

CHRISTIAN GIANCARLO BERNAL RODRIGUEZ

**Avaliação da resistência adesiva à dentina tratada pela terapia fotodinâmica
em dente bovino**

São Paulo

2016

CHRISTIAN GIANCARLO BERNAL RODRIGUEZ

**Avaliação da resistência adesiva à dentina tratada pela terapia fotodinâmica
em dente bovino**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em **Odontologia (Dentística)**, para obter o título de Mestre em **Ciências**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Bernal Rodriguez, Christian Giancarlo

Avaliação da resistência adesiva à dentina tratada pela terapia fotodinâmica em dente bovino / Christian Giancarlo Bernal Rodriguez ; orientador Carlos de Paula Eduardo. -- São Paulo, 2016.

71 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Dentística). -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Terapia fotodinâmica. 2. Resistência de união. 3. Laser - odontologia. I. Eduardo, Carlos de Paula. II. Título.

Bernal CHGR. Avaliação da resistência adesiva à dentina tratada pela terapia fotodinâmica em dente bovino. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 17/01/2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Karen Müller Ramalho Eboli

Instituição: Universidade Ibirapuera Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Maria Aparecida Alves de Cerqueira Luz

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Victor Elias Arana-Chavez

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

DEDICATÓRIA

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, Luís Bernal e Rosario Rodríguez. Sem vocês, alcançar esse objetivo, assim como os outros, teria sido muito difícil ou impossível. Tive a sorte de ter pais como vocês. Vocês são meu melhor exemplo de luta no dia a dia.

Aos meus avós, Delia Chavez y Víctor Rodríguez, pelo amor infinito, pelas inumeráveis viagens que faziam a cada fim de semana somente para compartilhar conosco, seus netos.

Aos meus irmãos, Jackelynne, Víctor, Iriana, Solange, Ryan e minha sobrinha Mia Wilson, obrigado por estarem comigo à distância, dando-me calor com palavras, porque minhas melhores recordações são graças a vocês.

À Isabel Chavez, por ser a luz que ilumina meus passos.

À Anna Lídia, pelo amor com que você me ensina a ser melhor pessoa, melhor amigo e melhor namorado; por acreditar em mim, minha companheirinha. Amo você!

A Alexander Kraul, mestre e amigo. Muito obrigado pela confiança e por me guiar como um irmão maior. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Carlos de Paula Eduardo, orientador de luxo, com quem aprendi que, tudo na vida, para conseguir o sucesso necessita de comprometimento; que abriu as portas de seu escritório para escutar meus desejos de querer aprender laser; meu muito obrigado pela dedicação! Agradeço pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Karen M. Ramalho, muito obrigado pela atenção, dedicação e auxílio indispensável para a finalização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Victor Arana, pela atenção e apoio recebido. Obrigado pelo exemplo de dedicação em pesquisa.

À Professora Dra Maria Aparecida, por me acolher no seu corredor desde o primeiro dia que comecei na FOUSP, pelos ensinamentos durante os estágios práticos na graduação; aprendi muito com você.

À Professora Ana Cecilia Aranha, Obrigado pelo seu grande conhecimento nos assuntos laboratoriais e pelos inúmeros ensinamentos.

À Professora Dra. Adriana Bonamatos, pelo carinho e incentivo constante para melhorar.

À Professora Dra. Márcia M. Marques, por estar sempre disposta a esclarecer alguma dúvida, por me acolher na FOUSP .

À Professora Dra. Luciana Francisconi-dos-Rios, obrigado pela ajuda nesse processo, por esclarecer as dúvidas que sempre tinha e pela confiança depositada em mim.

À Professora Dra. Luciane Hiramatsu, pela ajuda quando sempre precisei.

À Professora Dra. Maria Ângela P. Sobral, agradeço por toda atenção e auxílio nesses dois anos de mestrado.

À Professora Dra. Patricia Freitas, muito obrigado pela ajuda nesse processo de mestrado.

Ao Professor Dr. Glauco Vieira, pela sabedoria, amizade e confiança.

À Silvia Nunez, pelo fornecimento da equipe para realizar esse projeto.

À Esther Lee, muito obrigada por você ser minha amiga, parceira e pelas valiosas contribuições para esse trabalho.

À minha parceira Maria Cecilia Cersosimo, pela força que me deu neste caminho que você já trilhou. Torna-se difícil transcrever em poucas linhas o valor da sua amizade.

À minha amiga Paula Lima, pela confiança, preocupação e ajuda nesse trabalho e outros mais.

A Hymmer Rojas, obrigado pela força. Sem você teria sido difícil conseguir esse objetivo.

Ao meu caro amigo e Professor Dr. Gustavo Tello, pelo exemplo de luta para alcançar seus objetivos; muito obrigado.

Ao caro Prof. Sérgio Manuel Jimenez Sanchez, um espetacular professor e genial amigo, que me fez conhecer o mundo do laser. Muito obrigado por todos os conhecimentos transmitidos.

À Sandra Cunha, sempre disposta a ajudar, muito obrigado por tudo.

A Mateo Guzman e Andrea Laverde, por acreditar em mim.

Aos meus amigos Robson, Bruno, Bruna, Emerson, Fernando F., Fernando I., Giullya e Daniel que me acompanharam durante esta importante etapa da minha vida profissional; valeu!

Aos meus amigos da vida Steven, Jony, Silvia, Veronica, Ricardo, Che, José e Julio; os amigos se escolhem e eu sempre escolheria vocês.

Aos meus colegas da turma do mestrado e doutorado Ana Clara Pedroni, Gabriela Abe, Camila Vieira, Luciane Kraul, Savio Bezerra, Carlos Shimokawa, Erick Mayer, Brunna Haddad, pelo carinho e amizade.

A todos os professores e funcionários da FORP-USP e Departamento de Dentística, por me auxiliarem na pós-graduação.

Às secretarias do LELO, Leni e Lili, sempre dispostas a ajudar com um sorriso.

À Glaucia, pela ajuda nesse projeto..

Aos técnicos e secretários do Departamento de Dentística. Obrigada por toda a colaboração.

A Douglas do DMC, pela ajuda com os materiais.

À CNPq, pelo auxílio de bolsa e recursos necessários para a viabilização deste estudo.

A todos os professores e funcionários da FO-USP e Departamento de Dentística, por e por me auxiliarem na pós-graduação.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

Bernal CHGR. Avaliação da resistência adesiva à dentina tratada pela terapia fotodinâmica em dente bovino [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida

A Terapia fotodinâmica (TF) é uma técnica que combina a ativação de um fotossensibilizador por luz na presença de oxigênio, produzindo radicais que induzem a morte celular dos microrganismos. Esta terapia vem sendo usada para reduzir a quantidade de microrganismos sendo um potencial antimicrobiano nos tecidos cariados em um processo restaurador direto, evitando assim o processo de cárie recidivante que pode acontecer quando não se promove a eliminação dos restos de microrganismo remanescentes após a utilização dos instrumentos rotatórios. O objetivo deste estudo *in vitro* foi avaliar a resistência de união de dois sistemas adesivos (condicionamento total e autocondicionante), sobre a superfície de dentina bovina, após tratamento com terapia fotodinâmica. Foi feito ensaio de microcisalhamento com o objetivo de avaliar a resistência de união. Para a realização da terapia fotodinâmica foi usado azul de metileno a 0,01% e duas fontes de luz diferentes, laser vermelho (660 nm) e LED (645-630 nm), com parâmetros já testados em estudos anteriores e, atualmente, utilizados na clínica odontológica. Para avaliar a resistência de união foi utilizado ensaio mecânico de microcisalhamento e, para isso, se utilizou sessenta discos de dentina, obtidos a partir de sessenta incisivos centrais bovino íntegros. Após o desgaste da dentina, as amostras foram divididas aleatoriamente em 6 grupos, sendo n=10 para o ensaio de microcisalhamento (G1: adesivo autocondicionante Single Bond Universal (USB) sem PDT, G2: PDT com laser + USB, G3: PDT com LED + USB; G4: adesivo de condicionamento total com Adper Single Bond 2 (ASB) sem PDT; G5: PDT com laser + ASB, G6: PDT com LED + ASB). Em cada amostra foram confeccionados 03 cilindros de resina composta, os quais foram submetidos à avaliação de microcisalhamento (1 mm/min); após armazenamento em saliva artificial por 24 horas. Após este teste, as amostras foram levadas em lupa estereoscópica (40x) para análise do padrão de fratura. Os resultados do teste de resistência de união foram tabulados e submetidos ao teste ANOVA dois fatores (adesivo e tratamento) e

Tukey adotando-se um nível de significância de 5%. Quanto à resistência de união, não houve diferença significativa entre os 6 grupos analisados. Houve predominância de padrão de fratura do tipo adesiva. Com base nos resultados e nos parâmetros de irradiação utilizados neste estudo, pode-se concluir que não existe alteração na força de adesão da resina na dentina hígida após tratamento com PDT.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, LED, resistência de união, laser de baixa potência.

ABSTRACT

Bernal CHGR. Evaluation of the bond strength to dentin treated by photodynamic therapy in bovine tooth [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Photodynamic Therapy (PDT) is a technique that combines the activation of a photosensitizer by light in the presence of oxygen, producing radicals that induce cell death of the microorganisms. This therapy has been used to reduce the amount of microorganisms being an antimicrobial potential in the decayed tissues in a direct restorative process, thus avoiding the process of recurrent caries that can happen when the elimination of remaining remains of microorganism after the use of the instruments is not promoted. The objective of this in vitro study was to evaluate the bond strength and morphology of the hybrid layer of two adhesive systems (Self-etch and total etch) on the bovine dentin surface, after treatment with photodynamic therapy. A micro-shear test was performed in order to evaluate the bond strength. To perform the photodynamic therapy, 0.01% methylene blue and two different light sources, red laser (660 nm) and LED (645-630 nm) were used, with parameters already tested in previous studies and currently used in the dental clinic. In order to evaluate the bond strength, a microshear bond strength test was used. For this purpose, sixty dentin disks were obtained from sixty complete central incisors. After dentin wear, the samples were randomly divided into 6 groups, with $n = 10$ for the micro bond strength test (G1: Self-etch adhesive, single bond Universal (USB) without PDT, G2: PDT with laser + USB, G3: PDT with LED + USB; G4: total etch adhesive Single Bond 2 (ASB) without PDT; G5: PDT with laser + ASB, G6: PDT with LED + ASB). In each sample, 03 cylinders of composite resin were made, which were submitted to the evaluation of micro-shear strength test (1 mm / min); after storage in artificial saliva for 24 hours. After this test, the samples were taken in a stereoscopic magnifying glass (40x) for analysis of the fracture pattern. The results of the Microshear bond strength test were tabulated and submitted to ANOVA two-factor test (adhesive and treatment) and Tukey adopting a significance level of 5%. Regarding the bond strength, there was no significant difference between the 6 groups analyzed. There was a predominance of an adhesive type fracture pattern.

Based on the results and the irradiation parameters used in this study, it can be concluded that there is no alteration in the adhesion strength of the resin in a healthy dentin after treatment with PDT.

Keywords: Photodynamic Therapy, LED, bond strength, low power laser.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
ASB	Adper Single Bond 2
MB	azul de metileno
TBO	azul de toluidina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CaCl ²	cloreto cálcio
NaCl	cloreto de sódio
KH ₂ PO ₄	dihidrogenofosfato de potássio
AlPcS ₂ /GaAs	Ftalocianina dissulfonada de alumínio/arseneto de gálio
Hz	hertz
OH	hidroxila
J/cm ²	joule(s) por centímetro quadrado
LELO	Laboratório Especial de Laser em Odontologia
Laser	Acrônimo de <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação)
LED	Acrônimo de <i>light-emitting diodes</i>
MPa	megapascal
µm	micrometro(s)
mA	miliampere(s)
mJ	milijoule(s)
mL	mililitro(s)
mL/min	mililitro(s) por minuto
mL/s	mililitro(s) por segundo
mm	milímetro(s)
mm/min	milímetro(s) por minuto
mm ²	milímetro(s) quadrado
mmol/L	milimol por litro
mW/cm ²	miliwatt(s) por centímetro quadrado
M	molar

nm	nanômetro(s)
N	newton(s)
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
PVC	policloreto de vinilo
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
PDT	Terapia Fotodinâmica
USB	Universal Single Bond
W	watt(s)

LISTA DE SÍMBOLOS

≈	aproximadamente
°C	grau(s) Celsius
λ	lambda (comprimento de onda)
%	porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DELITERATURA	25
2.1 Terapia Fotodinâmica.....	25
2.2 Fontes de Luz.....	28
2.3 Fotossensibilizadores.....	29
2.4 Adesivos.....	30
3 PROPOSIÇÃO	33
4 HIPÓTESE NULA	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 Aspectos Éticos.....	37
5.2 Delineamento Experimental.....	37
5.3 Obtenção dos discos de dentina.....	39
5.4 Protocolo de irradiação.....	40
5.4.1 <i>Terapia fotodinâmica</i>	40
5.5 Preparo das amostras para análise da resistência de união.....	42
5.6. Ensaio de Microcisolamento.....	49
5.7 Análise do padrão de fratura.....	49
5.8 Análise dos Resultados.....	50
6 RESULTADOS	51
6.1 Análise da resistência de união por meio de ensaio de microcisolamento.....	51
6.2 Análise do padrão de fratura.....	52
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

A redução de microrganismos é o principal objetivo de vários procedimentos na prática odontológica diária. Protocolos que favorecem a redução microbiana têm sido propostos como coadjuvantes ao tratamento das infecções dentais, entre eles estão os lasers de alta potência e os lasers de baixa potência associados a fotossensibilizantes, terapia conhecida como Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TF), do inglês *Photodynamic Therapy* (PDT) (Burns et al., 1995; O'Neill et al., 2002; Al-Watban; Zhang, 2005).

A utilização do PDT foi introduzida com os estudos do Raab (Raab, 1900; Machado, 2000) no início do século XX, quando observou a morte de microrganismos expostos à luz solar e ao ar em presença de alguns corantes (Zollinger, 1991, Fan et al., 1996; Wainwright, 1998; Machado, 2000; Ackroyd et al., 2001; Lee et al., 2004; Konopka; Golinski, 2007, de Souza, 2011). Esta terapia consiste na aplicação de agentes fotossensíveis que, ao interagirem com a luz do laser, liberam espécies reativas de oxigênio e radicais livres, os quais causam danos às membranas celulares bacterianas e ao DNA dos microrganismos levando a sua morte (Malik et al., 1990; Convissar, 2011). A TF apresenta várias vantagens sobre os agentes antimicrobianos tradicionais, pois não há necessidade de se aplicar altas concentrações do fotossensibilizante na área afetada como no caso de antissépticos e antibióticos (Friedlander et al, 2015). Além disso, a terapia fotodinâmica afeta exclusivamente microrganismos no sítio da deposição do agente fotossensível, não interferindo com as estruturas subjacentes sem produzir resistência bacteriana (Diniz et al., 2015; Santin et al., 2014).

Na atualidade, as resinas são partes primordiais da Odontologia Estética Restauradora; parte fundamental do sucesso é o grande avanço dos sistemas adesivos e as técnicas utilizadas na inserção das resinas e adesivos. Contudo, existem inúmeras limitações como a dificuldade de adesividade da dentina. Desta forma, a adesão ao substrato dentinário é mais crítica do que a adesão ao esmalte devido a maior quantidade dos túbulos dentinários que o torna mais permeável e aquoso (Pashley ; Carvalho, 1997; Van Meerbeek et al., 2006; Cersosimo, 2016).

Assim, para que o adesivo penetre na dentina intertubular de uma forma correta, é necessário levar em consideração as características que apresenta a

dentina (umidade dentinária, presença de smear layer, profundidade da cavidade , entre outras) prévias à restauração, sendo que a penetração da resina vai ser responsável pela maior adesão do material (Pashley, 1991). Entretanto, o excesso da umidade localizada na dentina pode afetar a introdução da resina, prejudicando a sua adesividade (Garone, 2005).

Desta maneira, as diferenças que existem entre os tipos de dentina (dentina secundária, dentina terciária) e profundidade da cavidade devem ser consideradas no momento da escolha do sistema adesivo, já que uma infiltração não controlada e inadequada nos túbulos dentinários poderia alterar o processo adesivo, promovendo alterações das restaurações (Zaygorodniy et al., 2008). São necessários estudos para avaliar técnicas que poderiam melhorar a adesividade dentinária.

Sabendo que o fotossensibilizador utilizado na terapia fotodinâmica penetra dentro dos túbulos dentinários em uma distância média de 100 nm ao liberar espécies reativas de oxigênio, além de ter uma vida média de $<0,04$ s no substrato (Moan; Berg, 1991; Diniz et al., 2015), isso poderia influenciar negativamente a força de adesão da resina ao dente. Este estudo avaliou a resistência de união de dois sistemas adesivos (condicionamento total e autocondicionante), sobre a superfície de dentina bovina, após tratamento com a terapia fotodinâmica. O presente estudo possui alta relevância clínica, devido à falta de informação e evidências científicas a respeito do tema.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Terapia Fotodinâmica

Estudos recentes sugerem que a terapia fotodinâmica (PDT) representa uma alternativa viável para redução dos microrganismos; apresentando uma terapia alternativa para os microrganismos resistentes a algumas drogas (Hamblin; Hassan, 2004; Paschoal, 2009; Nogueira et al., 2013; Melo, 2014).

A terapia fotodinâmica tem sua origem no antigo Egito, quando eles através dos efeitos fotodinâmicos conseguiram clarear seus tecidos (Kessel, 2015).

No ano 1904, Hermann Von Tappeiner introduziu pela primeira vez o termo “ação fotodinâmica”, com o objetivo de distinguir esse fenômeno biológico das reações que aconteciam nos processos fotográficos descobertos anos atrás. Entretanto, este termo só deveria ser usado para reações nas quais interagisse o oxigênio ou reações tipo II. Anos depois, Oscar Raab, orientado de Von Tappeiner observou como as células de *Paramecium caudatum* morriam ao ser expostas a luz em presença de fármacos como acridina e fenilacridina. Este pesquisador também estudou diversos tipos de corantes como eritrosina, eosina, vermelho de Grubler, fluorescina, os quais aplicados de forma tópica e sistemicamente, obtendo resultados favoráveis. No entanto, devido a alguns efeitos adversos, os estudos foram abandonados (Issa; Manela-Azulay, 2010).

O termo terapia fotodinâmica aparece pela primeira vez na literatura médica em 1941, e foi definida como a interação entre um sensibilizador no tecido alvo e presença de oxigênio com uma fonte de luz dando como resultado a morte celular em contato com o oxigênio singleto (de Souza, 2011). Na atualidade, terapia fotodinâmica é definida como uma reação entre fotossensibilizadores e luz gerando um efeito citotóxico, devido a reações oxidativas. Além disso, a terapia fotodinâmica necessita de três fatores os quais são agente fotossensibilizador, fonte de luz e o oxigênio. Isoladamente, nenhum desses fatores vão ter a capacidade de produzir algum efeito no sistema biológico (Allison et al., 2005, 2006; Konopka; Golinski, 2007; Wilson, 2004; Tessaroli, 2010).

Diante disso, ela funciona através de dois tipos de reações físico-químicas: reações do tipo I e reações do tipo II. Na reação do tipo I o agente

fotossensibilizador interage diretamente com o substrato orgânico e outras moléculas que se encontram ao redor (essencialmente O_2), resultando na produção de íons radicais, os quais a maioria vai interagir com o O_2 , dando como resultado compostos complexo reativos de oxigênio como são anión superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais tem a capacidade de oxidar várias biomoléculas. Além disso, nas reações do tipo II ocorre a formação do oxigênio singleto por meio de uma transferência de elétrons do fotossensibilizador no estado tripleto excitado para o estado tripleto fundamental de oxigênio (Torezan, 2000; Lui; Bissonete, 1999; Nelson et al., 1997; Freitas; Baronzio, 1991; Kennedy; Pottier, 1992; Marthy et al., 1990; Roberts; Cairnduff, 1995; Tromberg et al., 1990, Tessarolli, 2010). O oxigênio singleto tem a capacidade de atuar em aminoácidos, lipídeos insaturados e ácidos nucleicos, ocasionando alterações na permeabilidade celular o qual pode provocar uma morte do tecido via necrose ou apoptose por meio de uma reação fotooxidativa.

Wilson et al., no ano 1992 realizaram os primeiros trabalhos de PDT em bactérias orais, com a finalidade de encontrar compostos químicos que pudessem ser utilizados como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica. Os pesquisadores testaram 27 compostos dos quais 16 tinham a capacidade de provocar morte no *S. Sanguis* associados a um laser HeNe (Hélio Neônio). Dentro todos compostos analisados, os mais efetivos foram o cristal de violeta, dihematoporfina ester, alumínio dissulfonado, azul de metileno, azul de toluidina; ; sendo que os dois últimos compostos mostraram-se eficazes na redução de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Prates et al., 2008; Wilson et al., 1992; Wainwright, 2004; Munin et al., 2007; de Almeida et al., 2008; Machado, 2013).

Dobson e Wilson (1992) conseguiram a redução dos microrganismos *A. Actinomycetemcomitans*, *F. Nucleatum*, *P.gingivalis* e *S. Sanguis*. com o uso do laser HeNe (densidade de energia de $16,5 J/cm^2$) associado ao azul de metileno numa concentração de 0.005% e densidade de energia de $16,5 J/cm^2$.

Burns et al. (1993) observaram que as bactérias *S. Mutans*, *S. Sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* eram sensíveis ao PDT com laser HeNe/TBO ou laser AsGaAl/AIPcS.

Burns et al. (1995) estudaram o efeito do PDT sobre os *S. Mutans* em fatias de dentina humana observando a eficácia da terapia fotodinâmica sobre estes microrganismos, mesmo em fatias de dentina desmineralizada.

Pesquisadores observaram uma eficiência terapia fotodinâmica em bactérias do biofilme dental, sendo que o laser TBO/HeNe foi mais efetivo do que AIPcS₂/GaAs (ftalociacina dissulfonada de alumínio/arseneto de gálio) na eliminação de bactérias anaeróbicas, *Streptococos* e *Actinomyces* (Wilson et al., 1995). O mesmo grupo de pesquisa também demonstrou que esta terapia pode ser utilizada para a redução do *S. Sanguis*.

Em 2002, Zanin et al. realizaram um estudo na saliva, tratada com terapia fotodinâmica chegando à conclusão que os *S. Mutans* eram eliminados em sua totalidade, enquanto os restos de estreptococos só foram parcialmente eliminados, chegando à conclusão que o PDT tem um efeito sobre bactérias mais patogênicas mantendo assim a microbiota residente.

O'Neill et al. (2002) estudaram biofilmes com aproximadamente 9×10^9 células bacterianas observaram que uma redução de 97,4% desses microrganismos após utilização do laser com 31,5 J, associado ao azul de toluidina na concentração de 25 mg/mL (Guglielmi, 2009)

Diniz et al. (2015) avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica utilizando o laser diodo InGaAlP (660nm, 40 mw, 0,04 cm², a uma distância de 1 cm, densidade de energia de 60J/cm², com tempo de irradiação de 5 minutos e uma energia total de 2,4J) associado com a solução de azul metileno na concentração final de 0,025g/mL em lesões de cáries induzidas pelo *S. Mutans*. O resultado mostrado neste estudo demonstrou a efetividade do PDT na eliminação de 81.01% das bactérias.

Baptista et al. (2012) induziram lesões cariosas com *S. Mutans* em dentes de ratos e avaliaram a eliminação dessas bactérias, através da terapia fotodinâmica usando uma luz de diodo (LED) (645 ± 30 nm, 240 mW, uma área de irradiação de 0,5 cm²), com um fotossensibilizador (azul de metileno numa concentração de 100 uM). O tempo de pré-irradiação foi de 5 minutos para logo depois ser irradiado por 3 minutos na lesão. Os resultados desta pesquisa *in vivo* demonstrou a redução da colônia de bactérias em uma porcentagem de 97.4%, e também se observou que não existiu retorno ao valor inicial da contagem de colônias de bactérias de *S. Mutans*.

Guglielmi (2009) realizaram um estudo clínico com 23 pacientes selecionados na Universidade de São Paulo, os quais apresentavam cáries dentinárias ativas e avaliaram a resistência dos *S. Mutans* e o *Spp. Lactobacilos* à terapia fotodinâmica. Um total de 26 dentes com dentina cariada, foram selecionados e tratados com o PDT usando os parâmetros de irradiação do laser Diodo (InGaAlP), com comprimento de onda de 660 nm, área de irradiação de 0,028 cm², uma potência de 100 mW, densidade de energia de 320 J/cm⁻², tempo de exposição de 90 segundos e uma energia total de 9J. O azul de metileno foi utilizado em uma concentração de 0,01%, com um tempo de irradiação de 90s dando por resultado uma diminuição em torno de 78% para ambos microrganismos.

Araújo et al. (2014) realizaram um estudo *in vivo* e avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica utilizando luz halógena e azul de metileno na concentração de 100 mg/L, em lesões de cáries (tempo da pré irradiação: 5 minutos, com intervalo de 20 segundos, tempo de irradiação: 1 minuto durante 30 segundos). Desta forma, estes autores evidenciaram uma redução de *S. Mutans*, demonstrando também que a terapia fotodinâmica promove uma redução dos microrganismos responsáveis pela cárie dentária.

2.2 Fontes de Luz

Na terapia fotodinâmica é indispensável três fatores principais os quais são uma fonte de luz, um corante utilizado como fotossensibilizador e oxigênio. As primeiras fontes de luz utilizadas no PDT foram lâmpadas convencionais, que tinham como característica principais uma luz não coerente e policromática que podiam apresentar um componente térmico (Paschoal, 2009). Com o avanço da tecnologia laser, se obteve uma luz monocromática com um único comprimento de onda, densidade de energia, dose de radiação controláveis e sistema de radiação que utiliza fibras ópticas para facilitar a irradiação do tecido alvo (Paschoal, 2009).

Atualmente, na terapia fotodinâmica são utilizadas duas fontes diferentes de luz, as quais são a luz LED (*light-emitting diodes*) e luz LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). A diferença principal entre essas duas luzes, é que na luz LED existe uma predominância na emissão espontânea da radiação e na

luz LASER predomina a emissão estimulada. Desta forma, os dispositivos LASER possui a capacidade de gerar luz coerente, colimada e monocromática, essas características possibilitam um melhor desempenho que a luz LED. A luz LASER necessita de grande quantidade de energia para gerar luz quando comparado com a luz LED. Entretanto, a luz LED apresenta um espectro de luz não-colimada e não-coerente, sendo parecido com as fontes de luz halógena. Esta luz também apresenta ondas monocromáticas maiores devido a suas ondas de comprimento estreito (de Souza et al., 2006; de Souza et al., 2008; de Souza, 2011; Baptista et al., 2012)

Alguns estudos que obtiveram resultados satisfatórios utilizando as duas fontes de luzes na PDT (Baptista et al., 2012; Diniz et al., 2015).

No entanto, a interação da luz LASER e células bacterianas dependem de alguns fatores inerentes aos dois como comprimento de onda, produção de energia do laser, tempo de exposição, diâmetro do feixe, densidade de energia e o modo de operação do laser; natureza da bactéria e estado fisiológico do organismo (Bourre et al., 2010; Wainwright et al., 2011).

2.3 Fotossensibilizadores

Atualmente vem sendo usados corantes roxos, marrons e verdes na PDT, porém os mais empregados são o corante azul de toluidina (AT) e o azul de metileno (MB), esse último tem demonstrado que é um fotossensibilizador efetivo para diversas bactérias incluindo as presentes na cavidade oral (Tardivo et al., 2005). Este último corante é composto quimicamente pelo cloreto de 3,7 bis (dimetilaminofenotiazina) ou também pelo cloreto de metiltionínio; a banda de absorção varia entre 500 e 700 nm, sendo que o pico de absorção máxima acontece em dois pontos os quais são 609 e 668 nm, que varia dependendo do tipo, quantidade de solvente empregado e da concentração do corante na solução (Tardivo et al., 2005; Budavari, 1996; Núñez, 2007; Machado, 2013).

Como dito anteriormente, a terapia fotodinâmica necessita de uma fonte de luz, e de um fotossensibilizador, pois o tratamento realizado somente com laser ou corante não produzem efeito antimicrobiano.

O fotossensibilizador deve apresentar propriedades fotofísicas e fotoquímicas específicas como seletividade pela célula alvo, boa absorção e ótima reposta biológica (Wainwright et al., 2011; Sharma et al., 2011).

Assim, quando o corante é exposto a uma fonte de luz seja LED ou LASER, este gerará uma cadeia de reações dentro da célula alvo que resultará na morte celular.

Entretanto para que aconteça essa reação, o corante e o comprimento de onda do LASER ou luz LED tem que ser compatíveis, apresentar mínima toxicidade e alta absorção. Desta forma, isoladamente a luz e o corante não apresentam efeito tóxico na célula, assim só as células que apresentarem o fotossensibilizador e tiverem sido irradiadas serão afetadas pela terapia fotodinâmica.

2.4 Adesivos

O sucesso de uma adesão dentinária vai depender de vários fatores, como a complexidade da morfológica dentinária, componentes do adesivo e técnica de manipulação do adesivo. A adesão ocorre no substrato dentinário através de uma retenção micromecânica do agente adesivo juntamente com a infiltração de seus monômeros resinosos pelos túbulos e canalículos dentinários, que quando polimerizados ficam micromecanicamente retidos nas porosidades e na trama colágena, formando a camada híbrida (Cersosimo, 2016; Pashley, 1991; Perdigão, 2010).

No entanto, para obter uma infiltração dos monômeros resinosos de maneira satisfatória, é necessário remover e eliminar a camada de esfregaço (*smear layer*), que foi formada pelos restos de dentina removida e instrumentos rotatórios utilizados no preparo cavitário com a finalidade de desobstruir os túbulos dentinários obliterados pela camada de esfregaço (Pashley; Carvalho, 1997).

Atualmente, a remoção da camada de esfregaço é realizada através condicionamento ácido da superfície. É utilizado ácido fosfórico a 37%, que pode ser usado isoladamente ou com adesivos que tenham o ácido fosfórico em menor concentração (Cersosimo, 2016; Pashley; Carvalho 1997).

No mercado, podem ser encontrados inúmeros sistemas adesivos, sendo os mais utilizados os que precisam de condicionamento prévio (total-etching ou etch-

and-rise) ou os adesivos autocondicionantes (self-etching). No entanto, o sistema adesivo de condicionamento prévio aumenta a permeabilidade dentinária pela remoção da camada de esfregaço, expondo as fibras colágenas e tornando mais receptiva a retenção micromecânica. Porém, esta técnica é bastante sensível, necessitando de cuidados durante remoção do ácido, lavagem e secagem, evitando o ressecamento da dentina e consequente colabamento das fibras colágenas (Cardoso et al., 2011; Giannini et al., 2015).

Nos adesivos do tipo autocondicionante o primer possui ácidos fracos com capacidade para dissolver o smear layer e desmineralizar a camada subjacente da dentina, permitindo a infiltração do mesmo nos túbulos dentinários. Entretanto, o smear layer não é removido ficando incorporado à interfase adesiva, pois esse sistema dispensa da lavagem dos ácidos e a secagem da superfície; desta forma, reduz a sensibilidade da técnica por prevenir o possível colabamento das fibras de colágeno durante a secagem da superfície e as consequentes falhas na adesão da restauração (Cardoso et al., 2011; Giannini et al., 2015; Cersosimo, 2016).

Van Meerbeek et al. (2003 a,b) concluíram que o modo de preparo da superfície dental antes dos procedimentos adesivos influenciam significativamente na efetividade dos sistemas de condicionamento prévio e autocondicionantes, demonstrando a importância de se utilizar uma técnica eficaz durante o preparo cavitário.

Os adesivos utilizados neste estudo so os mais usados pelos cirurgãos dentistas dentro da pratica clinica diária.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vitro* tem como objetivo avaliar a resistência de união de dois sistemas adesivos (autocondicionante e condicionamento total) na dentina de dentes incisivos bovinos, após a realização da terapia fotodinâmica (PDT).

4 HIPÓTESE NULA

A terapia fotodinâmica, quando utilizado previamente ao tratamento restaurador, altera negativamente o processo de adesão da resina composta em dentina hígida.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

Previamente ao início do estudo, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (**CEUA**) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (Anexo A), sendo considerado aprovado (Protocolo Nº 040/2015). Foram utilizados 60 incisivos centrais bovino inferior, cedidos pelo Frigorífico Mondelli, os quais foram utilizados para a realização dos testes preliminares, piloto e principal. Essa pesquisa não teve conflitos de interesses com as instituições que se propuseram a doar os materiais para a realização da mesma (3MESPE. DMC).

5.2 Delineamento Experimental

O estudo avaliou a resistência de união entre superfícies de dentina bovina tratadas com diferentes protocolos de terapia fotodinâmica e dois tipos de sistemas adesivos, por meio de ensaio de microcisalhamento (n=10) após 24 h de armazenamento.

A análise do padrão de fratura também foi realizada. O delineamento experimental foi organizado como descrito no quadro 5.1. Os Fatores de variação foram organizados no quadro 5.2. e os grupos foram descritos no quadro 5.3.

Quadro 5.1 – Delineamento experimental

Delineamento experimental	
Unidades experimentais	<p>60 amostras de dentina bovina</p> <ul style="list-style-type: none"> 60 amostras de dentina bovina para o estudo de microcisolhamento . <p>(n=10) análises de microcisolhamento</p>
Variável de resposta	<p>Quantitativa: Resistência de união (Ensaio de Microcisolhamento)</p> <p>Análise do padrão de fratura</p>

Quadro 5.2 – Fatores de variação

Fatores de variação	Tipo de adesivo	2 níveis	Autocondicionante
			Condicione e lave
	Terapia Fotodinâmica (PDT)	2 níveis	PDT com LASER
			PDT com LED
		Sem PDT	

5.3 Obtenção dos discos de dentina

Foram utilizados 60 (sessenta) dentes incisivos bovinos recém extraídos, cedidos pelo frigorífico Mondelli, sessenta dentes utilizados no estudo propriamente dito e 12 destinados ao estudo piloto.

Os dentes permaneceram armazenados em solução de cloramina T a 0,5%, sob refrigeração (4°C), por um período máximo de três meses após a data de extração (Manhães et al., 2005). A limpeza dos dentes foi realizada com a utilização de curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e o polimento com pedra pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água, com o auxílio de escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação, seguidas de lavagem com água destilada (Manhães et al., 2005).

Os dentes foram seccionados na junção amelo-cementaria (corona-raiz) com uma máquina de corte de alta precisão (Isomet 100TM-Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) para separar a coroa da raiz. Em seguida, a parte interna das coroas foram limpadas com a utilização de curetas periodontais (Duflex, SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e pedra pomes (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e água com o auxílio de escovas tipo Robinson (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) em baixa rotação, seguidas de lavagem com água destilada (Manhães et al., 2005). Após a limpeza, as coroas híginas foram armazenadas sob refrigeração a 4°C em água destilada até o momento da sua utilização. Ao final, as raízes foram guardadas para estudos posteriores.

As faces vestibulares das coroas foram fixadas em lâminas de cera (Polidental, Cotia, SP, Brasil) e envolvidas individualmente por tubos de PVC $\frac{3}{4}$ (Tigre S. A. Tubos e conexões, Joinville, SC, Brasil) com 15 mm de altura e 25 mm de diâmetro centralizando-se cada coroa dental nos tubos. Posteriormente, uma mistura de resina epóxica (Redelease, São Paulo, SP, Brasil), a qual apresenta baixa liberação de calor durante sua polimerização, foi vertida no interior dos tubos.

Após a polimerização da resina, foram desgastadas as superfícies vestibulares das coroas incluídas (cilindros) em uma máquina Politriz (Ecomet 3 - Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA) sob refrigeração com água, em baixa velocidade (300 rpm) com lixas abrasivas de carbeto de silício (Buehler Ltd, Lake Buff, IL, EUA) nº 120, e com peso de 320g sobre os cilindros, o que proporcionou um desgaste

uniforme e paralelo da superfície, até a exposição de dentina. Em seguida lixas nº240, nº400 e por fim a nº600, para padronizar a camada de *smear layer* também por 1 minuto. Entre cada troca de lixa as amostras foram lavadas em cuba ultrassônica com água destilada, de forma a remover os grãos da lixa anterior.

Após o desgaste e polimento da superfície, as amostras foram avaliadas em microscópio estereoscópico (Olympus, Tóquio, Japão) com aumento de 25x, com o objetivo de verificar possíveis trincas ou alterações que pudessem comprometer a metodologia selecionada para este estudo (Figura 5.1A).

As amostras foram, então, divididas aleatoriamente entre os grupos descritos no quadro 5.3.

Quadro 5.3 – Distribuição das amostras e seus respectivos grupos

Grupos	Discos de dentina (n)
Adesivo Autocondicionante (USB)	
G1: Controle USB, sem PDT	10
G2: USB+PDT com LASER	10
G3: USB+PDT com LED	10
Condicionamento Total (ASB)	
G4: Controle ASB, sem PDT	10
G5: ASB+PDT com LASER	10
G6: ASB+PDT com LED	10
Total de amostras	60

5.4 Protocolo de irradiação

5.4.1 Terapia Fotodinâmica

Das 60 amostras feitas, 40 foram tratadas com PDT. Primeiro aplicou-se fotossensibilizador azul de metileno à 0,01% (Chimiolux 5, DMC Equipamentos, São

Carlos, SP, Brasil) (Lote 11493) por 5 minutos (Figura 5.1B) (tempo de incubação ou de pré-irradiação), após esse período foi aplicado uma fonte de luz sobre o gel. Nos grupos G2 e G3 foi aplicado laser de diodo (Photon laser, DMC Equipamentos, São Carlos, SP, Brasil) (Figura 5.2A), com comprimento de onda de 660 nm, área do feixe de 0,028 cm², potência 100mW, densidade de energia de 320 J/cm², exposição de 90s, e a energia total de 9 J (Guglielmi et al., 2011). Já nos grupos G5 e G6, também submetidos a PDT, foi usada uma fonte de luz LED (MMOPTICS, São Carlos, SP, Brasil)(Figura 5.3A) com comprimento de onda de 645-630 nm, área do feixe 0,5 cm², potência 240mW, e tempo de exposição de 180s (Figura 5.3B) (Baptista et al., 2012) . Terminada a irradiação, o azul de metileno foi removido da superfície com jato de água por 30 segundos.

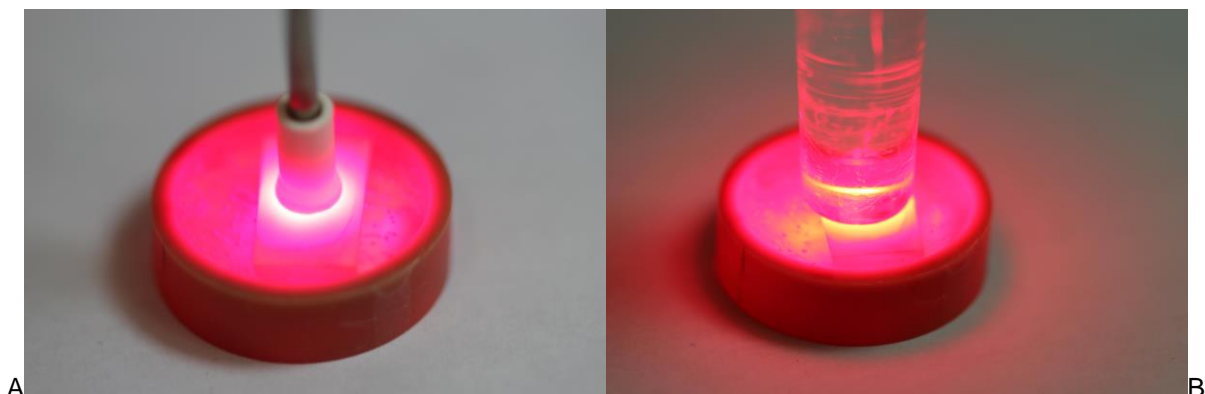
Figura 5.1 – (A) Dentina hígida incluída em resina (B) Dentina hígida com azul de metileno (pré irradiação: 5 minutos).



Figura 5.2- (A) Laser Photon Lase III LELO, FO-USP, Pat. 023.016888). (B) Prototipo LED 630 (Propriedade da Dra. Silvia Núñez)



Figura 5.3 – (A) PDT com Laser vermelho. (B) PDT com luz LED



5.5 Preparo das amostras para análise da resistência de união

Após os diferentes tratamentos das superfícies de dentina hígida, foram recortados fragmentos de fita adesiva dupla face ácido-resistente (Tectape, Manaus, AM, Brasil) de 0,05 mm de espessura e dimensões suficientes para recobrir toda a superfície da dentina exposta. Em cada fragmento de fita foram realizadas 3 perfurações circulares com 1,0 mm de diâmetro (Figura 5.4A), utilizando-se um perfurador de lençol de borracha (Modelo Ainsworth, Wilcos do Brasil Indústria e

Com. Ltda., Petrópolis, RJ, Brasil). Uma das faces adesivas da fita foi aderida à superfície da dentina, delimitando-a com circunferências de 1,0 mm de diâmetro (Figura 5.4B). Estes procedimentos foram realizados conforme descrito por Shimaoka e colaboradores (2011) (Figura 5.4C).

Nas amostras dos grupos G1, G2 e G3 foram aplicados um sistema adesivo autocondicionante (Adper Single Bond Universal, 3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) seguindo o tempo de aplicação e polimerização do adesivo conforme as instruções do fabricante, com auxílio de pincel fino (Cavibrush, FGM, Joinville, São Paulo, Brasil). Para cada amostra foi utilizado um novo pincel, de forma a evitar excessos de adesivo sobre a superfície (Figura 5.5A).

Já as amostras dos grupos G4, G5 e G6 tiveram suas dentinas tratadas condicionadas com ácido fosfórico a 37% (Conduct 37 FGM, Joinville, São Paulo, Brasil) (Figura 5.6) por 10 segundos e então lavadas abundantemente com água por mais 10 segundos e secas com papel absorvente de forma a evitar a desidratação da dentina. Foi, em seguida, aplicado um sistema adesivo de frasco único (Adper Single Bond 2, 3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) (Figura 5.5B). seguindo o tempo de aplicação e polimerização do adesivo conforme as instruções do fabricante, com auxílio de pincel fino (Cavibrush, FGM, Joinville, São Paulo, Brasil). Para cada amostra foi utilizado um novo pincel, de forma evitar excessos de adesivo sobre a superfície.

A fotoativação dos sistemas adesivos foi realizada com um aparelho fotopolimerizador de luz halógena (modelo Optilux, Demetron Research Corporation), com potência de 450 mW/cm^2 , mensurada com uso de radiômetro (Demetron Research Co., Danbury, CT, EUA) ao início e cada dia experimental (Figura 5.10)

Em seguida, um microtubo de silicone (Tygon, Norton Performance Plastic Co, Cleveland, OH, EUA) com diâmetro interno de 1,0 mm e 0,5 mm de altura foi utilizado como matriz para a construção dos corpos de prova e posicionados de forma que seu diâmetro interno coincidiu com a perfuração da fita. Após o posicionamento dos 3 tubos em cada amostra, estas foram preenchidas com resina composta fotopolimerizável, na cor A3 (Filtek Z350XT, 3M, Sumaré, São Paulo, Brasil) com o auxílio de uma sonda *ballpoint*, também conhecida como sonda CPI (Trinity® Periodontia, São Paulo, SP, BR).

Após o preenchimento dos tubos plásticos, os excessos de resina foram removidos com o auxílio de uma espátula número 1, com subsequente fotoativação por 20 segundos. Após a fotoativação, os tubos de silicone foram removidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi (Embramed, Jurubatuba, SP, Brasil) e todos os espécimes foram observados em lupa estereoscópica com aumento de 40x para a certificação da ausência de defeitos na interface de união. Os corpos de prova foram, então, armazenados em saliva artificial (Pashley et al., 2004) à temperatura de 37°C, em estufa por 24 h antes de serem submetidos ao ensaio mecânico de microcisalhamento. A saliva artificial utilizada para o armazenamento das amostras foi manipulada em laboratório, com a seguinte composição: CaCl₂ (0,7mmol/L), MgCl₂.6H₂O (0,2mmol/L), KH₂PO₄ (4,0 mmol/L), KCl (30 mmol/L), NaN₃ (0,3 mmol/L), HEPES buffer (20 mmol/L). Os espécimes sem falhas foram submetidos ao ensaio de microcisalhamento.

Figura 5.4- (A) Confeção dos cilindros de resina para teste microcisalhamento. (B) Cilindro de resina confeccionada para teste de microcisalhamento. (C) Cilindros de resina para teste de microcisalhamento.

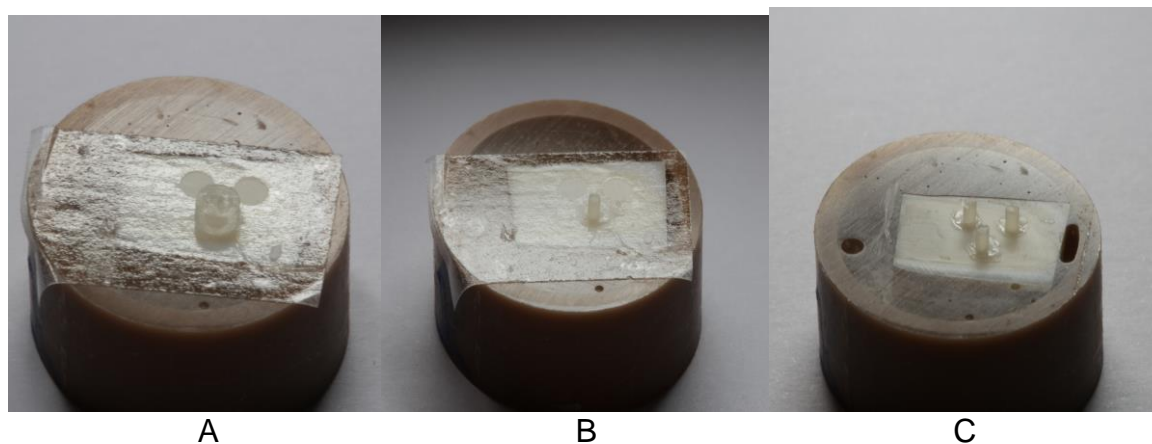


Figura 5.5 - (A) Adesivo do tipo autocondicionante (3M ESPE). (B) Adesivo do tipo condicione e lave (3M ESPE).



Figura 5.6- Ácido fosfórico na concentração 37% (FGM)

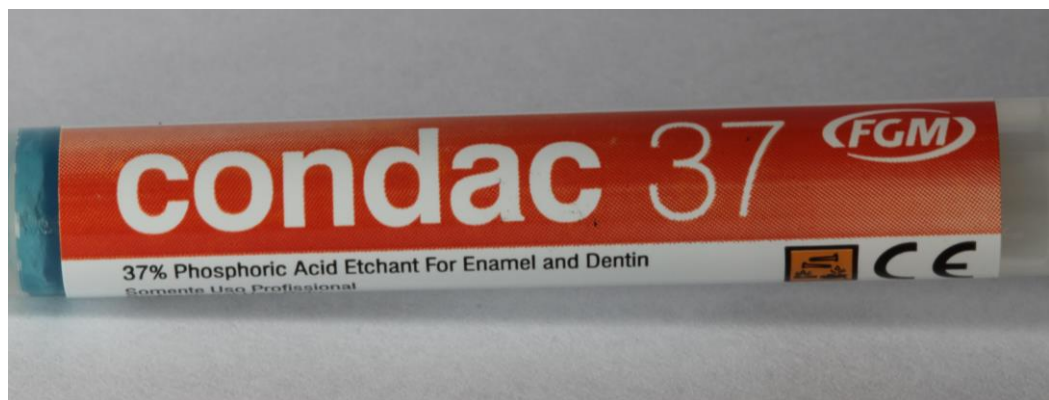
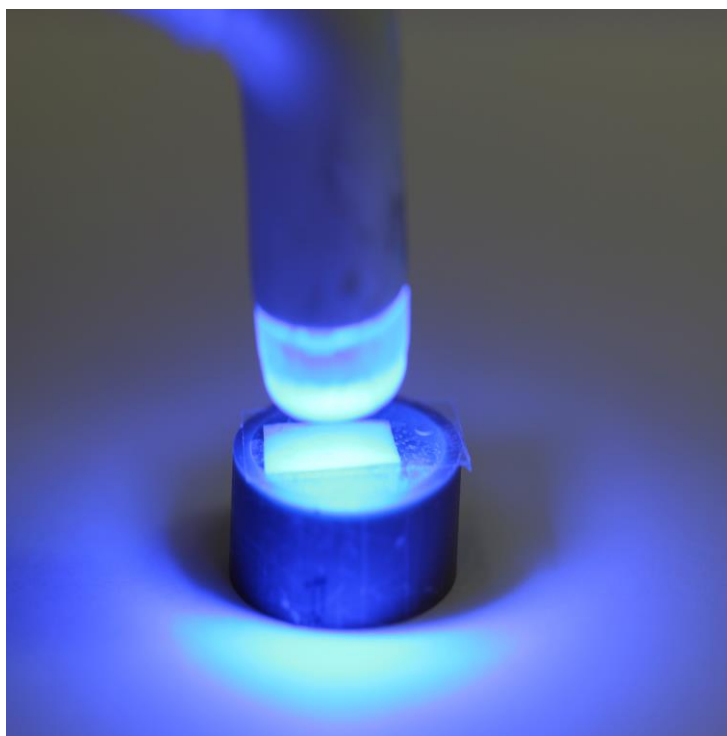


Figura 5.7 - Fotopolimerização do adesivo



Quadro 5.4 - Composição química e modo de aplicação dos materiais utilizados no processo da restauração

Nome do Produto	Fabricante	Composição	Aplicação	Lote
Adper Single Bond Universal	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA.	MDP, BisGMA, HEMA, dimetacrilatos, etanol, água, fotoiniciador e um copolímero funcional de metacrilato de ácido poliacrílico, polialcenóico e silano.	Aplicar diretamente sobre dentina de forma ativa durante 20 segundos e logo um leve jato de ar por 5 segundos, fotopolimerização durante 10 segundos	612979
Adper Single Bond 2	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA	BisGMA, HEMA, diemtacrilatos, sílice, etanol, água, fotoiniciador e um copolímero funcional de metacrilato de ácido poliacrílico e ácido poliacetácico	Aplicar diretamente sobre dentina de forma ativa durante 20 segundos e logo um leve jato de ar por 5 segundos, fotopolimerização durante 10 segundos	N706901
Filtek Z350XT	3M ESPE, St. Paul, MN, EUA.	Bis-GMA, UDMA, bis-EMA e partículas de zircônia sílica com tamanho meio de 0,6 mm.	Aplicar incrementos de resina de no máximo 2,5 mm de espessura e fotopolimerizar 20 s cada.	525232
Condac 37	FGM, Joinville, São Paulo, Brasil	Ácido fosfórico a 37%, espessante, corante e água deionizada	Aplicar sobre a dentina 10 segundos, após aplicação remover totalmente o ácido da superfície dental com abundante água.	020915

5.6 Ensaio da Microcislamento

Os espécimes foram adaptados ao dispositivo para execução do teste de microcislamento em máquina de ensaio universal (Instron 5942, Canton, MA, EUA)(Figura 5.8). Um fio metálico de 0.2 mm de diâmetro em contato com a base inferior dos cilindros laçou se simultaneamente esse cilindro e o prolongamento da célula de carga, sendo então realizado o ensaio de microcislamento com velocidade de 1 mm/min e carga e 50N. Os valores de carga máxima suportada pela interface dentina/material restaurador foram obtidos em Newton e posteriormente convertidos a Mega Pascal (MPa), dividindo-se a força máxima atingida no momento da fratura (N) pela área da interface adesiva (1mm²).

Figura 5.8 - Máquina de ensaio universal- Instron (FO-USP, Dpto. Dentística; Patrim. N. 023.012889)



5.7 Análise do padrão de fratura

Após a realização do teste de microcislamento, todos os corpos-de-prova foram corados através da imersão no corante Ponceau S a 2%, por 5 minutos, para a observação do tipo de fratura ocorrido entre as restaurações de resina e a dentina com os diferentes tratamentos de superfície (da Cunha et al., 2016). Os espécimes foram lavados em água por 10 minutos e secos à temperatura ambiente, para em

seguida serem montados em lâminas de vidro de maneira que as superfícies a serem analisadas fiquem posicionadas paralelamente à lente da Lupa Estereoscópica (Citoval 2- Carl Zeiss-Jena, Alemanha), com aumento de 20x. A interface de comunicação entre o espécime e o computador foi constituída pela lupa estereoscópica acoplada a uma câmara de vídeo (Digital Hyper HAD – Sony, Tóquio).

A imagem foi captada através da placa de aquisição de imagem Captvator e pelo “software” de captação de imagem VideCap32 (Windows, Washington, EUA). Para o processamento das imagens foi utilizado o programa ImageLab 2000 (Canborough, Ontário, Canadá), o qual tem a capacidade de calcular a área das imagens pelo número de pixels que estas apresentam, sendo possível então calcular a área em porcentagem de cada tipo de falha ocorrido em cada extremidade fraturada, tanto do lado da resina composta quanto do lado da dentina. O tipo de fratura foi classificado como: Tipo I (adesiva), rompimento apenas na interface adesivo/dentina ou esmalte; Tipo II (coesiva em dentina), rompimento da estrutura dentinária; Tipo III (coesiva em resina composta), rompimento na resina composta; Tipo IV (mista): presença de falha adesiva e coesiva em dentina ou esmalte/adesivo e ou resina composta.

5.8 Análise dos Resultados

Os resultados do teste de resistência de união foram tabulados e submetidos ao teste ANOVA dois fatores (adesivo e tratamento) e Tukey adotando-se um nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Análise da resistência de união por meio de ensaio de microcissalhamento

Inicialmente foi realizada a avaliação da normalidade e homogeneidade dos dados. Através dessa avaliação obteve-se que a distribuição das amostras foi normal e homogênea ($p < 0,05$).

Os valores obtidos em cada tipo de substrato (dentina hígida sem tratamento de PDT e com tratamento) foram analisados por teste de ANOVA, seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey.

Verificou-se que não teve diferença estatisticamente significativa entre os seis grupos experimentais (Tabela 6.1). As dentinas híginas tratadas com PDT tiveram desempenho igual às dentinas híginas sem tratamento do PDT.

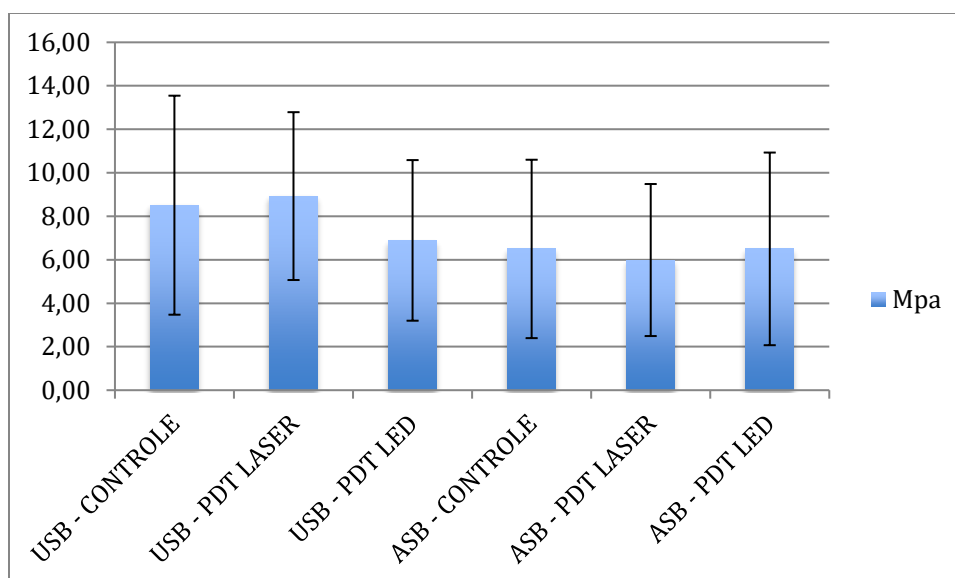
Em relação aos grupos adesivos, observou-se que os três grupos nas quais usou-se Single Bond Universal tiveram desempenho superior em dentina em comparação aos grupos nas quais usou-se Adper Single Bond 2 (Gráfico 6.1).

Tabela 6.1- Média dos valores de resistência de união (MPa) com os respectivos desvios padrão

	Sem PDT	PDT LED	PDT Laser
Single Bond Universal	8,5(5,04)	6,9(3,69)	8,9(3,86)
Adper Single Bond 2	6,5(4,10)	6,5(4,43)	6,0(3,50)

* Média(DP)

Gráfico 6.1- Valores de resistência de união (MPa) com os desvios padrão



6.2 Análise do padrão de fratura

Tanto na dentina sem tratamento de terapia fotodinâmica como os tratados com terapia fotodinâmica com laser e led no grupo do adesivo Adper Single Bond 2, o padrão de fratura predominante foi a falha adesiva, sendo que falhas mistas ocorreram nos três grupos e apenas no grupo que foi feito o PDT com laser foram verificadas, também, fraturas do tipo coesiva em resina (Figura 6.1).

No grupo do Universal Single Bond a dentina sem tratamento do PDT como a dentina submetida, também houve uma predominância de fraturas adesivas e uma pequena quantidade de fraturas mistas para os três grupos (Figura 6.3-6.4).

Em nenhum dos grupos foram observadas fraturas coesivas em dentina.

Figura 6.1 - Representação gráfica da predominância, em porcentagem, dos tipos de fratura em cada grupo experimental

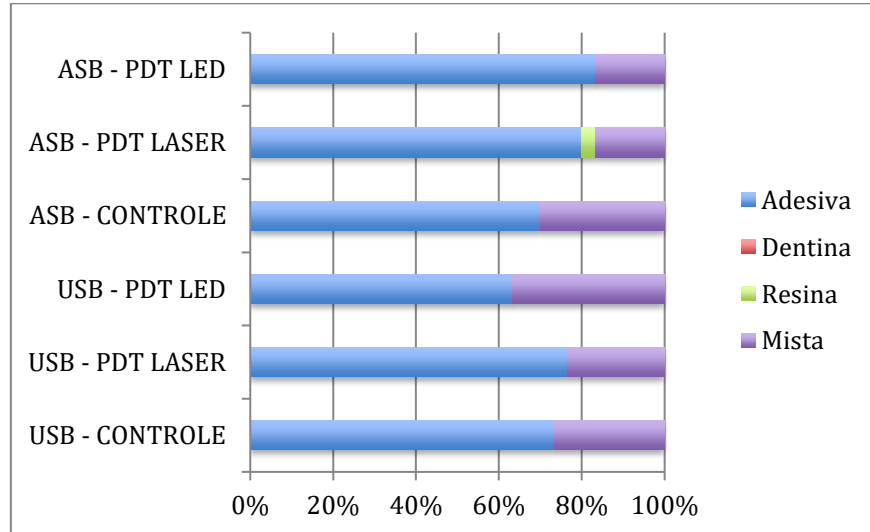


Figura 6.2- Imagem do padrão de fratura com falha em resina

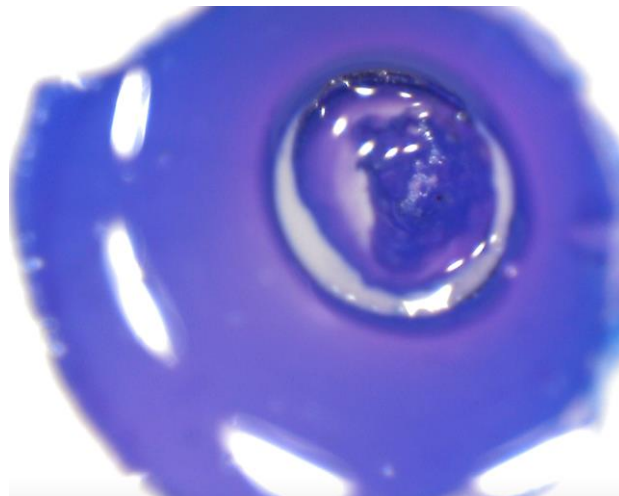


Figura 6.3- Imagem do padrão de fratura com falha adesiva

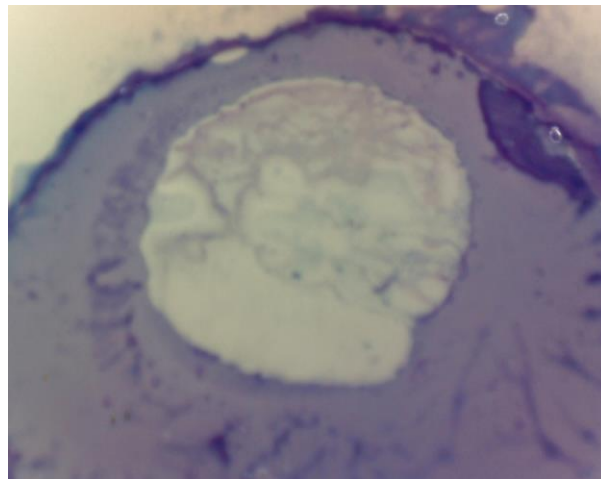
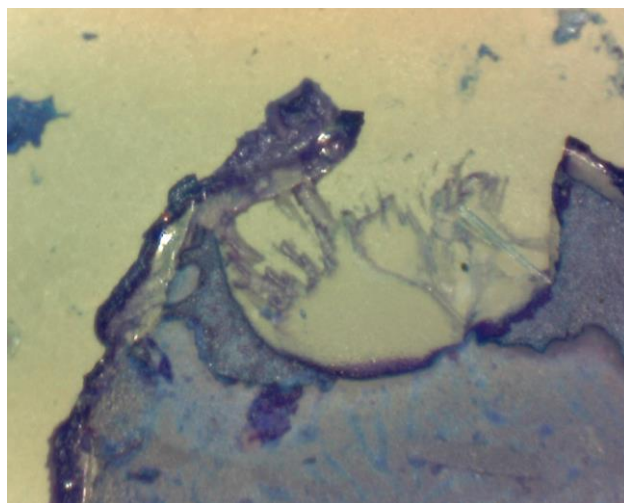


Figura 6.4 - Imagem do padrão de fratura com falha mista



7 DISCUSSÃO

O tratamento restaurador direto, em lesões de cárie profunda (que já atingiram a dentina), associado à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é uma técnica vantajosa em muitos aspectos. Considerando-se que a remoção da dentina infectada é subjetiva (Zhegova et al., 2014) em uma lesão mais profunda a variação na remoção do tecido pode ser o ponto crítico entre um tratamento conservador e uma exposição pulpar (Friedlander et al., 2015).

Embora a discussão acerca da melhor terapêutica para lesões de cárie seja antiga e perdure até a atualidade, a literatura parece suportar suficientemente a idéia da máxima preservação dos tecidos dentários envolvidos (Melo, 2014).

Dentro desse contexto, a terapia fotodinâmica é segura quanto à descontaminação tecidual e não agride o tecido dental e estruturas adjacentes (Diniz et al., 2015). Autores já demonstraram em estudos *in vitro* e clínicos, que as bactérias orais, mesmo organizadas em biofilmes, são susceptíveis à PDT (Santin et al., 2014) reduzindo em quantidade os microrganismos (Williams et al., 2004; Zanin et al., 2005; Zanin et al., 2006; Usacheva et al., 2003^a Usacheva et al., 2003b).

Com a finalidade de realização da PDT o fotossensibilizador azul de metileno já foi estudado por diversos autores e demonstrou-se efetivo no combate aos microrganismos presentes na cavidade oral (Araujo et al., 2015; Williams et al., 2004; Zanin et al., 2005; Zanin et al., 2006). O composto utilizado nesse estudo não apresenta toxicidade para o tecido hospedeiro, conseguindo penetrar na estrutura do ácido nucleico dos microrganismos (Wainwright, 2005). Além disso o corante azul de metileno tem efetividade demonstrada em estudos *in vitro* tanto para microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sob luz laser a fotossensibilização dependerá da concentração do corante e da intensidade da luz laser (Usacheva et al., 2003a).

Para que aconteça a reação fotoletal do microrganismo, é imprescindível que a luz utilizada seja ressonante com a banda de absorção do corante (Wainwright, 1998; Usacheva et al., 2003b), por tal motivo o uso do laser tem melhor desempenho para o uso do PDT por emitir luz com um único comprimento de onda e com uma geração mínima de calor, associando-se eficientemente com os fotossensibilizadores que absorveram a maior parte da radiação emitida pelo laser e

permitindo uma ação localizada já que pode ser conduzida por fibra ótica (Ackroyd et al., 2001; Wood et al., 1999) com uma profundidade de penetração da luz vermelha que varia entre 0,5 cm (630 nm) a 1,5 cm (700nm) (Kübler, 2005) Além de haver usado o laser em nossa pesquisa, também utilizamos o LED (Light Emitting Diode). Nesse estudo também utilizamos o LED vermelha pois estudos anteriores mostraram a efetividade dessa luz ao interagir com o azul de metileno, já que apresenta comprimento de onda que vai desde os 640 ± 30 nm, a qual excita dímeros e monômeros do azul de metileno provocando a reação fotoletal dos microrganismos sendo que, dentro dessa faixa, maiores comprimentos de onda penetram mais profundamente no tecido (Baptista et al., 2012) justificando a escolha das fontes de luz utilizadas nossa pesquisa.

Ao interagir com o laser com emissão na faixa do espectro do vermelho (660 nm) e o LED com o espectro também do vermelho, (640 ± 30 nm), a solução libera espécies reativas de oxigênio que degradam a membrana celular bacteriana e seu DNA (König et al., 2000). A penetração desse agente fotossensível e da luz emitida pelo laser e o LED na membrana celular, mitocôndrias e DNA nos microrganismos é variável (König et al., 2000) por isso, em regiões muito profundas do tecido dental, alguns autores afirmam não haver descontaminação total do tecido dentinários (Steiner-Oliveira et al., 2015). Ainda assim, diversos trabalhos demonstram que há uma significativa redução dos microrganismos presentes (Diniz et al., 2015; Santin et al., 2014; Araujo et al., 2015; König et al., 2000).

Estudos atuais mostram que a terapia fotodinâmica leva a redução significativa das bactérias como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, além disso mostraram que em estudos *in vitro* a redução foi maior que *in vivo* (Guglielmi et al., 2014). A terapia fotodinâmica é indicada porque ocasiona a morte rápida das bactérias cariogênicas, que poderiam afetar a restauração, causando cárie remanescente mesmo na presença de um bom selamento das margens da restauração (Kleina et al., 2009).

O questionamento do presente estudo girava em torno da influência das espécies reativas de oxigênio liberadas na PDT na qualidade da adesão da resina a dentina. Apesar das controvérsias iniciais quanto ao papel do oxigênio na polimerização, está agora bem estabelecido que o oxigênio forma um copolímero alternativo com um módulo vinílico (chamado peróxido polimérico ou poliperóxido) em uma reação para provocar a inibição da polimerização (Bhanut e Kishore, 1991).

No processo restaurador, a PDT ao liberar espécies reativas de oxigênio poderia influenciar negativamente a força de adesão da resina ao dente, uma vez que o oxigênio singlete produzido pode penetrar numa distância média de 100 nm, além disso tem uma vida média de $<0,04$ s no substrato (Moan; Berg, 1991; Diniz et al., 2015).

Com esses dados anteriormente expostos surgiu a dúvida que daria início a nossa hipótese nula, pois segundo os estudos de Powers et al. (2003) a dentina associada a vários tipos de preparo prévio entre eles, o laser de alta potência sem os protocolos adequados, poderia reduzir até 50% a força de adesão.

Considerando o tipo de adesivo em relação ao tratamento do substrato, Yoshiama et al. (1996) encontraram resultados de resistência adesiva similares entre adesivos autocondicionantes e de condicionamento total.

No estudo da Cunha et al. (2016) na qual avaliaram a força da adesão com dois sistemas adesivos diferentes (Adper Single Bond 2 e Universal Single Bond) em dentina tratada com radioterapia, chegaram a conclusão que não existe diferença significativa na força de adesão entre os dois sistemas adesivos testados, e o Universal Single Bond teve melhor resistência na adesão comparado com o Universal Single Bond 2, corroborando assim os resultados de nossa pesquisa.

Deste modo, de acordo com Carvalho et al., em 2004, os sistemas adesivos se tornaram ferramentas imprescindíveis e suas diversas aplicabilidades clínicas fazem com que sejam considerados como uma das partes fundamentais da terapêutica restauradora.

Nesse estudo observamos pelos valores obtidos no teste de microcisalhamento que a terapia fotodinâmica não altera a superfície do preparo dental, evitando assim reduzir a efetividade da adesão dos sistemas adesivos autocondicionantes e de condicionamento prévio, concordando com os estudos feitos por Van Merrbeek et al. (2003b) com esses tipos de adesivos em dentina humana.

Diante do exposto, a hipótese nula testada foi rejeitada. Pode-se afirmar que, independente do substrato dentinário avaliado, a PDT com os parâmetros testados no presente estudo com laser ou led, com o sistema de adesivo autocondicionante ou condicione e lave não altera a força de adesão no processo restaurador direto com resina composta.

8 CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica com os parâmetros testados, quando utilizada previamente ao tratamento restaurador direto, não altera a força da adesão da resina composta em dentina bovina.

REFERÊNCIAS¹

Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 2001 Nov;74(5):656-69.

Allison RR, Cuenca RE, Downie GH, Camnitz P, Brodish B, Sibata CH. Clinical photodynamic therapy of head and neck cancers-A review of applications and outcomes. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005 Sep;2(3):205-22.

Allison RR, Bagnato VS, Cuenca R, Downie GH, Sibata CH. The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol.* 2006 Feb;2(1):53-71.

Al-Watban FA, Zhang XY. Photodynamic therapy of human undifferentiated thyroid carcinoma-bearing nude mice using topical 5-aminolevulinic acid. *Photomed Laser Surg.* 2005 Apr;23(2):206-11.

Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi ME. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* 2014 Mar;29(2):629-35.

Araújo PV, Correia-Silva Jde F, Gomez RS, Massara Mde L, Cortes ME, Poletto LT. Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015 Sep;12(3):401-7.

Baptista A, Kato IT, Prates RA, Suzuki LC, Raele MP, Freitas AZ, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy as a strategy to arrest enamel demineralization: a short-term study on incipient caries in a rat model. *Photochem Photobiol.* 2012 May-Jun;88(3):584-9.

Bhanut VA e Kishore K. Role of Oxygen in Polymerization Reactions . *Chemical Reviews.* 1991; 91(2):99-117.

Bourré L, Giuntini F, Eggleston IM, Mosse CA, Macrobert AJ, Wilson M. Effective photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacterial strains using an HIV-1 Tat peptide-porphyrin conjugate. *Photochem Photobiol Sci.* 2010 Dec;9(12):1613-20.

Budavari S. The merck index. an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. NJ: Merck and CO, Whitehouse Station; 1996. p.1035.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1995;29(3):192-7.

Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol.* 1993 Jun;38(6):401-5.

Cardoso MV, de Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, Van Meerbeek B. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J.* 2011 Jun;56 Suppl 1:31-44.

Carvalho RM, Carrilho MRO, Pereira LCG, Marquezini L Jr, Silva SMA, Kusmaul APM. Sistemas adesivos: fundamentos para aplicação clínica. *Revista Biodonto.* 2004;2(1):6-86.

Cersosimo MPC. Análise in vitro da morfologia e da resistência de união da resina composta à dentina erodida e irradiada com laser de er:yag com largura de pulso super curta [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2016.

Convissar RA. Princípios e práticas do laser na odontologia. *Pesquisa odontologica com laser.* New York; 2011;17 p. 299.

da Cunha SR, Ramos PA, Haddad CM, da Silva JL, Fregnani ER, Aranha AC. Effects of Different Radiation Doses on the Bond Strengths of Two Different Adhesive Systems to Enamel and Dentin. *J Adhes Dent.* 2016;18(2):151-6.

de Souza EB, de Amorim CV, Marques JL. Effect of diode laser irradiation on the apical sealing of MTA retrofillings. *Braz Oral Res.* 2006 Jul-Sep;20(3):231-4.

de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol.* 2008 Jun;79(6):1081-8.

de Souza EB, Cai S, Simionato MR, Lage-Marques JL. High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jul;106(1):e68-72.

de Souza EB. Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares *in vivo* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadjian TR, Matos AB, Simionato MR, Marques MM. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Sep;12(3):511-8.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol*. 1992 Nov;37(11):883-7.

Fan KF, Hopper C, Speight PM, Buonaccorsi G, MacRobert AJ, Bown SG. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Cancer*. 1996 Oct 1;78(7):1374-83

Friedlander L, McElroy K, Daniel B, Cullinan M, Hanlin S. Direct pulp capping of permanent teeth in New Zealand general dental practice a practice based research study. *N Z Dent J*. 2015 Jun;111(2):58-64.

Freitas I, Baronzio GF. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1991 Oct;11(1):3-30.

Garone N. Adesividade em dentística . In: busato, a. l. s. Dentística: filosofia, conceitos e prática clínica. São Paulo: Artes médicas; 2005. cap. 5, p.125- 46.

Giannini M, Makishi P, Ayres AP, Vermelho PM, Fronza BM, Nikaido T, Tagami J. Self-etch adhesive systems: a literature review. *Braz Dent J*. 2015Jan-Feb;26(1):3-10.

Guglielmi CAB. Avaliação microbiológica *in vivo* de lesões de cárie profundas tratadas pela terapia fotodinâmica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Guglielmi Cde A, Simionato MR, Ramalho KM, Imperato JC, Pinheiro SL, Luz MA. Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *J Biomed Opt*. 2011 Aug;16(8):088003. Borrás 2014

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004 May;3(5):436-50.

Issa MC, Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol*. 2010 Jul-Aug;85(4):501-11.

Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1992 Jul 30;14(4):275-92.

Kessel D. More Adventures in Photodynamic Therapy. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 3;16(7):15188-93.

Kleina MW, Hermann FCS, Klein-Júnior CA, Piva F. A remoção da dentina cariada na prática restauradora - Revisão da literatura. *Rev Dent* 2009; 8(18):15-23.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007 Aug;86(8):694-707. Review. Erratum in: *J Dent Res*. 2007 Nov;86(11):1126.

König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2000 Nov;46(7):1297-303.

Kübler AC. Photodynamic therapy. *Med Laser Appl*. 2005; 20(1):37-45

Lee MT, Bird PS, Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. *Aust Endod J*. 2004 Dec;30(3):93-8.

Lui H, Bissonnete R. Photodynamic therapy In: Goldman MP, Fitzpatrick RE., 2^o ed. *Ed. Cutaneous Laser Surgery: 2* Saint Louis, Mosby; 1999. p. 437-58

Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*. 2000; 23(2): 237.

Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins--an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B*. 1990 May;5(3-4):281-93.

Manhães L, Oliveira DC, Marques MM, Matos AB. Influence of Er:YAG laser

surface treatment and primer application methods on microtensile bond strength self-etching systems. *Photomed Laser Surg.* 2005 Jun;23(3):304-12.

Marthy HJ, Murasecco-Suardi P, Oliveros E, Braun AM. Primary effects of singlet oxygen sensitizers on eggs and embryos of sea urchins. *J Photochem Photobiol B.* 1990 Nov;7(2-4):303-15.

Melo MA. Photodynamic antimicrobial chemotherapy as a strategy for dental caries: building a more conservative therapy in restorative dentistry. *Photomed Laser Surg.* 2014 Nov;32(11):589-91.

Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991 Apr;53(4):549-53.

Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jul 27;88(1):16-20.

Nelson JS, McCullough JL, Berns MW. Principles and applications of photodynamic therapy in dermatology. In Ardnt kA, Dover JS, Olbricht SM (eds) *Laser in cutaneous and aesthetic surgery.* Lippincott- Raven, Philadelphia: 1997. p 370.

Nogueira AC, Graciano AX, Nagata JY, Fujimaki M, Terada RS, Bento AC, Astrath NG, Baesso ML. Photosensitizer and light diffusion through dentin in photodynamic therapy. *J Biomed Opt.* 2013 May;18(5):55004.

Núñez SC. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de ortotoluidina com relação à eficiência fotodinâmica.[tese]. apresentada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo; 2007.

O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers Surg Med.* 2002;31(2):86-90.

Paschoal MAB. Avaliação in vitro da terapia fotodinâmica sobre microrganismos cariogênicos presentes na saliva de crianças [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Pashley DH. Clinical correlations of dentin structure and function. *J Prosthet Dent.* 1991 Dec;66(6):777-81.

Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent.* 1997 Sep;25(5):355-72.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004 Mar;83(3):216-21.

Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater.* 2010 Feb;26(2):e24-37.

Prates RA, da Silva EG, Yamada AM, Suzukia LC, Paula CR, Ribeiro MS. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. *Proc. of SPIE Vol. 6846, 684606, (2008)*

Powers JM, O'Keefe KL, Pinzon LM. Factors affecting in vitro bond strength of bonding agents to human dentin. *Odontology.* 2003 Sep;91(1):1-6.

Raab OZ. *Biol.* 1900;39:524.

Roberts DJ, Cairnduff F. Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review. *Br J Plast Surg.* 1995 Sep;48(6):360-70.

Santin GC, Oliveira DS, Galo R, Borsatto MC, Corona SA. Antimicrobial photodynamic therapy and dental plaque: a systematic review of the literature. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:824538.

Sharma SK, Dai T, Kharkwal GB, Huang YY, Huang L, De Arce VJ, Tegos GP, Hamblin MR. Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr Pharm Des.* 2011;17(13):1303-19.

Shimaoka AM, de Andrade AP, Cardoso MV, de Carvalho RC. The importance of adhesive area delimitation in a microshear bond strength experimental design. *J Adhes Dent.* 2011 Aug;13(4):307-14.

Sena RMM. Efeitos da terapia fotodinamica mediada por laser de emisaõ vermelha e nazul de metileno em vaginitis induzida por "canida albicans" [tese]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2013.

Steiner-Oliveira C, Longo PL, Aranha AC, Ramalho KM, Mayer MP, de Paula Eduardo C. Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin. *J Biomed Opt.* 2015 Oct;20(10):108003.

Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, Severino D, de Fátima Turchiello R, Baptista MS. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2005 Sep;2(3):175-91.

Tessarolli V. Ação da terapia fotodinâmica sobre biofilme dentário humano [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia; 2010.

Torezan LAR. Avaliação da eficácia da terapia fotodinâmica com ácido 5-delta aminolevulínico (ala) tópico no carcinoma basocelular [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina; 2000.

Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Barker SJ, Hyatt J, Nelson JS, Berns MW. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1990 Aug;52(2):375-85.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med.* 2003a;33(5):311-9.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 2003b Oct 15;71(1-3):87-98.

Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003a May-Jun;28(3):215-35.

Van Meerbeek B, De Munck J, Mattar D, Van Landuyt K, Lambrechts P. Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Oper Dent.* 2003b Sep-Oct;28(5):647-60.

Van Meerbeek B, Van Landuyt K, de Munk J, Inoue S, Yoshida Y, Perdigão J, et al.. Bonding to enamel and dentin. Fundamentals of operative dentistry, Chicago: a contemporary approach quintessence; 2006. 220p eliminar

Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 1998 Mar 15;160(2):177-81.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). J Antimicrob Chemother. 1998 Jul;42(1):13-28.

Wainwright M. Photoinactivation of viruses. Photochem Photobiol Sci. 2004 May;3(5):406-11.

Wainwright M. The development of phenothiazinium photosensitisers. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2005 Dec;2(4):263-72.

Wainwright M, Dai T, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy in the colon: delivering a light punch to the guts? Photochem Photobiol. 2011 Jul-Aug;87(4):754-6.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. Caries Res. 2004 Nov-Dec;38(6):530-6.

Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. Curr Microbiol. 1992 Aug;25(2):77-81.

Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. J Appl Bacteriol. 1995 May;78(5):569-74.

Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. Photochem Photobiol Sci. 2004 May;3(5):412-8.

Wood S, Nattress B, Kirkham J, Shore R, Brookes S, Griffiths J, Robinson C. An in vitro study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. J Photochem Photobiol B. 1999 May;50(1):1-7.

Yoshiyama M, Sano H, Carvalho RM, Pashley DH. Adhesive mechanism of a self-etching/self-priming adhesive resin to enamel and dentin. *J Hard Tissue Biol.* 1996 Mar; 5(1):31-5.

Zanin IC, Junior AB, Hofling JF, Zanin FAA, Gonçalves RB. Aplicacao da terapia fotodinamica na descontaminacao bacteriana. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2002 Jun; 56(supl):7-11.

Zanin IC, Gonçalves RB, Junior AB, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Aug;56(2):324-30.

Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006 Feb;114(1):64-9.

Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol.* 2008 Feb;53(2):124-32.

Zhegova G, Rashkova M, Rocca JP. Minimally invasive treatment of dental caries in primary teeth using an Er:YAG Laser. *Laser Ther.* 2014 Dec 27;23(4):249-54.

Zollinger H. Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments. 2nd ed. Weinheim: VCH publishers;1991, 2nd edition.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP N° 040/2015 referente ao projeto intitulado: "**Avaliação da resistência adesiva em dentina cariada tratada pela terapia fotodinâmica em dente bovino**" sob a responsabilidade de execução dos autores **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo** e do aluno **Christian Giancarlo Bernal Rodriguez**, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar material de origem animal, dentes bovinos provenientes de frigorífico.

São Paulo, 14 de março de 2016.


Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Presidente da CEUA/FOUSP

