., 2009), estudando a ação antimicrobiana da curcumina, citam que ela é um potencial fotossensibilizador em TFD para infecções localizadas superficialmente. Ressaltam que é um desafio fazer uma formulação de curcumina ideal em que ela tenha aceitável solubilidade e estabilidade em pH fisiológico e, concomitantemente, uma atividade fototóxica para bactérias. Neste estudo, os efeitos fototóxicos da curcumina contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foram investigados em determinadas preparações aquosas.

Os autores mostraram que a curcumina, usada como fotossensibilizador em TFD, possui efeito antimicrobiano.

3 OBJETIVO GERAL

A proposta desta pesquisa é estudar a possibilidade da descontaminação da superfície dental, em um estudo *in situ*, pela utilização de Photogem[®] e curcumina como FS, e com LEDs como fonte de luz nas cores vermelha e azul, respectivamente, como já utilizadas normalmente na técnica de TFD para o controle microbiológico. Espera-se alcançar, após este estudo, resultados que evidenciem uma diminuição bacteriana nas superfícies tratadas.

3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar a ação da TFD sobre *S. mutans* em biofilme formado “*in situ*” sobre esmalte bovino por meio da utilização de dois fotossensibilizadores: Curcumina e Photogem[®].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada com procedimentos não-invasivos e, para sua realização, foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar e teve sua aprovação, com Parecer 414/2009, tendo posterior aditamento aprovado com Parecer 194/2010 (Anexos D e E).

4.1 SELEÇÃO DE SERES HUMANOS

Foram selecionados 18 voluntários de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, de forma aleatória na população. Os critérios de exclusão dos pacientes nesta pesquisa foram: portadores de doenças sistêmicas não-controladas, fumantes, etilistas, que faziam uso contínuo de bochecho antimicrobiano, edentados e portadores de próteses.

Os pacientes selecionados foram informados sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme Anexo A. Em seguida, responderam a um questionário de saúde geral e saúde bucal (Anexo B). Após os passos descritos acima, os voluntários foram submetidos à moldagem com alginato, para confecção de placa de resina acrílica tipo Hawley na arcada superior, contendo oito (8) blocos de esmalte/dentina bovina, conforme será descrito detalhadamente.

Cada paciente forneceu para a pesquisa 8 amostras (blocos de esmalte/dentina) resultando em total final de 144 amostras que foram divididas em 4 grupos experimentais: Grupo I – controle; Grupo II – tratado apenas com curcumina, sem luz; Grupo III – tratado com curcumina e luz e Grupo IV – tratado com Photogem[®] e luz.

4.2 FOTOSSENSIBILIZADOR

Para esta pesquisa, com a finalidade de desenvolver um sistema de descontaminação de superfície dentária, foi formulado um colutório de curcumina e um aerosol, contendo o Photogem[®] como substância fotossensibilizadora em função das características abaixo citadas. O Photogem[®] é um FS de origem russa, produzido pelo Instituto de Química Fina de Moscou, Rússia, aprovado para uso em humanos pelo comitê estatal de Farmacologia da Federação Russa. Em 2003 foi aprovado pela ANVISA no Brasil (data 08/04/2003; processo 25351.189638/02-00; exp.132851/02-4). Nesse sistema, o Photogem[®] e a curcumina são os agentes capazes de iniciar a fotorreação, promovendo a formação de oxigênio singlete -

agente extremamente reativo que destruirá os microrganismos imediatamente após sua formação.

A composição da apresentação do fotossensibilizador para aplicação da TFD na cavidade bucal é:

- Aerosol - Photogem[®] 1.000µg/mL, Sorbitol líquido 10%, essência de menta 0,05%, Nipagin 0,02% e água destilada q.s.p. 100 mL.
- Colutório - Curcumina (N - metil - D - Glucaminato de curcumina) 1500µg/mL, água destilada q.s.p. 20 ml.

4.3 IRRADIAÇÃO

O desenvolvimento de protocolos para a utilização do aparelho fotoativador, com finalidade de descontaminação bacteriana, é de fundamental importância para o estabelecimento de tal tecnologia, sendo assim uma importante etapa desse trabalho.

Os equipamentos utilizados neste experimento foram dois, sendo ambos construídos a base de diodos emissores de luz (*light emitting diode* ou LED). Os aparelhos foram desenvolvidos pelo Grupo de Óptica, Laboratório de Biofotônica e Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos/SP, Brasil (Figura 5). Um aparelho que emite na faixa da luz azul em 450nm (± 5 nm), e o outro que emite na faixa da luz vermelha em 640nm (± 5 nm), com intensidade de 0,764W/cm² e 0,381 W/cm², respectivamente.

A área irradiada na superfície dentária foi de 0,250cm², durante um tempo de 1 minuto e de 2 minutos com luz azul e vermelha, respectivamente, correspondendo, em ambos os casos, à densidade de energia de 45J/cm² (Tabela 1).

Figura 5 – LEDs (aparelhos desenvolvidos pelo Grupo de Óptica)



Fonte: Material produzido na pesquisa

O cálculo da dose de luz (LED) depositada sobre os blocos de esmalte/dentina bovino foi realizado considerando-se o modo de aplicação “em contato”, quando a ponta ativa do aparelho de LED estava próximo da superfície dos blocos, permanecendo imóvel durante todo o tempo previsto de cada irradiação.

A fórmula utilizada para o cálculo foi a seguinte:

$$\text{DOSE [J/cm}^2\text{]} = \frac{\text{P[W]} \times \text{T[s]}}{\text{A[cm}^2\text{]}}$$

sendo “P” a potência de saída do aparelho, “T” o tempo de irradiação e “A” a área do bloco de esmalte a ser irradiada. Portanto:

$$\text{DOSE azul} = \frac{0,191 \times 60}{0,25} = 45,84 \text{ J/cm}^2 \text{ e}$$

DOSE vermelho = $\frac{0,095 \times 120}{0,25} = 45,72 \text{ J/cm}^2$.

0,25

Tabela 1 - Parâmetros utilizados no procedimento experimental

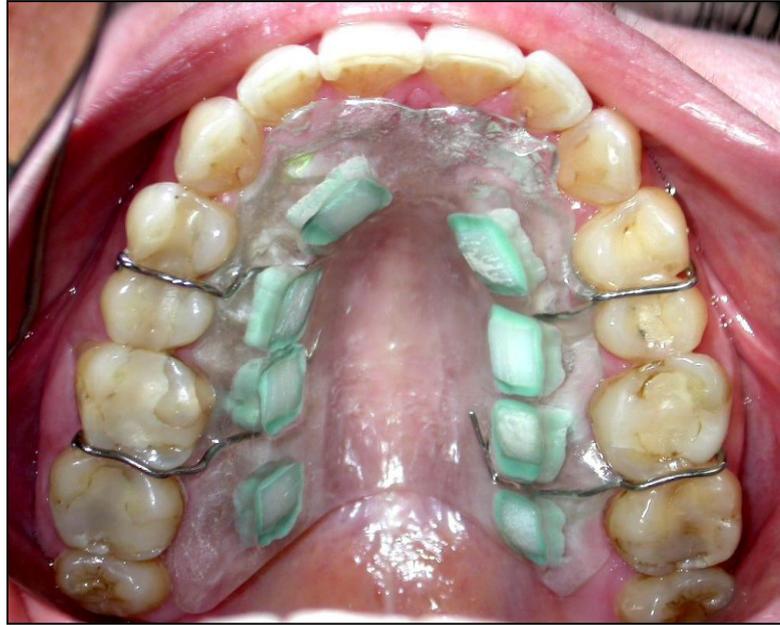
Comprimento de Onda (λ) (nm)	450nm (± 5nm)	640nm (± 5nm)
Área focal (cm^2)	0,250 cm^2	0,250 cm^2
Intensidade (W/cm^2)	0,764 W/cm^2	0,381 W/cm^2
Potência (W)	0,191 W	0,095 W
Tempo de irradiação (min)	1min	2 min
Fluência (J/cm^2)	45 J/cm^2	45 J/cm^2

Fonte: Material produzido na pesquisa

4.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Os dezoito voluntários selecionados receberam uma placa de resina acrílica tipo Hawley na arcada superior, contendo oito blocos de esmalte/dentina bovino (Figura 6). Eles utilizaram durante quatro dias a placa, removendo-a apenas para alimentação, e foram orientados (Anexo C) para não efetuarem higienização da placa e também gotejarem quatro vezes ao dia solução de sacarose a 2% sobre os blocos, para que o biofilme fosse formado sobre a superfície deles (Figura 7). A higienização dos dentes na boca dos voluntários foi feita normalmente com escovação e uso de fio dental, apenas bochecho com agentes antimicrobianos não eram permitidos de acordo com as recomendações do Anexo C. Após a escovação dentária ser realizada, foi solicitado que o voluntário realizasse bochecho com grande quantidade de água antes de colocar a placa. Esse bochecho evitaria que os resíduos de antibacterianos, contidos no creme dental e impregnados na língua e bochecha, entrassem em contato com o biofilme formado nos blocos de esmalte/dentina contidos na placa. Pois, isso poderia diminuir a quantidade de *S. mutans* na superfície dos blocos de esmalte/dentina bovina, o que poderia influenciar nos resultados de UFCs inicial após análise microbiológica.

Figura 6 – Desenho da placa acrílica com os blocos de esmalte/dentina bovino (5mm x 5mm x 2mm).



Fonte: Material produzido na pesquisa

Figura 7 – Gotejamento com solução aquosa de sacarose a 2% sobre cada bloco de esmalte bovino



Fonte: Material produzido na pesquisa

Após quatro dias de uso da placa, os voluntários retornaram à clínica odontológica e dois dos blocos da placa foram removidos para contagem de *S. mutans*, fazendo parte da amostra-controle. Outros dois blocos de esmalte/dentina bovino da placa foram removidos e

colocados submersos em colutório contendo curcumina dentro de uma Placa de Petri estéril durante cinco minutos, sem posterior aplicação de luz; e então foram coletados para análise microbiológica. Outros dois blocos foram também removidos da placa e colocados submersos em colutório contendo curcumina dentro de uma Placa de Petri estéril durante cinco minutos, e, em seguida, foram irradiados com luz azul durante um minuto; e só depois coletados para análise microbiológica. Os dois últimos blocos foram borrifados com aerosol, contendo Photogem[®], e receberam aplicação de TFD com luz vermelha, durante dois minutos; e então foram coletados para análise microbiológica, para a contagem de UFCs.

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os blocos de esmalte/dentina bovino foram coletados um a um após a TFD ter sido realizada e transferidos separadamente para um tubo de ensaio, contendo 1,5mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS) e três esferas de vidro, e, em seguida, as amostras foram submetidas a agitação por 60 segundos no vibrador (agitador tipo vórtex) como mostrado na figura 8, com a intenção de soltar o biofilme dos blocos de esmalte bovino e homogeneizar os microrganismos na suspensão.

Figura 8 - Vórtex (Tubo de ensaio + pérolas de vidro + bloco de esmalte/dentina + solução salina tamponada – PBS)



Fonte: Material produzido na pesquisa

Em condições assépticas, foram feitas diluições seriadas decimais, dentro de uma câmara de fluxo laminar (Figura 9).

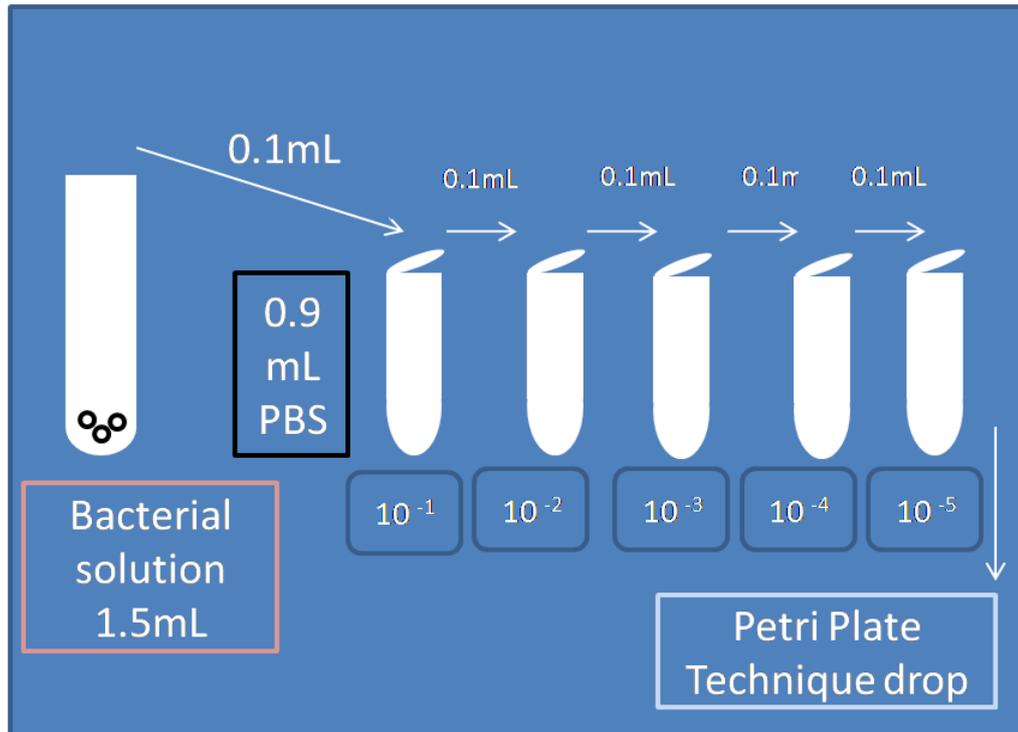
Figura 9 - Diluições seriadas em Eppendorfs dentro de câmara de fluxo laminar



Fonte: Material produzido na pesquisa

As diluições decimais seriadas das amostras foram feitas em solução salina tamponada (PBS) previamente esterilizada até a 5ª diluição (Figura 10). O processo de diluições seriadas foi em uma quantidade de 0,1mL (Figura 7). Este processo de diluições seriadas é empregado para diminuir a concentração de UFCs (unidades formadoras de colônias), tornando viável a contagem de UFCs na placa de Petri. As suspensões foram transferidas (0,1mL) com homogeneização sob vórtex imediatamente antes das transferências.

Figura 10 – Desenho esquemático do processo de diluições seriadas.



Fonte: Material produzido na pesquisa

O meio escolhido para a cultura bacteriana foi o ágar *Mitis Salivarius*, Bacitracina e sacarose (Figura 11), que oferece ótimas condições de crescimento seletivo do *S. mutans*.

Figura 11 – Meio de cultura bacteriana: ágar *Mitis Salivarius*, Bacitracina e sacarose

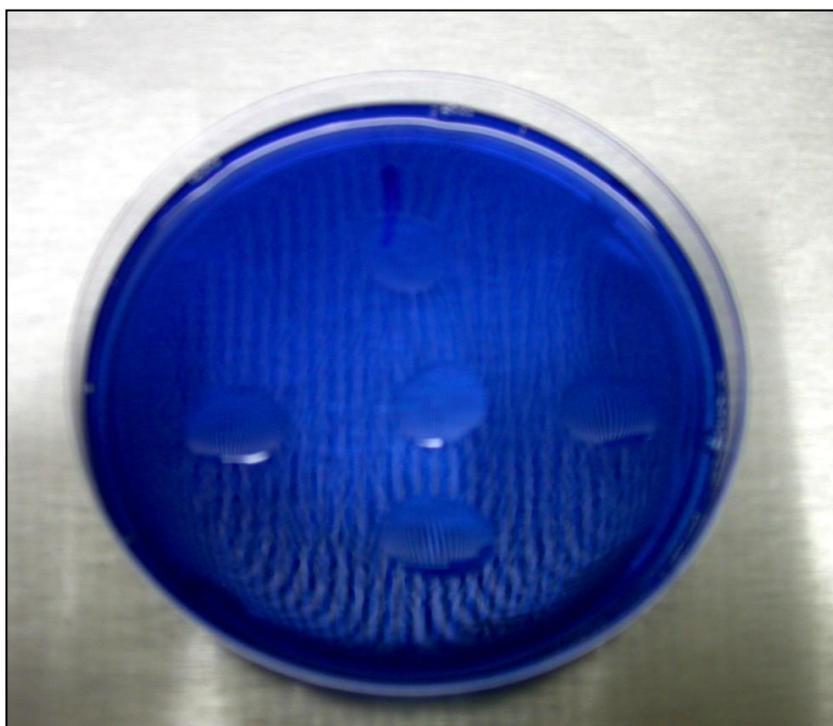


Fonte: Material produzido na pesquisa

As amostras foram semeadas em duplicata nas placas de Petri através de gotas (Figura 12) da suspensão menos diluída para a mais diluída em seqüência circular e horária; e por último uma gota do tubo de ensaio (tubo mãe) foi feito no centro da placa. As transferências das gotas dos Eppendorfs para a superfície do meio de cultivo foram de 30 μ L cada.

As placas de Petri após serem semeadas com a técnica da gota foram embaladas em microaerofilia e encaminhadas para a estufa bacteriológica, com temperatura a 36°C, e incubadas por 48 horas.

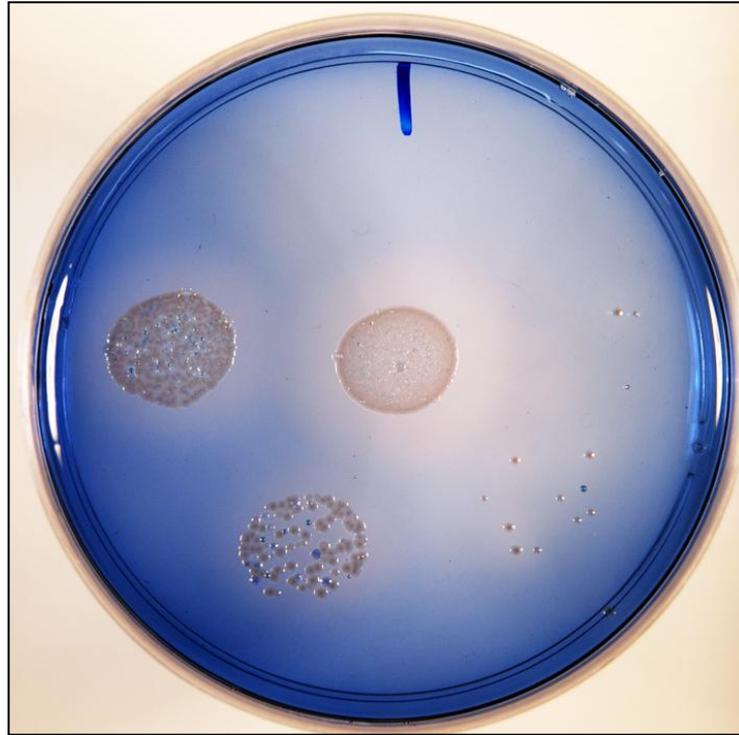
Figura 12 – Placa de Petri semeada pela técnica da gota



Fonte: Material produzido na pesquisa

Passadas 48 horas, as placas foram analisadas por meio de contagem das UFCs (Figura 13). A gota que apresenta um número de colônias bacterianas contáveis mais facilmente é selecionada para se obter a UFC final de cada amostra.

Figura 13 - Aspecto da microflora (*S. mutans*) após incubação de 48 horas

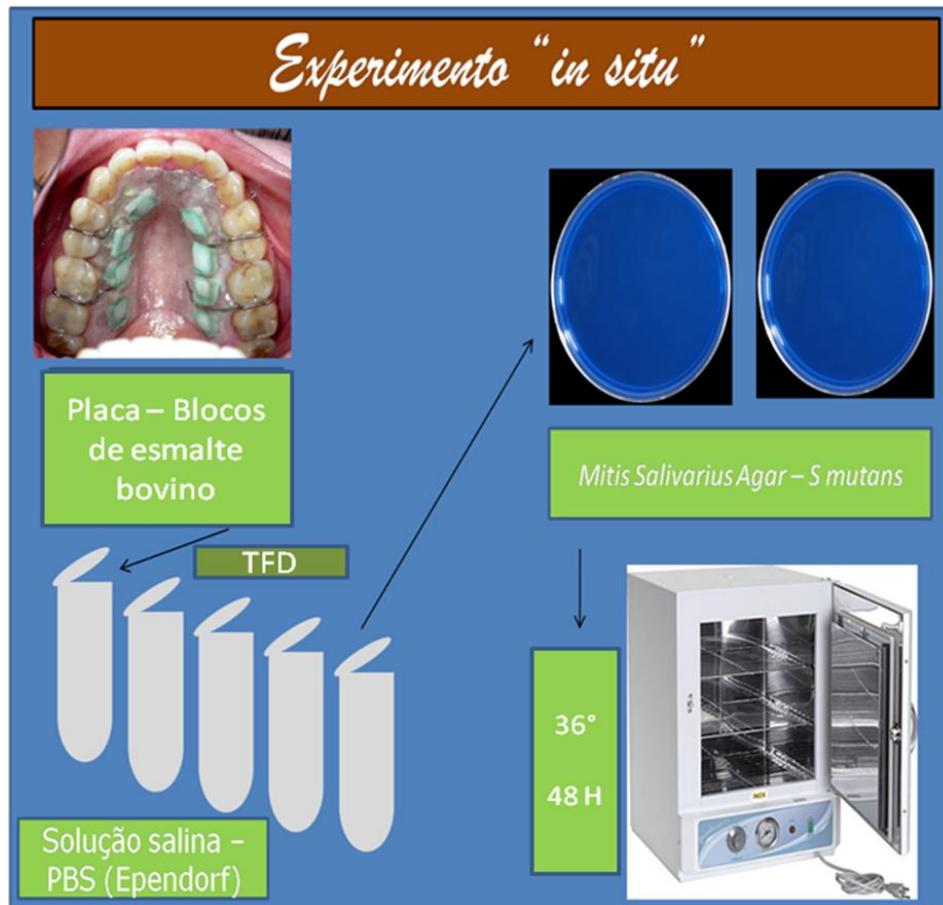


Fonte: Material produzido na pesquisa

As UFCs finais de cada amostra encontradas na placa de Petri são obtidas após serem contadas e multiplicadas pelo fator de diluição, e, após essas operações matemáticas, pudemos, então, relacionar os resultados, como apresentados nas tabelas feitas para cada paciente – de 01 até 18 pacientes – e amostra (Anexo F).

A Figura 14 apresenta um esquema representativo resumido da seqüência do experimento.

Figura 14 - Esquema representativo da seqüência do experimento



Fonte: Material produzido na pesquisa

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em médias e desvios padrão, organizado em tabela e ilustrado em gráfico.

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os dados mostraram ausência de normalidade, foi realizada a transformação em logaritmo (log).

Para analisar a diferença entre os grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA OneWay) com o post hoc Bonferroni.

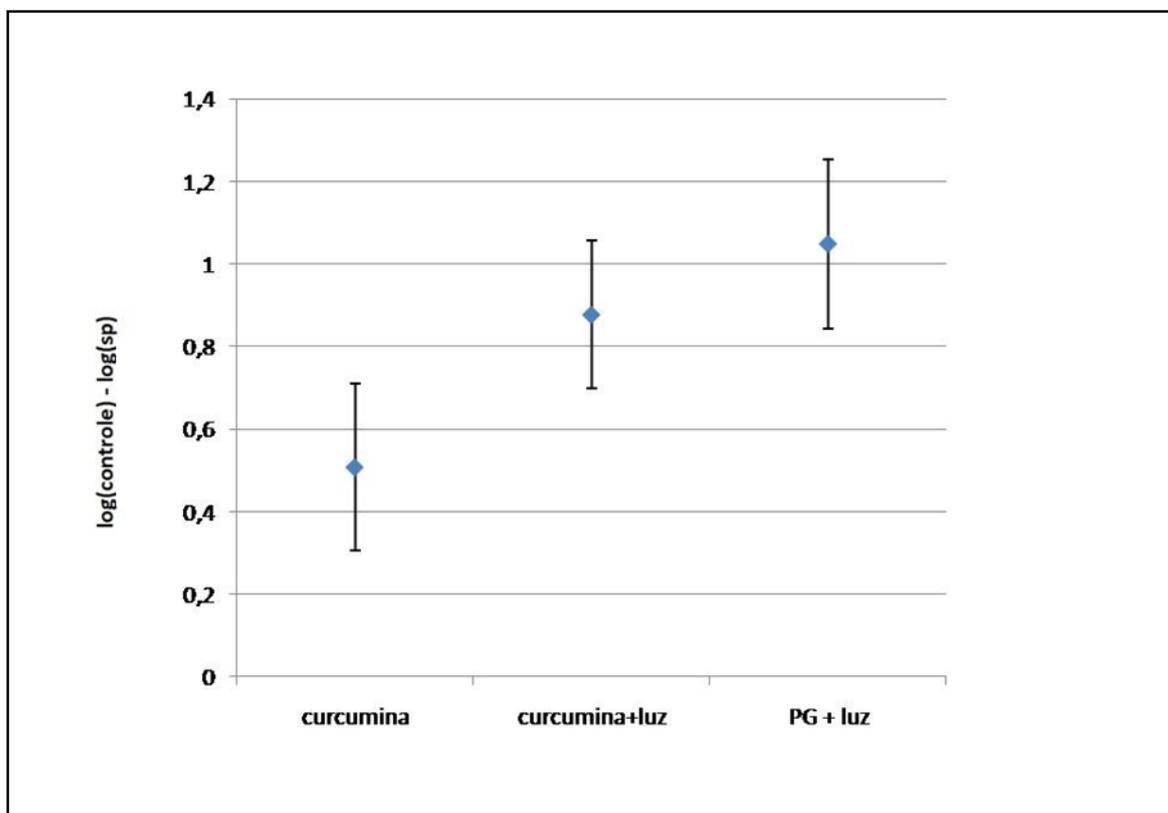
Para análise estatística foi utilizado o software Statistica for Windows Release 7 (Statsoft, Inc., Tulsa, Ok, EUA). O nível de significância estatística foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta pesquisa após a aplicação da TFD sobre *S. mutans* nas dosimetrias e concentrações já citadas, utilizando curcumina e Photogem®, estão descritos nos Gráficos 1, 2 e 3.

Dos resultados obtidos (Gráfico 1), foi possível observar a inibição de *S. mutans* após a aplicação de: Grupo II - apenas curcumina (1.500µg/mL); Grupo III - curcumina (1.500µg/mL) mais luz (45J/cm²) e Grupo IV - Photogen® (1.000µg/mL) mais luz (45J/cm²) sobre o biofilme dental comparado ao grupo controle (Grupo I). Os centros de massas dos dados encontrados como mostrado no Gráfico 1, acima do eixo 0 (zero), o qual representa a falta de eficácia da terapia caso coincidi-se com os centros de massa dos dados obtidos. O eixo vertical do gráfico 1 mostra a média das UFC/mL em log obtidos a partir do grupo controle e dos grupos tratados ($\Delta = \log_{\text{controle}} - \log_{\text{específico}}$).

Gráfico 1 - Expressão dos resultados da ação antibacteriana relacionando grupo controle e grupos com aplicação de apenas curcumina, TFD-curcumina e TFD-Photogem® sobre o biofilme dental.



Após coleta do material microbiológico de 18 pacientes, pudemos observar a redução da quantidade de *S. mutans* após a aplicação de TFD com a curcumina e o Photogem[®], sendo maior a redução quando a TFD é aplicada com o uso de solução contendo Photogem[®] (Gráficos 1 e 2). A porcentagem de redução de *S. mutans* quando comparamos o Grupo I (controle) com os demais grupos experimentais apresenta-se igual a: 8% para o Grupo II, 15% para o Grupo III e 18% para o Grupo IV. Isto pode ser melhor visualizado observando-se os dados expressos em médias, desvios padrão e diminuição em porcentagem de *S. mutans* comparando os grupos experimentais com o grupo controle como mostrado na tabela 2.

Tabela 2 - Tabela dos dados expressos em médias, desvios padrão (normalizados por log) e diminuição em porcentagem de *S. mutans* comparando os grupos experimentais com o grupo controle.

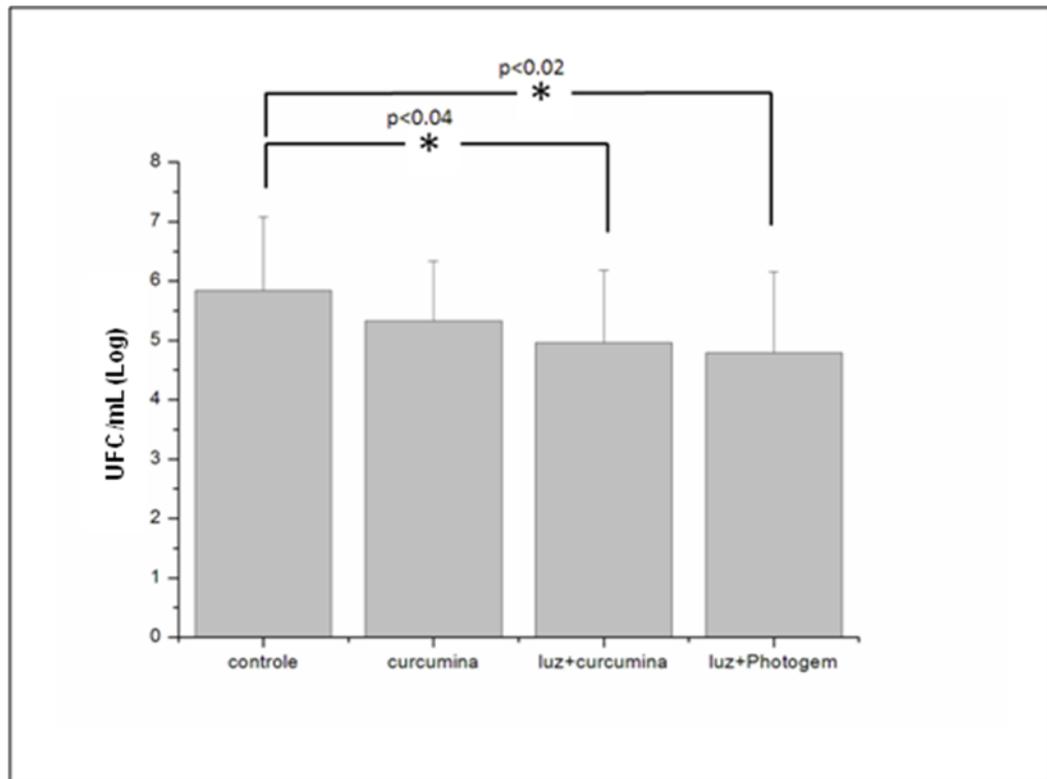
Grupos	Média	Desvio Padrão (DP)	% de diminuição de <i>S. mutans</i>
I-controle	5,84	1,24	-
II-curcumina	5,33	1,0	8
III-curcumina + luz	4,96	1,22	15
IV-Photogem[®] + luz	4,79	1,36	18

A diferença entre os grupos foi feita com a análise de variância (ANOVA OneWay) mostrando resultado significativo quando comparamos os grupos Controle/curcumina+luz ($p=0,04$) e Controle/Photogem+luz ($p=0,02$), tal como mostrado na Tabela 3 e ilustrado no Gráfico 2.

Tabela 3 - Análise da diferença entre os grupos Controle-curcumina+luz e Controle-Photogem[®]+luz utilizando a análise de variância (ANOVA OneWay).

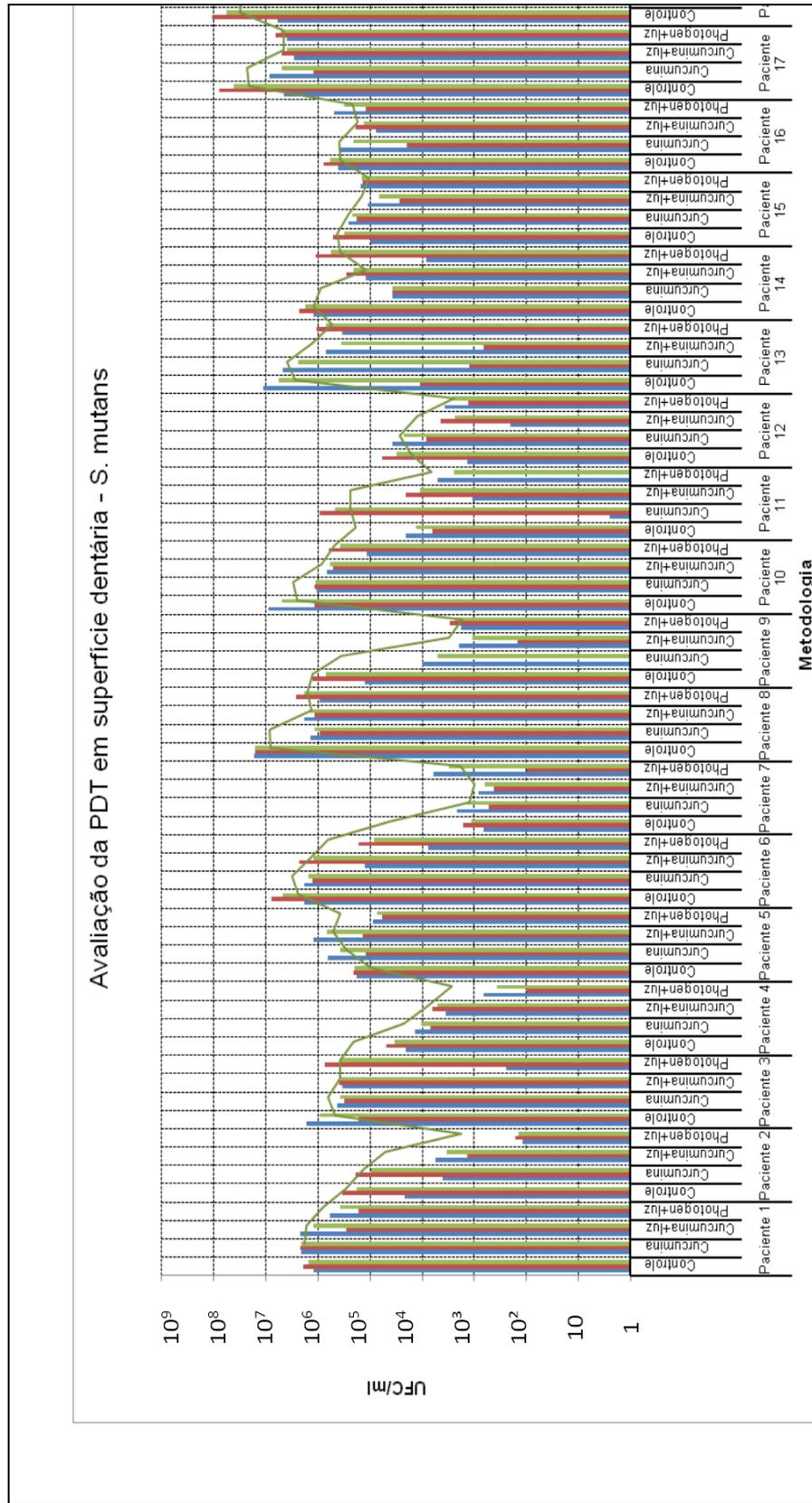
Grupos	Valor de p ($p<0,05$)
Controle – curcumina+luz	$p=0,04$
Controle - Photogem[®] + luz	$p=0,02$

Gráfico 2 – Resultados da ação antibacteriana relacionando grupo controle e grupos com aplicação de apenas curcumina, luz+curcumina e luz+Photogem[®] sobre o biofilme dental



A terapia fotodinâmica conseguiu diminuir significativamente a quantidade de *S. mutans* em biofilme na superfície dentária, porém não conseguiu eliminar completamente esse microrganismo (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Resultados da avaliação microbiológica do grupo controle e grupos com aplicação de curcumina, TFD-curcumina e TFD-Photogem® sobre o biofilme formado em blocos de esmalte bovino contido em placa intra-bucal



6 DISCUSSÃO

Trabalhos como os de Wainwright (1998), Hamblin (2004), Jori (2006) e Dai (2009) relacionados ao efeito de inativação de microrganismo envolvidos em infecções bucais utilizando a TFD, demonstraram a eficácia desta terapia fotônica como um eficaz tratamento de inativação de microrganismos em suspensão em pesquisas *in vitro*. A inativação microbiana na reação fotodinâmica ocorre devido à produção de oxigênio altamente reativo que leva a morte do microrganismo (WAINWRIGHT,1998). As bactérias são inativadas devido às modificações feitas principalmente em sua membrana citoplasmática, porém, também ocorrem reações com os outros componentes dos microrganismos (GAD et al, 2004).

A aplicação da TFD na inativação microbiana apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais antimicrobianos, porém um fator limitante deve ser considerado quando se quer eliminar microrganismos bucais na superfície dental, sua presença em biofilme, isto torna a eficácia desta terapia dificultada. As bactérias em biofilme se diferenciam das planctônicas (suspensão) por estarem envolvidas por uma matriz polimérica extracelular, o que dificulta sua inativação através da TFD e possuem também diferente atividade metabólica e expressão gênica (O'NEILL; HOPE; WILSON, 2002; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999;). Para que a TFD obtenha eficácia antimicrobiana é necessário difusão do FS através da matriz polimérica do biofilme dental e ocorra absorção de luz suficiente por parte do FS para que uma grande quantidade de microrganismos sejam inativados (DE BEER; SRINIVASAN; STEWART , 1994; SOUKOS et al, 2003; FONTANA et al, 2009).

Na odontologia, os FS mais comuns utilizados em pesquisas recentes como antibacterianos bucais, tem sido os FS da família das fenotiazinas, como o azul de metileno e o azul de toluidina (GAD et al, 2004; USACHEVA et al, 2001; WILLIAMS et al, 2003). Outros FSs, tais como, o Photogem[®] que é um derivado da porfirina de origem russa, equivalente ao Photofrin[®] produzido nos EUA, e amplamente utilizado na TFD em pacientes oncológicos tem sido utilizado em pesquisa *in vivo* na Odontologia (MIMA, 2009; DOUGHERTY et al, 1998) como antibacteriano. A curcumina também pode ser considerada um FS alternativo viável para inativação bacteriana na cavidade bucal. Estudos, tais como, de Haukivick (2009) e Dahl (1989) mostram que a curcumina é utilizada como medicamento anticancerígeno e tem mostrado ter efeitos antibacterianos com efeitos de toxicidade e foto toxicidade em bactérias. A curcumina é um composto orgânico amarelo obtido a partir da raiz da curcuma longa (família *Zingiberaceae*) que é muito usada como tempero, corante e

medicamento. A curcumina foi usada em pesquisas com cultura de células animais e em carcinoma epitelial humano e tem provado não ser tóxica (HAUKVIK et al, 2009; BRUZELL; MORISBAK; TONNESEN, 2005; DUJIC et al, 2009; DAHL et al, 1989).

O presente trabalho, *in situ*, mostrou que o uso da Curcumina e Photogem[®] podem ser FSs alternativos no sentido de se obter uma droga com eficiência fotoquímica, apresentam ressonância com o comprimento específico de onda aplicado, bem como eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio e permeabilidade em biofilme dental.

Várias fontes de luz podem ser empregadas em TFD, inicialmente o LASER foi a mais usada (WAINWRIGHT, 1998; DOBSON; WILSON, 1992; WILLIAMS et al, 2003), porém recentemente, novos estudos têm mostrado o LED como fonte alternativa de luz para a realização da técnica da TFD em odontologia (GARCEZ et al, 2003; LIMA et al, 2009; GIUSTI et al, 2008). Os sistemas LASERs apresentam características, como a monocromaticidade, focalização, coerência espacial e temporal, citadas na literatura por Bagnato (GIUSTI et al, 2008), como vantagens da utilização de tais sistemas. As desvantagens do emprego dos LASERs para TFD são o alto custo de aquisição dos equipamentos, o que dificulta ou inviabiliza por completo a disseminação da técnica no sistema público de saúde brasileiro. O uso do LED como fonte de luz na TFD tem sido discutido em estudos recentes, pois, comparados aos sistemas de LASERs disponíveis, estes apresentam menor custo, maior robustez, são portáteis, consomem pouca energia elétrica, flexibilidade de montagem do equipamento e possuem um tempo de vida maior (DOBSON; WILSON, 1992; LIMA et al, 2009; GIUSTI et al, 2008). O LED ainda quando comparado ao LASER, apresenta emissão de luz com maior divergência, permitindo a irradiação de grandes áreas de tecido, possibilitando que uma área com maior quantidade de microrganismo seja inativado. Algo significativo quando temos como objetivo realizar desinfecção de superfícies na cavidade bucal.

Os efeitos biológicos da luz estão diretamente relacionados com o comprimento de onda (λ) da luz, o qual pode ser calculado dividindo a velocidade de propagação da onda (em metros por segundo – m/s) pela frequência (em hertz – Hz): $\lambda = v/f$. Quando se emprega luz em TFD não se deve utilizar comprimento de onda que possa gerar radiação ionizante capaz de propiciar mutação celular em tecidos vivos humanos, ou seja, fonte de luz em um comprimento de onda inferior a aproximadamente 320nm (UVB=320-280nm). Considerando o espectro eletromagnético, os comprimentos de onda de luz menores possuem a característica de maior penetração nos tecidos biológicos e por isso a fonte de luz azul em 450nm (± 5 nm) em relação à fonte de luz vermelha 630nm (± 5 nm) pode ser uma opção melhor para se obter

mais absorção de luz pelo FS presente no biofilme e conseqüentemente melhor rendimento da TFD.

Nas condições experimentais em que foram avaliadas as amostras foi observada uma redução significativa no número de *S mutans*, quando comparamos o Grupo III ($p=0,04$) e o Grupo IV ($p=0,02$) em relação ao grupo I (sem tratamento), sendo a maior taxa de redução no Grupo IV. Pode se observar também nesta pesquisa que o Grupo II, o qual não se aplicou luz, não apresentou redução de *S mutans* de maneira significativa.

Comparando o efeito da TFD na diminuição de microrganismos nos protocolos desta pesquisa com resultados de outros trabalhos encontrados na literatura, tais como no estudo de Willians et al (2003) que encontraram morte de 100% de *S. mutans* em suspensão, usando LASER de diodo ($\lambda=633\pm 2\text{nm}$) com energia total entre 0,4 e 4,8J e azul de toluídina como fotossensibilizador; e com outro estudo, o de Giusti et al (2006) que encontraram 90, 95 e 99% de redução microbiana (*S. mutans* e *Lactobacillus acidophilus*) em cárie de dentina bovina utilizando Photogem[®] (1 e 2 mg/mL) e LED ($\lambda=630\text{nm} \pm 10\text{nm}$) com fluência de 24 e 48 J/cm². Fica claro perceber que os resultados da presente pesquisa embora significativos foram porcentualmente mais baixos em função que os microrganismos presentes em solução e em tecido cariado não se encontram estruturados em matriz extracelular polimérica de maneira que fiquem mais protegidos da ação dos FSs e luz, que é exatamente o que ocorre com os microrganismos em biofilme dental tal como nesta pesquisa.

No tocante à ação das soluções de Photogem[®] e de curcumina, a análise estatística dos resultados dos grupos experimentais desta pesquisa *in situ* indicou a diminuição significativa de *S. mutans* destes grupos em relação ao grupo controle. Tal constatação confirma que esses FSs – curcumina e Photogem[®] - com aplicação de luz (TFD) possuem ação antimicrobiana contra os patógenos bucais como já visto nos trabalhos de Mima (2009), Usacheva (2001) e Willians (2003). Portanto, os resultados embora reduzidos da inativação microbiana da TFD sobre biofilme dental encontrados nesta pesquisa, que foi realizada particularmente sobre *S. mutans*, estão de acordo com os resultados encontrados por Fontana (2009) e corroboram com os resultados de O'Neill (2002) e Zanin (2005) que indicam a TFD como um tratamento viável para inibição de microrganismos em biofilme dental (placa dental).

Os resultados encontrados nesta pesquisa mostram uma diminuição maior de UFCs (*S. mutans*) em biofilme quando se aplica a TFD com LED emitindo luz vermelha em 630nm ($\pm 5\text{nm}$) logo após a solução de Photogem[®] (1.000 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao uso LED emitindo luz azul em 450nm ($\pm 5\text{nm}$) e solução de curcumina (1500 $\mu\text{g/mL}$). Esse resultado indica assim um rendimento melhor do Photogem[®] mesmo em menor concentração que a curcumina. Isto

deve ser levado em consideração, já que a curcumina ao contrário do Photogem[®] possui propriedades corantes e, portanto, se sua concentração no colutório for muito aumentada poderia provocar maior risco em pacientes portadores de restaurações estéticas.

Outra desvantagem da curcumina é sua falta de estabilidade fotoquímica em solução o que torna seu potencial de geração de oxigênio tóxico diminuído em função de sua rápida degradação (BRUZELL; MORISBAK; TONNESEN, 2005).

As vantagens do emprego da curcumina em relação ao Photogem[®] para TFD são sua facilidade em obtenção no mercado nacional, seu menor custo e ser um FS de origem natural, o que facilita sua viabilização e difusão da técnica no sistema público de saúde brasileiro.

Faz-se importante salientar que os FSs utilizados nesta pesquisa agem de maneira seletiva sobre os microrganismos, já que apenas as áreas irradiadas por luz produzem espécies reativas de oxigênio (EROS) - radicais livres e oxigênio singlete - capazes de eliminar os microrganismos. As EROS agem de maneira rápida, por serem pouco estáveis no estado excitado tornando essas drogas com menor tempo de atividade sobre os tecidos bucais sãos, evitando assim, efeitos colaterais indesejáveis sobre os mesmos, sendo uma vantagem em comparação aos produtos antibacterianos tais como a clorexidina, triclosan, própolis ou mesmo o flúor (CAUFIELD; DASANAYAKE; LI, 2001; MARCH, 1999; JOHARJI; ADENUBI, 2001; SWERTS; COSTA; FIRINI, 2005).

Outra importante vantagem da TFD utilizando a curcumina e Photogem[®] perante aos produtos encontrados comercialmente até o momento, é não estar ligada à mediação de radicais químicos com ação a um único ponto de ataque. Esses FSs agem produzindo EROS, como já dito anteriormente, que não possuem especificidade por sítio de ação, reagindo com vários substratos biomoleculares; isso torna o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes improvável (GAD et al, 2004, HAMBLIN; HASAN, 2004; JORI, 2006; FEDERICO, 2002; TAVARES et al, 2010).

A curcumina e o Photogem[®] mostraram serem eficazes quando utilizados em TFD para descontaminação da superfície dentária e inativação bacteriana em biofilme em função da diminuição de *S. mutans*, tal como comprovado nos resultados apresentados nesta pesquisa.

A TFD realizada nos parâmetros desta pesquisa mostrou poder ser uma terapia alternativa para prevenir à cárie por diminuir em biofilme dentário o principal agente etiológico da cárie, o *S. mutans*.

Finalmente, é recomendável a realização de outros modelos experimentais para que sejam encontrada dose de luz e concentração de FS específica para maior inativação de

microrganismo em biofilme dental, bem como os intervalos de tempo de nova aplicação da terapia para se obter a inativação de *S. mutans*, ou melhor, controle destes microrganismos para se obter sua real eficácia sobre o biofilme dental em pacientes predispostos a cárie dental, evitando a mesma. Outro protocolo que pode ser testado é com múltiplas sessões de TFD, avaliando o efeito de recolonização dos microrganismos e o efeito seriado da terapia.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia usada e os resultados obtidos e aqui apresentados, podemos concluir que:

- 1- A TFD, através da utilização de uma solução a base de curcumina, determinou reduções significativas ($p=0,04$) na quantidade total de *S. mutans* em biofilme na superfície dental;
- 2- A TFD, através da utilização de uma solução contendo Photogem[®], determinou uma redução significativa ($p=0,02$) da quantidade total de *S. mutans* em biofilme na superfície dental;
- 3- Os resultados demonstram semelhança entre os grupos estudados em que se aplicou TFD; e,
- 4- O grupo em que se aplicou apenas solução a base de curcumina, sem aplicação de luz, não determinou reduções significativas na quantidade total de *S. mutans* em biofilme na superfície dental.

8 ESTUDOS FUTUROS

A TFD aplicada como agente antimicrobiano pode dar suporte ao cirurgião-dentista nas seguintes situações: desinfecção pré-operatória, pacientes portadores de próteses, pacientes imunodeprimidos, gengivite, controle da halitose, entre outras; e também dar suporte em ambiente hospitalar, através de: desinfecção bucal, prevenção de endocardite bacteriana, prevenção de pneumonia, entre outras. Para as aplicações da TFD em descontaminação bucal acima indicada, estudos futuros devem ser desenvolvidos e dirigidos para seus objetivos específicos no sentido de se obter parâmetros ideais com esta técnica.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A. et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **J. of Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 4, p. 1407-1417, Apr 2008.
- ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.74, n.5, p. 656-669, 2001.
- ALLISON, R.R.et. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 1, pp. 27-42, 2004.
- AMERICAN WELDING SOCIETY. **Welding handbook**. 8. ed. Miami: American Welding Society, 1987.v.2, cap. 22
- AOBA, T.; FEJERSKOV, O. Dental fluorosis: chemistry and biology. **Crit. Ver. Oral Biol. Med.**, v.13, n.2, p.155-170, 2002.
- BAGNATO, V. S. **Laser e suas aplicações em ciência e tecnologia**. São Paulo: Editora e Livraria da Física, 2008.
- BIDAULT, P.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. **J. Canadian Dental Assoc.**, v. 73, n. 8, p. 721-725, 2007.
- BRUZELL, E.M.; MORISBAK, E.; TONNESEN, H.H. Studies on curcumin and curcuminoids XXIX. photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected preparations. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.4, n.7,p. 523-530, July 2005.
- BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G. J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from helium-neon laser. **J. Med. Microbiol.**, England, v. 38, n. 6, p. 401-405, June 1993.
- CAUFIELD, P. W.; DASANAYAKE, A. P.; LI, Y. The antimicrobial approach to caries management. **J. Dent. Educ.**, v. 65, n. 10, p. 1091-1095, Oct. 2001.
- CAUFIELD, P. W.; GRIFFEN A. L. Dental caries. an infectious an transmissible disease. **Pediatr. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 47, n. 5, p. 1001-1019, Oct. 2000.
- CHONDROS, P. et al. Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. **Lasers in Med. Sci.**, v. 24, n. 5, p. 681-688, 2009. Disponível em: <
<http://www.springerlink.com.ez31.periodicos.capes.gov.br/content/102825/?p=3926990d40914f26b1f3bf6321b45792&pi=0>>. Acesso em: 21 jun.2011
- CORRÊA, F.N. et al . Chemical *versus* conventional caries removal techniques in primary teeth: a microhardness study. **J. Clin. Pediatr. Dent.**,v.31 , n.3, p.187-92, 2007.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, p.1318–22,1999.

COUVARLIN, P. Evasion of antibiotic action by bacteria. **J. Antimicrob. Chemoter.**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 855-869, May. 1996.

DAHL, T.A.et al. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. **Arch. Microbiol.** v.151,n.2, p. 183-185, 1989.

DAI, T.; HUANG, Y.Y.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v.6, n.3-4, p.170-188, Sep./Dec. 2009.

DE BEER, D.; SRINIVASAN, R.; STEWART, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 12, p. 4339-4344, Dec. 1994.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from low-power laser. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, n.11, p. 883-887, Nov. 1992.

DOUGHERTY, T.J. et al. Photodynamic therapy (review). **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 12, p. 889-905, June 1998.

DUJIC, J. et al. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. **Int. J. Cancer**, v.124,n.6, p.1422-1428, Mar. 2009.

FEDERICO, M.L. et al. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diases sensitized by prophyccene-polylysine conjugates. **Photochem. & Photobiol. Sci.**, v. 1, p. 468-470, 2002.

FONTANA, C.R.et al. The antibacterial effect of photodynamic therapy in dental plaque-derived biofilms. **J. Periodontal Res.**, v.44, n.6, p.751-759, Dec. 2009. Disponível em: <<http://portal.revistas.bvs.br/index.php?issn=0022-3484&lang=pt>>.Acesso em: 22 jun.2011

GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob. Agents Chemoter.** v. 48, n. 6, p. 2173-2178, June 2004.

GARCEZ, A. S. et al. Terapia fotodinâmica em odontologia – laser de baixa potência para redução bacteriana. **Revista da APCD**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 223-226, 2003.

GIUSTI, J. S. M. et al. Effectiveness of photogem activated by LED on the decontamination of artificial carious bovine dentin. **Laser Physics**, v. 16, n. 5, p. 859-864, 2006.

GIUSTI, J. S. M.; PINTO, L. S.; PIZZOLITO, A. C.; HELMERSON, K.; CARVALHO Filho, E.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomed. Laser Sur.**, New York, v. 26, n. 4, p. 281-287, Aug. 2008.

GOLDMAN, M.P. Mecanismo de ação do ácido aminolevulínico tópico. In: _____. **Terapia fotodinâmica**. Saunders/Elsevier, 2007. p.1-12. (Serie Procedimentos em Dermatologia Cosmética).

GREENWELL, H. ; BISSADA, N.F. Emerging Concepts in Periodontal Therapy **Drugs**, v. 62, n. 18, p. 2581-2587, 2002. Disponível em: <
<http://www.ingentaconnect.com/content/adis/dgs/2002/00000062/00000018/art00002>>.
Acesso em: 21 jun. 2011.

HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. & Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 436-450, 2004.

HAUKVIK, T. et al. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. **Pharmazie**, v.64, n.10, p.666-673, 2009.

JOHARJI, R. M.; ADENUBI, J. O. Prevention of pit and fissure caries using an antimicrobial varnish: 9 month clinical evaluation. **J. Dent.**, v. 29, n. 4, p. 247-254, May 2001.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art an perspective. **J. of Environ. Pathol., Toxicol. and Oncol.**, v. 25, n. 1, p. 505-519, 2006.

KALKA, K; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.42, p. 389-413, 2000.

KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. **Arch. Oral. Biol.**, v. 1, n. 4, p. 304-320, Mar. 1960.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamica therapy in dentistry. **J. Dent. Res.**,v.86, n.8, p. 694-707, 2007.

LIMA, J. P.M.; MELO, M. A. S.; BORGES, F. M. C.; TEIXEIRA, A. H.; OLIVEIRA, C. S.; SANTOS, M. N.; RODRIGUES, L. K. A.; ZANIN, I. C. J. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 117, n. 5, p. 568-574, Oct. 2009.

LIN, D. et al. Persistently high levels of periodontal pathogens associated with preterm pregnancy outcome. **J. of Periodontology**, v. 78, n. 5, p. 833-841, 2007.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivat as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. **Dis. Chest.**, El Paso, v. 46, p. 676-679, Dec. 1964.

MALDONADO, E. P. **Mecanismos de interação laser-tecido** [apostila do curso de mestrado profissionalizante de lasers em odontologia do Ipen]. São Paulo, SP: Ipen, 2000.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, Washington, v. 62, n. 1, p. 71-109. Mar. 1998.

MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Dent. Clin. North Am.**, v. 43, n. 4, p. 599-614, Oct. 1999.

MIMA, E. G. O. **Viabilidade de utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da estomatite protética:** estudos *in vivo*. 2009. 156f. Tese (Doutorado em Prótese)–Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2009.

NARVAI, P. C.; CASTELLANOS, R. A.; FRAZÃO, P. Prevalência de cárie em dentes permanentes de escolares do Município de São Paulo, SP, 1970-1996. **Rev. de Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p.196-200, abr. 2000.

NEWBRUM, E. **Cariology**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1978.

O’NEILL J.F.; HOPE C.; WILSON, M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. **Lasers Surg Med.** v. 3, p. 86-90, 2002

OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 12, n. 4, p. 450-458, 1992.

PHOTOFRIN MEDICAL INC. Kenneth R. Weishaupt, Thomas J. Dougherty, William R. Potter. Purified hematoporphyrin derivative for diagnosis and treatment of tumors, and method. WO84/01382, 09 Sept.1983,12 Apr 1984.

PINTO, V. G. **Saúde bucal:** odontologia social e preventiva. 4. ed. São Paulo: Editora Santos, 2000.

SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.** Ribeirão Preto, v. 33, n. 8, p. 869-880, Aug. 2000.

SOUKOS, N. S.; MULHOLLAND, S. E.; SOCRANSKY, S. S. ; DOUKAS, A. G. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in oral biofilm model. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 33, n. 3, p. 161-168, Sept. 2003.

SPRATT, D. A.; PRATTEN, J.; WILSON, M.; GULABIVALA, K. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. **Int. Endod. J.**, v. 34, n. 4, p. 300-307, June 2001.

SPRATT, D.A. et al. An *in vitro* evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. **Int. End. J.**, v. 34, n. 4, pp. 300-307, June. 2001.

SUMMITT, J. B. Conservative cavity preparations. **Dent. Clin. North Am.**, v. 46, n. 2, p. 171-184, Apr. 2002.

SWERTS, M.S.O.; COSTA, A.M.D.D.; FIRINI, J.E. Associação de clorexidina e própolis atuando na inibição da aderência de *Streptococcus* spp. **Rev. Internacional de Perio. Clínica**, v.2, p.10-16, 2005.

- TAVARES, A. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. **Mar. Drugs**. v.8,n.1,p. 91-105, 2010.
- TEDESCO, A.C. Processos fotodinâmicos: a “Luz” de uma nova terapia aplicada à saúde humana. **Jornal Bras. de Laser**, v. 1, n. 4, p. 32-41, out. 2007.
- USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 29, n. 2, p.165-173, Aug. 2001.
- USHOA, A. F. et al. Terapia fotodinâmica: mecanismos e perspectivas de desenvolvimento de novos fotossensibilizadores. **Jornal Bras. de Laser**, v. 1, n. 4, p. 10-22, Out. 2007.
- VIEIRA, D.; VIEIRA, D. Pontas de diamante CVD: início ou fim da alta rotação? **JADA Brasil**, São Paulo v. 5, n. 10, p. 307-313, set./out. 2002.
- WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **J. Antimicrob. Chemoter.**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 13-28, July 1998.
- WIKIPÉDIA - A enciclopédia livre. **Cárie dentária**. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/C%C3%A1rie_dent%C3%A1ria#cite_note-10>. Acesso em: 8 Out. 2009.
- WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES, M. J.; 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.**, Basel, v. 37, n. 3. p. 190-193, May/June 2003.
- WILLIAMS, J.A. et al. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue o in a collagen matrix and carious dentine. **Caries Res. Basel**, v. 38, n. 6, p. 530-536. Nov./Dec. 2004.
- WILLIAMS, J.A. et al. 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. Basel.**, v. 37, n. 3, pp. 190-193, May/Jun. 2003.
- WILSON, M. ; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G. J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low – power laser light in the presence of a photosensitizer. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 78, n. 5, p. 569-574, May 1995.
- WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol. Sci.** v.3, n.5, p. 412-418, May 2004.
- WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 299-306, Oct. 1993.
- WOODBURN, K. W. et al. **J. Clin. Laser Med. Surg**, New York, v. 14, n. 5, p. 343-348, Oct. 1996.

ZANIN, I. C. J. et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. **J. of Antimicrobial Chemother.**, v.56, p.324–330, 2005.

ZEINA, B. et al. Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes *in vitro*. **Br. J. Dermatology.**, v. 146, n. 4, p. 568-573, 2002.

ZUCKERBERG, C. Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723). **Medicina**, Buenos Aires, v.61, n.1, p.114, 2001.

atendimento clínico, ou mesmo qualquer problema durante a realização desta pesquisa com o paciente, o mesmo poderá contatar o pesquisador responsável, Dr. Vitor H. Panhóca, pelo telefone (16) 3373-9810, ramal 222, para solucionar o problema.

6. As informações obtidas por meio desta pesquisa serão confidenciais (asseguramos o sigilo sobre sua participação). Assim, os resultados dos exames não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Você receberá uma cópia deste termo em que consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, com o qual você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Dr. Vitor Hugo Panhóca (Mestrando em Biotecnologia sob orientação do Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato e da Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi)

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - Centro

CEP 13560-970 - São Carlos, SP

Telefone: (16) 3373-9810 - Ramal: 222

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador informou-me que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar, que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), localizada na Rodovia Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13565-905 - São Carlos – SP/Brasil. Telefone: (16) 3351-8110. E-mail: **cephumanos@power.ufscar.br**.

São Carlos, SP, _____ de _____ de _____.

Sujeito da pesquisa

ANEXO B

Instituto de Física de São Carlos – USP**CEPof – Odontologia**

Data:

Nome:

Idade: Data de nascimento:

Naturalidade: Estado Civil:

Gênero: Raça: Profissão:

Endereço completo:

Cidade: Estado: Fone:

Questionário de Saúde Geral

Apresenta ou apresentou algum problema de saúde relacionado aos seguintes sistemas? Sim

Não

- Cardiovascular Endócrino Genito-urinário
 Hematológico Neurológico Psiquiátrico
 Imunológico Respiratório Gastro-intestinal
 Músculo-esquelético Pele
 Doenças infecto-contagiosas Outros
 Não apresenta problemas História familiar

Quais?

Esta tomando algum medicamento? Sim Não

- Hipoglicemiantes Anticoncepcionais
 Antihipertensivos Insulina Antialérgicos
 Antibióticos Corticóides
 Anticoagulantes Psiquiátricos Analgésicos
 Anticonvulsivantes Outros Não soube relatar

Quais?

Hábitos:

Tabaco: sim não

Fuma () Masca ()

Há quanto tempo? Quanto por dia/sem.?

Ex-tabagista? Deixou faz quanto tempo?

Álcool: sim não

Que tipo?

Há quanto tempo? Quanto por dia/sem.?

Ex-alcoolista? Deixou faz quanto tempo?

Outras drogas? sim não

Que tipo?

Há quanto tempo? Quanto por dia/sem.?

Deixou faz quanto tempo?

Questionário de Saúde Bucal

Sente a boca seca? sim não

Considera sua higiene bucal? Boa Satisfatória Regular Insatisfatória

Quantas vezes escova os dentes por dia em média?_____

Há quantos minutos fez a última escovação? _____

Escova a língua também? sim não

Escova o céu da boca também? sim não

Faz uso regular de bochecho com antimicrobiano (ex. Listerine) ? sim não

Se sim, quantas vezes ao dia?_____

Há quantos minutos fez o último bochecho?_____

ANEXO C

RECOMENDAÇÕES

Paciente: _____

Você está recebendo uma placa móvel na arcada superior com quadradinhos de esmalte, a qual você deverá usar durante uma semana, respeitando as seguintes instruções:

1. Escovar a placa superior com os quadradinhos de esmalte 3 vezes por dia: após o café da manhã, almoço e antes de dormir. A placa superior deve ser limpa com a escova dental com cerdas macias. Para a limpeza da placa, deve-se aplicar pasta dental comum em toda a superfície que entra em contato com a mucosa palatina (“céu da boca”). Depois disso, enxaguar a placa com água corrente. Jamais utilizar a escova dental para limpar a superfície da placa que entra em contato com a língua e com os quadradinhos de esmalte. **Repito: jamais higienizar os quadradinhos de esmalte fixo na superfície externa da placa.**
2. Após escovar a placa e antes de colocá-la na boca novamente, gotejar uma gota de sacarose (frasco branco fornecido) sobre cada quadradinho da placa e mantê-la em repouso durante 10 minutos antes de colocá-la novamente na boca.
3. Sempre escovar a língua com escova e creme dental, depois com escova e água. A língua deve ser escovada, no mínimo, 4 vezes ao dia: após o café da manhã, almoço, jantar e antes de dormir. Os dentes naturais devem ser escovados com escova macia e creme dental 4 vezes ao dia. O fio dental deve ser passado no meio dos dentes, pelo menos, uma vez ao dia, antes de dormir.
4. Sempre dormir com a placa. Remover a placa da boca apenas para se alimentar. Quando remover a placa da boca, sempre mantê-la na caixa plástica, que será entregue juntamente com a placa, de preferência com água, livre de qualquer substância para higiene da mesma (ex: Cepacol[®], Listerine[®] etc.).
5. Alimentos líquidos podem ser ingeridos com a placa na boca.
6. Nunca guardar a placa no bolso ou em guardanapo; isso ocasiona, com frequência, quebra da placa, por esmagamento, ou perda da placa, que acaba sendo jogada fora por algum estranho junto com o guardanapo.
7. Jamais use algum tipo de colutório (ex: Cepacol[®], Listerine[®]) ou algum outro tipo de antimicrobiano bucal no seu dia-a-dia com a placa na boca.

8. Jamais ferva ou faça algum tipo de procedimento de higienização da placa que não seja o indicado no item 1. Qualquer dúvida, consulte o pesquisador responsável.

**LEMBRE-SE: ESTA PESQUISA DEPENDE
FUNDAMENTALMENTE DA COLABORAÇÃO DO PACIENTE.
PORTANTO, OS CUIDADOS AO DORMIR COM A PLACA, PARA LIMPÁ-LA
SEM ESCOVAR OS QUADRADINHOS DE ESMALTE,
E PARA HIGIENIZAR OS DENTES E A LÍNGUA DEVEM SER
SEGUIDOS PELO PACIENTE CUIDADOSAMENTE.**

ANEXO D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
 Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
 Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
 Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
 Fax: (016) 3361.3176
 CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
 propp@power.ufscar.br - <http://www.propp.ufscar.br/>

CAAE 3444.0.000.135-09

Título do Projeto: EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO CONTROLE BACTERIANO NA SUPERFÍCIE DENTÁRIA COMPARANDO USO DE PASTILHA E SPRAY CONTENDO FOTOSSENSIBILIZADOR

Classificação: Grupo III

Procedência: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Pesquisadores (as): Vitor Hugo Panhóca, Vanderlei Salvador Bagnato (orientador), Cristina Kurachi (orientadora)

Processo nº.: 23112.003671/2009-04

Parecer Nº. 414/2009

1. Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ___/___/___ e ao término do estudo.

2. Avaliação do projeto

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (CEP/UFSCar) analisou o projeto de pesquisa acima identificado e considerando os pareceres do relator e do revisor DELIBEROU:

As pendências apontadas no Parecer nº.376/2009, de 29 de setembro, foram satisfatoriamente resolvidas.

O projeto atende as exigências contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

3. Conclusão:

Projeto aprovado

São Carlos, 29 de outubro de 2009.


 Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
 Coordenadora do CEP/UFSCar

ANEXO E



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil

Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUF - BR

cephumanos@power.ufscar.br<http://www.propq.ufscar.br>**CAAE: 3444.0.000.135-09****Projeto de Pesquisa:** EFEITOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO CONTROLE BACTERIANO NA SUPERFÍCIE DENTÁRIA COMPARANDO USO DE PASTILHA E SPRAY CONTENDO FOTOSSENSIBILIZADOR**Pesquisadores responsáveis:** Vitor Hugo Panhóca, Vanderlei Salvador Bagnato (orientador), Cristina Kurachi (orientadora).**Parecer nº. 194/2010**

Este projeto já foi aprovado por este comitê (Parecer 414/2009). Em 07/04/2010, o pesquisador solicitou aditamento. Ao apreciar o pedido esse comitê a reformulação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido incluindo a previsão dos riscos para os sujeitos de pesquisa (Parecer 153/2010). A nova versão foi adaptada.

Conclusão

Considerando os documentos que compõe o presente processo, não há impedimento para implementação da proposta. O aditamento proposto está aprovado, uma vez que atende as exigências contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

São Carlos, 01 de junho de 2010.

Profá. Dra. Cristina Paiva de Sousa

Coordenadora do CEP UFSCar

ANEXO F

PAC01	UFC/mL	19/08/10
1	$1,2 \times 10^6$	controle
2	$1,9 \times 10^6$	controle
3	$2,1 \times 10^6$	curcumina
4	$2,2 \times 10^6$	curcumina
5	$2,2 \times 10^6$	curcumina+luz
6	$2,9 \times 10^5$	curcumina+luz
7	$6,0 \times 10^5$	Photogen [®] +luz
8	$1,7 \times 10^5$	Photogen [®] +luz

PAC02	UFC/mL	19/08/10
9	$2,2 \times 10^4$	controle
10	$3,5 \times 10^5$	controle
11	$4,0 \times 10^3$	curcumina
12	$1,9 \times 10^5$	curcumina
13	$5,5 \times 10^3$	curcumina+luz
14	$1,4 \times 10^3$	curcumina+luz
15	$1,2 \times 10^2$	Photogen [®] +luz
16	$1,6 \times 10^2$	Photogen [®] +luz

PAC03	UFC/mL	19/08/10
17	$1,7 \times 10^6$	controle
18	$1,7 \times 10^5$	controle
19	$4,3 \times 10^5$	curcumina
20	$3,2 \times 10^5$	curcumina
21	$3,4 \times 10^5$	curcumina+luz
22	$3,9 \times 10^5$	curcumina+luz
23	$2,5 \times 10^2$	Photogen [®] +luz
24	$7,5 \times 10^5$	Photogen [®] +luz

PAC04	UFC/mL	19/08/10
25	$2,1 \times 10^4$	controle
26	$4,8 \times 10^4$	controle
27	$1,4 \times 10^4$	curcumina
28	$7,0 \times 10^3$	curcumina
29	$3,5 \times 10^3$	curcumina+luz
30	$6,5 \times 10^3$	curcumina+luz
31	$6,5 \times 10^2$	Photogen [®] +luz
32	$1,0 \times 10^2$	Photogen [®] +luz

PAC05	UFC/mL	26/08/10
1	$1,85 \times 10^5$	controle
2	$2,1 \times 10^5$	controle
3	$6,45 \times 10^5$	curcumina
4	$1,2 \times 10^5$	curcumina
5	$1,2 \times 10^6$	curcumina+luz
6	$1,37 \times 10^5$	curcumina+luz
7	$8,75 \times 10^4$	Photogen®+luz
8	$5,88 \times 10^4$	Photogen®+luz

PAC06	UFC/mL	26/08/10
1	$1,87 \times 10^6$	controle
2	$7,75 \times 10^6$	controle
3	$1,85 \times 10^6$	curcumina
4	$1,27 \times 10^6$	curcumina
5	$1,3 \times 10^5$	curcumina+luz
6	$2,28 \times 10^6$	curcumina+luz
7	$7,5 \times 10^3$	Photogen®+luz
8	$1,65 \times 10^5$	Photogen®+luz

PAC07	UFC/mL	26/08/10
1	$6,5 \times 10^2$	controle
2	$1,63 \times 10^3$	controle
3	$2,18 \times 10^3$	curcumina
4	$5,25 \times 10^2$	curcumina
5	$8,25 \times 10^2$	curcumina+luz
6	$4,25 \times 10^2$	curcumina+luz
7	$6,2 \times 10^3$	Photogen [®] +luz
8	$1,0 \times 10^2$	Photogen [®] +luz

PAC08	UFC/mL	02/09/10
1	$1,68 \times 10^7$	controle
2	$1,60 \times 10^7$	controle
3	$1,38 \times 10^6$	curcumina
4	$9,5 \times 10^5$	curcumina
5	$1,8 \times 10^6$	curcumina+luz
6	$1,15 \times 10^6$	curcumina+luz
7	$9,25 \times 10^5$	Photogen [®] +luz
8	$2,70 \times 10^6$	Photogen [®] +luz

PAC09	UFC/mL	02/09/10
1	$1,30 \times 10^5$	controle
2	$1,30 \times 10^6$	controle
3	$1,02 \times 10^4$	curcumina
4	∅	curcumina
5	$2,0 \times 10^3$	curcumina+luz
6	$1,5 \times 10^2$	curcumina+luz
7	$1,78 \times 10^3$	Photogen®+luz
8	$3,0 \times 10^3$	Photogen®+luz

PAC10	UFC/mL	02/09/10
1	$9,0 \times 10^6$	controle
2	$1,18 \times 10^6$	controle
3	$1,05 \times 10^6$	curcumina
4	$1,15 \times 10^6$	curcumina
5	$6,75 \times 10^5$	curcumina+luz
6	$5,25 \times 10^5$	curcumina+luz
7	$1,18 \times 10^5$	Photogen®+luz
8	$6,25 \times 10^5$	Photogen®+luz

PAC11	UFC/mL	02/09/10
1	$2,03 \times 10^4$	controle
2	$6,25 \times 10^3$	controle
3	$2,5 \times 10$	curcumina
4	$9,25 \times 10^5$	curcumina
5	$1,1 \times 10^3$	curcumina+luz
6	$2,05 \times 10^4$	curcumina+luz
7	$5,0 \times 10^3$	Photogen [®] +luz
8	∅	Photogen [®] +luz

PAC12	UFC/mL	02/09/10
1	$1,35 \times 10^3$	controle
2	$6,0 \times 10^4$	controle
3	$3,8 \times 10^4$	curcumina
4	$8,25 \times 10^3$	curcumina
5	$2,0 \times 10^2$	curcumina+luz
6	$4,5 \times 10^3$	curcumina+luz
7	$3,75 \times 10^3$	Photogen [®] +luz
8	$1,3 \times 10^3$	Photogen [®] +luz

PAC13	UFC/mL	02/09/10
1	$1,13 \times 10^7$	controle
2	$1,1 \times 10^4$	controle
3	$4,75 \times 10^6$	curcumina
4	$1,27 \times 10^3$	curcumina
5	$7,25 \times 10^5$	curcumina+luz
6	$6,5 \times 10^2$	curcumina+luz
7	$3,4 \times 10^5$	Photogen®+luz
8	$1,05 \times 10^6$	Photogen®+luz

PAC14	UFC/mL	30/09/10
1	$1,2 \times 10^6$	controle
2	$2,3 \times 10^6$	controle
3	$3,8 \times 10^4$	curcumina
4	$3,8 \times 10^4$	curcumina
5	$1,2 \times 10^5$	curcumina+luz
6	$2,9 \times 10^5$	curcumina+luz
7	$8,5 \times 10^3$	Photogen®+luz
8	$1,1 \times 10^6$	Photogen®+luz

PAC15	UFC/mL	30/09/10
1	$9,50 \times 10^4$	controle
2	$5,20 \times 10^5$	controle
3	$2,60 \times 10^5$	curcumina
4	$1,80 \times 10^5$	curcumina
5	$1,1 \times 10^5$	curcumina+luz
6	$2,7 \times 10^4$	curcumina+luz
7	$1,50 \times 10^5$	Photogen®+luz
8	$1,40 \times 10^5$	Photogen®+luz

PAC16	UFC/mL	02/09/10
1	$4,10 \times 10^5$	controle
2	$7,80 \times 10^5$	controle
3	$4,00 \times 10^5$	curcumina
4	$2,00 \times 10^4$	curcumina
5	$7,60 \times 10^4$	curcumina+luz
6	$1,90 \times 10^5$	curcumina+luz
7	$5,00 \times 10^5$	Photogen®+luz
8	$1,20 \times 10^5$	Photogen®+luz

PAC17	UFC/mL	02/09/10
1	4,50x10 ⁶	controle
2	8,00x10 ⁷	controle
3	8,75x10 ⁶	curcumina
4	1,20x10 ⁶	curcumina
5	2,90x10 ⁶	curcumina+luz
6	5,00x10 ⁶	curcumina+luz
7	4,00x10 ⁶	Photogen [®] +luz
8	6,50x10 ⁶	Photogen [®] +luz

PAC18	UFC/mL	02/09/10
1	6,0x10 ⁶	controle
2	1,1x10 ⁸	controle
3	4,3x10 ⁵	curcumina
4	1,2x10 ⁶	curcumina
5	1,1x10 ⁵	curcumina+luz
6	1,3x10 ⁶	curcumina+luz
7	1,9x10 ⁶	Photogen [®] +luz
8	1,9x10 ⁵	Photogen [®] +luz