



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA

ARIANE XIMENES GRACIANO

**“ESTUDO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA A DIFERENTES
FOTOSENSIBILIZADORES EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA”**

Maringá

2011

ARIANE XIMENES GRACIANO

**“ESTUDO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA A DIFERENTES
FOTOSENSIBILIZADORES EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA”**

Trabalho de Dissertação apresentado à
Universidade Estadual de Maringá para a obtenção
do título de Mestre em Odontologia Integrada.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Raquel Sano Suga
Terada

Maringá

2011

ARIANE XIMENES GRACIANO

**“ESTUDO DA PERMEABILIDADE DENTINÁRIA A DIFERENTES
FOTOSENSIBILIZADORES EMPREGADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA”**

Trabalho de Dissertação apresentado à Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de Mestre em Odontologia Integrada.

Aprovado em ____/ ____/ ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. ELIZANDRA SEHN

Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Departamento de Física

Prof^ª. Dra. RENATA CORRÊA PASCOTTO

Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Odontologia

Prof^ª. Dra. RAQUEL SANO SUGA TERADA

Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Odontologia

Dedicatória

“À Deus, minha luz e meu guia.

Por me abençoar em todos os momentos da minha vida”.

“Aos meus queridos pais, Myriam e Paulo, por todo apoio.

Verdadeiro amor, carinho e compreensão”.

“Aos meus irmãos, Lorena e Rafael, e ao meu cunhado Fernando.

Por toda força, amizade e companherismo.

E à minha sobrinha Luiza, o anjinho da nossa família”.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Prof^ª. Dra. Raquel Sano Suga Terada, por todo conhecimento transmitido, oportunidade de aprendizado e crescimento profissional e pessoal, paciência, incentivo e carinho. Obrigada por ter acreditado e confiado no meu trabalho e na minha pessoa.

Às constituintes da banca examinadora, Prof^ª. Dra. Elizandra Sehn e Prof^ª. Dra. Renata Corrêa Pascotto, e também à Prof^ª. Dra. Ana Raquel Benetti, que participou do exame de qualificação, pelas considerações realizadas e por acrescentarem conhecimento e informações importantes com extrema competência e atenção.

À Prof^ª. Dra. Mitsue Fujimaki Hayacibara, pela oportunidade de trabalharmos juntas. Obrigada pelo aprendizado, carinho, atenção e paciência.

Ao Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso, pela disponibilidade em ajudar e por ter cedido os equipamentos e laboratório para a realização da pesquisa. Muito obrigada pela atenção e apoio.

À Prof^ª. Dra. Elza Kimura Grimshaw, por todo apoio. Obrigada pelo conhecimento transmitido e paciência em ensinar. Também obrigada por ter disponibilizado o laboratório para realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Noburo Hioka e ao seu grupo de pesquisa, por ter acolhido desde o início nossas dificuldades e por toda disponibilidade em ensinar e ajudar.

À Prof^ª. Dra. Luzmarina Fernandes, pela ajuda com as lâminas e microscopia.

À minha companheira de pesquisa Juliana Yuri Nagata. Obrigada pela amizade, por toda sua paciência, competência, apoio e troca de conhecimento. Te admiro muito e tenho certeza que terá muito sucesso.

À minha companheira de pesquisa Ana Claudia Nogueira Astrath, por toda disponibilidade, atenção, amizade e companherismo. Tive muita sorte em trabalhar com você.

Também agradeço à Paula Mayumi Nishita, Lidiane Vizioli de Castro e Franciele Sato, pela ajuda no laboratório, muitas vezes durante os finais de semana e feriados. Muito obrigada por tudo.

Aos Técnicos do Laboratório, que direta ou indiretamente ajudaram na realização da pesquisa. Obrigada pela paciência, atenção e disponibilidade.

À Clínica Odontológica da UEM e ao Banco de Dentes pela concessão dos dentes que utilizei na pesquisa.

Agradeço o apoio do Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos, coordenador do mestrado, da Secretaria da Pós-Graduação e da CAPES.

Ao Departamento de Odontologia e à sua coordenadora, Prof^a. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo, por todo apoio.

Aos Professores do Mestrado, por todo conhecimento e ensinamento. Obrigada pela atenção, paciência e disponibilidade em ensinar, tirar dúvidas e ajudar.

À Turma do Mestrado, pelo companherismo, troca de conhecimento, conversas, jantinhas... sentirei muita falta de vocês!

Ao meu companheiro Andreo Garcia Morante Parra, por seu amor, carinho, atenção, compreensão, incentivo e apoio. Por dividir comigo os momentos de alegria e dificuldade. Tive muita sorte em te conhecer, meu presente de Deus.

Aos Meus Amigos: Vivian Sayuri Kitayama, Marcos Sérgio Endo, Natália Osswald Carlete, Patrícia Tiemi Cawahisa, Wellington Mendes Carvalho, Sabrina Shima, Luciana Costa Sanches, Vitor Hugo de Oliveira Amorim, Kelly Regina Micheletti e Juliana Beatris Lopes da Silva, pelo apoio sempre. Amo vocês!

Muito Obrigada a todos!

"O saber é saber que nada se sabe. Essa é a definição do verdadeiro conhecimento".

- Confúcio

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	X
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. A cárie dentária.....	19
2.2. A terapia fotodinâmica.....	21
2.3. Histórico da terapia fotodinâmica.....	24
2.4. Os fotossensibilizadores.....	25
2.4.1. Azul de metileno.....	26
2.4.2. Azul de o-toluidina.....	26
2.4.3. Verde de malaquita.....	27
2.5. Fontes de luz.....	28
2.6. A terapia fotodinâmica e a cárie dentária.....	28
2.7. Permeabilidade dentinária.....	34
2.8. Espectroscopia fotoacústica.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1. Espectroscopia fotoacústica (PAS).....	40
4.1.1. Confeção das amostras.....	40
4.1.2. Os fotossensibilizadores.....	43
4.1.3. Leitura em PAS.....	45
4.2. Espectroscopia fotoacústica (FTIR-PAS).....	47
4.3. Espectrofotometria.....	48
4.4. Microscopia.....	49
4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura.....	50
4.4.2. Microscopia óptica.....	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1. Espectroscopia fotoacústica (PAS).....	53

5.2. Espectroscopia fotoacústica (FTIR-PAS).....	68
5.3. Espectrofotometria.....	70
5.4. Microscopia.....	71
5.4.1. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	71
5.4.2. <i>Microscopia óptica</i>	73
6. DISCUSSÃO.....	74
6.1. Discussão dos resultados.....	74
6.2. Discussão da metodologia.....	78
7. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXO.....	89
APÊNDICE.....	90

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Adaptação do círculo cromático formado pelas cores de acordo com a sua complementaridade.

Figura 2 – Adaptação do comprimento de onda e frequência aproximados da sequência de cores formadas na região visível.

Figura 3 - Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismo de ação da PDT.

Figura 4 – Estrutura molecular do azul de metileno.

Figura 5 – Estrutura molecular do azul de o-toluidina.

Figura 6 – Estrutura molecular do verde de malaquita.

Quadro 1 – Estudos realizados com a aplicação da PDT sobre microrganismos cariogênicos.

Quadro 2 – Dados resumidos sobre estudos de permeabilidade realizados.

Figura 7 – Sequência para confecção das amostras.

Figura 8 – Passo-a-passo para realização dos cortes para obtenção das amostras.

Figura 9 – Vista oclusal esquemática com as proporções adotadas para obtenção da amostra.

Figura 10 – Dimensões da amostra de dentina obtida.

Figura 11 - Aspecto final da amostra e recipiente contendo a amostra.

Figura 12 – Fotossensibilizadores testados.

Quadro 3 – Distribuição das amostras de acordo com a concentração e tempo de exposição aos FS empregados.

Figura 13 – Aplicação do FS sobre a amostra e posicionamento desta na célula fotoacústica.

Figura 14 – Equipamento utilizado para realização da PAS.

Figura 15 – Arranjo experimental para medidas de espectroscopia fotoacústica.

Figura 16 – Corte lateral da célula fotoacústica convencional.

Figura 17 - Passo-a-passo para realização dos cortes para obtenção das amostras.

Figura 18 – Cortes que foram realizados para remover as paredes vestibular, lingual, mesial e distal para obtenção das amostras.

Figura 19 – Amostra obtida com as dimensões finais.

Figura 20 – Espectro das duas superfícies da amostra de dentina antes da aplicação do FS.

Figura 21 – Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 1 para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição.

Equação 1 - Equação teórica para estimar o comprimento de difusão térmica da amostra.

Equação 2 – Equação teórica para estimar a quantidade de FS em função da espessura da amostra.

Figura 22 – Estimativa da porcentagem de azul de metileno que permeia em função da espessura da dentina.

Figura 23 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 3 para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição.

Figura 24 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 1 minuto de exposição.

Figura 25 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MB 0,01 mg/mL no período de 5 minutos de exposição.

Figura 26 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 1 para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição.

Figura 27 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 1 para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição.

Figura 28 - Estimativa da porcentagem de azul de o-toluidina que permeia em função da espessura da dentina.

Figura 29 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 1 minuto de exposição.

Figura 30 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do TBO 0,01 mg/mL no período de 5 minutos de exposição.

Figura 31 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 2 para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição.

Figura 32 - Estimativa da porcentagem de verde de malaquita que permeia em função da espessura da dentina.

Figura 33 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 3 para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição.

Figura 34 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 1 minuto de exposição.

Figura 35 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MG 0,01 mg/mL no período de 5 minutos de exposição.

Quadro 4 – Primeiras espessuras de detecção encontradas para cada amostra avaliada.

Quadro 5 – Média das espessuras de detecção encontradas para cada FS e períodos testados, e média dos valores de τ de cada FS testado.

Figura 36 – Comportamento da concentração do azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita em função da espessura da amostra de dentina de acordo com o valor de τ encontrado para cada FS.

Figura 37 - Evolução dos sinais fotoacústicos para verificação de alteração causada por possíveis reações entre os FS e a estrutura dentária.

Figura 38 – Espectro dos FS azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita a 0,001 mg/mL.

Quadro 6 – Picos de absorção máxima encontrados em PAS e na espectrofotometria para o azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita, de acordo com as concentrações utilizadas.

Figura 39 – Imagens obtidas em MEV nos cortes transversais e longitudinais.

Figura 40 – Imagens obtidas em MO de amostras de dentina em cortes longitudinais mostrando a impregnação dos FS nos túbulos dentinários.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT) tem-se apresentado como uma alternativa conservadora e promissora para a descontaminação da dentina cariada atuando como coadjuvante no tratamento da cárie dentária por meio da inativação dos seus microrganismos. O efeito antimicrobiano da PDT resulta de reações fotoquímicas que ocorrem com a associação de um fotossensibilizador (FS) e uma fonte de luz aplicados no local afetado. A permeabilidade dentinária aos FS utilizados na PDT é um fator importante para sua ocorrência uma vez que, se não houver uma permeação mínima do FS na dentina, o efeito da PDT será superficial. Por outro lado, se houver alta permeação do FS, podem ocorrer efeitos adversos que ainda não são conhecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* por meio da espectroscopia fotoacústica (PAS) a permeabilidade dentinária a diferentes FS empregados na PDT, analisar o efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição aos FS sobre a permeabilidade dentinária, e também avaliar *in vitro* por meio da espectroscopia fotoacústica em infravermelho por transformada de Fourier (PAS-FTIR) a presença de reações químicas entre os FS empregados e a dentina. Para isso, os FS azul de metileno (MB), azul de o-toluidina (TBO) e verde de malaquita (MG) em concentrações de 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL foram aplicados sobre um total de 24 amostras de dentina humana, durante 1, 5 ou 30 minutos, que foram submetidas à PAS para quantificação da permeação. Em PAS-FTIR 3 amostras foram utilizadas para os três FS a 0,1 mg/mL. Para avaliação da impregnação dos FS nos túbulos dentinários 3 amostras foram analisadas em microscopia óptica, e para avaliar as características dos túbulos dentinários realizou-se a avaliação de 6 amostras em microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que os três FS permearam em dentina sendo que o MB a 0,1 mg/mL com período de exposição de 5 minutos apresentou o maior valor médio de permeação (0,246 mm). Por sua vez, o MG a 0,1 mg/mL com período de exposição de 5 minutos apresentou o menor valor médio de permeação (0,180 mm). O período de exposição de 5 minutos (0,246 mm) ou 30 minutos (0,245 mm) não interferiu no comportamento de permeação do MB, já o TBO e o MG apresentaram variação no comportamento de permeação para os períodos de 5 minutos (0,220 mm e 0,180 mm), e 30 minutos (0,193 mm e 0,237 mm), respectivamente. Para o período de 1 minuto os três FS tiveram o mesmo comportamento de permeação (0,150 mm). Não foram encontradas ligações químicas entre os FS testados e a dentina, e houve impregnação dos FS nos túbulos

dentinários. Pode-se concluir que os FS avaliados possuem capacidade de permeação favorável sobre a estrutura dentinária o que viabiliza sua utilização na PDT para a descontaminação da dentina cariada como coadjuvante no tratamento da cárie dentária.

Descritores: Terapia Fotodinâmica; Cárie Dentária; Fotossensibilizadores; Permeabilidade Dentária.

ABSTRACT

The photodynamic therapy (PDT) has been presented as a conservative alternative and promising for the decontamination of carious dentin acts as an adjuvant in the treatment of dental caries through its inactivation of microorganisms. The antimicrobial effect of PDT is the result of photochemical reactions that occur with the association of a photosensitizer (PS) and a light source applied at the affected site. The dentin permeability to PS used in PDT is an important factor for its occurrence since, if there is a minimal permeation of PS in the dentin, the effect of PDT is superficial. Meantime, if there is a high PS permeation, adverse effects may occur that are not yet known. Then, the aims of this study was evaluate *in vitro* using the photoacoustic spectroscopy (PAS) the dentin permeability of different PS used in PDT, evaluate the effect of different concentration and exposure time of PS on dentin permeability, and evaluate *in vitro* using the photoacoustic Fourier transform infrared spectroscopy (PA-FTIRS) to investigate chemical modifications between PS and dentin. So the PS Methylene Blue (MB), Toluidine Blue O (TBO) and Malachite Green (MG) with 0,1 mg/mL and 0,01 mg/mL concentration was applied in 24 dentin human samples, during 1, 5 or 30 minutes, and they were submitted to PAS to quantify the permeability. In PA-FTIRS, 3 dentin samples were used, one sample for each PS with 0,1 mg/mL. To investigate the PS impregnation in dentinal tubules 3 dentin samples were evaluates in optical microscopy and 6 dentin samples were used to evaluate the dentinal tubules characteristics in scanning electron microscopy. According to results the three PS permeated in dentin, the MB 0,1 mg/mL exposed during 5 minutes presented the highest average (0,246 mm) while the MG 0,1 mg/mL exposed during 5 minutes presented the lowest average (0,180 mm). The exposure time of 5 minutes (0,246 mm) or 30 minutes (0,245 mm) didn't influence in MB permeation behavior, on the other hand the TBO and MG varied on permeation behavior for periods of 5 minutes (0,220 mm and 0,180 mm), and 30 minutes (0,193 mm and 0,237 mm), respectively . For the period of 1 minute the three PS had similar permeation (0,150 mm). There weren't chemical bonds between the PS and dentin, and occurred PS impregnation in dentinal tubules. Thus concludes that the PS evaluates have favorable capacity of permeation on dentin structure which enables their use in PDT for the decontamination of carious dentin as an adjunct in the treatment of dental caries.

Key words: Photodynamic Therapy; Dental Caries; Photosensitizer; Dentin Permeability.

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa prevalente na população mundial e afeta aproximadamente 60% a 90% das crianças em idade escolar e quase 100% dos adultos¹. Seu tratamento envolve, entre outros fatores, a remoção dos microrganismos cariogênicos e na odontologia, procura-se utilizar procedimentos cada vez mais conservadores². A terapia fotodinâmica (PDT) tem-se apresentado como uma alternativa conservadora e promissora para a descontaminação da dentina cariada, atuando como coadjuvante no tratamento da doença cárie por meio da inativação de até 95% de seus microrganismos³. O efeito antimicrobiano da PDT já foi comprovado³⁻¹² e resulta de reações fotoquímicas que ocorrem com a associação de um fotossensibilizador (FS) e uma fonte de luz aplicados no local afetado^{13, 14}. Para que essa reação ocorra, a associação entre FS e luz deve apresentar características químicas e físicas adequadas, para que os componentes celulares fotossensíveis passem para um estado excitado¹⁵ e produzam agentes citotóxicos capazes de alterar características celulares, resultando na morte bacteriana¹⁶.

Desde a década de 90 a PDT vem sendo empregada sobre microrganismos cariogênicos^{17, 18}. A PDT foi aplicada sobre suspensões de *Streptococcus mutans* por BURNS e colaboradores em 1995⁵. Mais recentemente, LIMA e colaboradores (2009)³ aplicaram a PDT em dentina cariada produzida *in situ*, utilizando como FS o azul de o-toluidina (TBO) a 0,1 mg/mL irradiado por um LED com 638,8 nm durante cinco e dez minutos, o que resultou em uma redução significativa dos microrganismos totais. BAPTISTA (2009)¹² aplicou a PDT em cobaias por meio da associação do azul de metileno (MB) a 0,03 mg/mL e LED com 640 nm durante três minutos, que também resultou em inviabilização significativa de bactérias cariogênicas. O TBO tem sido o FS de escolha na maioria dos estudos^{3, 4, 6, 7, 9-11}. Também o MB, dentre outros, tem sido empregado^{8, 11, 12}. O verde de malaquita (MG), um corante utilizado na prática odontológica como evidenciador de placa bacteriana¹⁹, ainda não foi aplicado sobre microrganismos cariogênicos. Entretanto, PRATES (2005)¹⁹ aplicou a PDT sobre o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, microrganismo associado à doença periodontal, com a utilização do MG a 0,1 mg/mL associado a um laser diodo GaAIs vermelho, com comprimento de onda de 660 nm, durante três e cinco minutos, e encontrou até 99,9% de inativação bacteriana.

A permeabilidade dentinária aos FS utilizados na PDT é um fator importante para sua ocorrência uma vez que, se não houver uma permeação mínima do FS na dentina, o efeito da PDT será superficial. Por outro lado, se houver alta permeação do FS, podem ocorrer efeitos adversos ainda desconhecidos sobre a polpa. Entretanto, a avaliação da permeabilidade dentinária frente à aplicação de diferentes FS empregados especificamente para a PDT ainda não foi demonstrada. Em 1933, FISH²⁰ estudou a permeabilidade dentinária do corante azul de metileno, utilizado para coloração histológica. Os dentes permaneceram no corante por um tempo de 24 horas a temperatura de 37 graus centígrados e observou-se que nas áreas em que a dentina se apresentava hipermineralizada, a permeabilidade estava acentuadamente reduzida.

Por muito tempo o estudo da permeabilidade dentinária foi realizado de modo qualitativo^{21, 22}. No entanto, a necessidade de informações mais concretas fez com que os estudos se tornassem quantitativos. O Índice de Permeabilidade Dentinária proposto por MARSHALL; MASSLER; DUTE em 1960²³ foi a primeira tentativa no sentido de quantificar a permeabilidade dentinária radicular. Desde então, já foi demonstrada a influência de vários fatores na permeabilidade dentinária dentre eles, a área da dentina exposta e sua espessura²⁴ e o efeito do tamanho das moléculas utilizadas²⁵. Fatores como a estrutura e a química do tecido envolvido, a pressão exercida durante o processo bem como a presença de interações químicas entre a dentina e o agente penetrante também influenciam na permeabilidade²⁶.

Atualmente, uma técnica viável que permite a mensuração da permeação de uma substância em amostras não homogêneas é a espectroscopia fotoacústica (PAS). Essa técnica possibilita a realização de medidas de perfil de profundidade ao longo da amostra²⁷, como também a detecção de interações químicas com os componentes da amostra. Modificações químicas de acordo com diferentes graus de desmineralização em superfícies dentárias foram avaliadas com a técnica de espectroscopia fotoacústica em infravermelho (PA-FTIRS)²⁸ e também, a avaliação da permeação de diferentes substâncias em pele²⁹. Ainda, a permeação de agentes antifúngicos em unha foi mensurada em PAS³⁰.

Assim, este estudo propôs avaliar *in vitro*, por meio da técnica de PAS, a permeabilidade dentinária de diferentes FS empregados na PDT e analisar o efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição dos FS sobre a permeabilidade dentinária em amostras de dentina humana. Dessa maneira, pode-se observar se a capacidade de permeação

dos FS empregados na PDT é viável para a descontaminação da dentina cariada como coadjuvante no tratamento da doença cárie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cárie dentária

A cárie dentária é considerada a principal doença bucal presente em todos os continentes. Ao contrário do que muitos pensam, ela não é uma “doença da pobreza” e sim uma consequência da industrialização por meio das mudanças nos hábitos alimentares e aumento no consumo de açúcar³¹. Os países de baixa renda que agregam aproximadamente 62% da população mundial, apresentam os menores índices de cárie e também a menor quantidade de odontólogos. Por outro lado, os países de alta renda têm apresentado índices decrescentes da doença cárie a qual tem-se concentrado, portanto, nos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil^{32, 33}.

Biologicamente, o desenvolvimento da cárie inicia-se com a formação de uma camada protéica acelular denominada película adquirida. Essa película é constituída principalmente por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e, em menor extensão, componentes do fluido gengival. A composição da película tem recebido considerável interesse devido ao seu papel potencial de determinar a composição da microbiota inicial. Espécies bucais do gênero *Streptococcus* constituem cerca de 60 a 80% dessas bactérias pioneiras^{34, 35, 36}. A cavidade bucal é a única área acessível no corpo que possui superfícies duras capazes de permitir a colonização microbiana, possibilitando que grandes massas de microrganismos e seus produtos extracelulares se acumulem³⁷.

O *Streptococcus mutans* possui características que facilitam sua colonização sobre a película adquirida tornando-o uma espécie numericamente significativa no biofilme dentário pelos seus altos graus de adesão ao dente e à glicoproteína salivar que o recobre e, também, devido à facilidade com que suas células se agregam. Essas populações pioneiras se multiplicam, formando microcolônias, as quais ficam mergulhadas em muco bacteriano extracelular e polissacarídeos, juntamente com camadas adicionais de proteínas salivares adsorvidas e glicoproteínas. Assim, ocorre a formação de um biofilme, de forma que o metabolismo das espécies pioneiras crie condições apropriadas para a colonização por bactérias com maiores níveis de exigências atmosféricas^{34, 35, 36}.

Cada superfície dentária irá amparar um tipo de microflora; dessa forma, cada fissura é um sistema ecológico individual em que geralmente predominam cocos Gram positivos (70 a 90% da flora) e anaeróbios facultativos, especialmente o *Streptococcus sanguis* e o *Streptococcus mitis*. O *S. mutans* tem sido isolado em grande número a partir de biofilmes presentes em superfícies lisas e lesões de fissura³⁸.

A cárie dentária está intimamente associada com a microbiota residente no biofilme dentário. O freqüente consumo de carboidratos fermentáveis pode levar a constantes quedas de pH, o que ocasiona um desequilíbrio no ecossistema do biofilme bacteriano. Assim, ocorre uma diminuição na proporção de bactérias ácido-sensíveis, como *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*, e um aumento nas proporções de espécies sacarolíticas acidúricas e acidogênicas, como os *S. mutans* e *Lactobacillus*^{39, 40}. O aumento na proporção dessas espécies leva a uma produção cada vez maior de ácido, promovendo a desmineralização do dente e deixando a superfície dentária mais susceptível ao aparecimento de lesões de cárie⁴¹.

A partir da desmineralização do esmalte, a lesão progride lentamente em direção à dentina sendo caracterizada por uma área de dentina desmineralizada sob uma zona desmineralizada e infectada com bactérias. Clinicamente, a diferenciação entre essas zonas e a remoção apenas da dentina contaminada é extremamente crítica, de maneira que grande quantidade de tecido sadio desmineralizado é removido durante o preparo cavitário¹⁸.

Nos últimos 15 anos a tecnologia aplicada ao preparo cavitário evoluiu muito com o desenvolvimento de instrumentos e equipamentos capazes de propiciar a execução de preparos conservadores. Instrumentos e técnicas alternativas de preparo cavitário preservando o máximo da estrutura dentária com preparos conservativos devem atender não somente os princípios de uma odontologia mais conservadora, mas também preparar as paredes da cavidade a fim de torná-las receptivas ao procedimento adesivo subsequente. Esta odontologia minimamente invasiva ou microdentística justifica-se, uma vez que nenhum material restaurador substitui o tecido dentário e também possibilita a redução e eliminação do risco de cárie².

Sabe-se que a remoção do tecido cariado amolecido, ou dentina infectada, é necessária, no entanto, a manutenção da dentina endurecida subjacente, ou dentina afetada, ainda deixa dúvidas entre os odontólogos. Assim, seria interessante o desenvolvimento de um tratamento baseado na aplicação de agentes com propriedades bactericidas, aplicável à

dentina afetada, que reduzisse a quantidade de tecido dentário removido, favorecendo a preservação do dente restaurado^{5, 15, 18}.

2.2. A terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) promove a inativação de microrganismos por meio de reações fotoquímicas que ocorrem com a combinação de um agente fotossensibilizador e uma fonte de luz^{13, 14}. Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, é necessária a utilização de um fotossensibilizador (FS) que atraia para si a luz. No entanto, a habilidade de um componente em absorver uma luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um FS. Para produzir efeito antimicrobiano, o FS deve apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não deve apresentar danos tóxicos ao hospedeiro⁴².

Dessa maneira, um FS pode absorver maior ou menor quantidade de luz de acordo sua frequência e comprimento de onda. Quando dizemos que um FS e uma determinada luz são complementares, significa que a frequência e o comprimento de onda da luz possuem alta absorção pelo FS. Sabidamente, as cores são associadas de acordo com essa complementaridade em um círculo cromático, como mostra a Figura 1, assim os FS utilizados devem ser irradiados por sua luz de cor complementar, pois ocorre alta absorção da luz pelo FS devido à sua compatibilidade com a frequência e comprimento de onda, ilustrados na Figura 2^{43, 44, 45}.

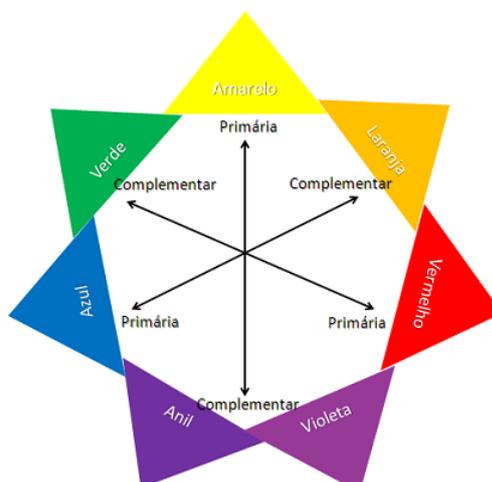


Figura 1 – Adaptação do círculo cromático formado pelas cores de acordo com a sua complementaridade.

Na região visível, que fica entre 400 e 700 nm aproximadamente, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior é o seu grau de penetração. Em contrapartida, uma radiação de comprimento de onda menor sofre maior espalhamento e, conseqüentemente, a penetração da luz é menor. Portanto, é interessante que o comprimento de onda utilizado se encontre na região visível próxima ao infra-vermelho, que se inicia a partir de 700 nm aproximadamente⁴⁶.

Cores do espectro visível ~ 380 – 740 nm

Cor	Comprimento de onda (nm)	Frequência (Hz)
Vermelho	~ 625 – 740 nm	~ 480 – 405 Hz
Laranja	~ 590 – 625 nm	~ 510 – 480 Hz
Amarelo	~ 565 – 590 nm	~ 530 – 510 Hz
Verde	~ 500 – 565 nm	~ 600 – 530 Hz
Ciano	~ 485 – 500 nm	~ 620 – 600 Hz
Azul	~ 440 – 485 nm	~ 680 – 620 Hz
Violeta	~ 380 – 440 nm	~ 790 – 680 Hz

Figura 2 – Adaptação do comprimento de onda e frequência aproximados da sequência de cores formadas na região visível.

Assim, por meio dessa complementaridade entre FS e fonte de luz, ocorrem reações fotoquímicas que fazem com que os componentes celulares fotossensíveis passem para um estado excitado¹⁵. Nesse estado excitado, ocorre a formação de produtos citotóxicos, como o oxigênio singlete (¹O₂), capaz de alterar os componentes e metabolismo celulares resultando na morte bacteriana¹⁶.

Os danos causados pelos FS em biomoléculas podem ocorrer por dois mecanismos principais. No mecanismo TIPO I, a energia das moléculas excitadas em estado tripleto é transferida para o oxigênio ou outras biomoléculas através da transferência de elétron que culmina em danos diretos às biomoléculas através da formação de espécies ativas de oxigênio, por exemplo, o radical superóxido. No mecanismo TIPO II, o tempo de vida do estado tripleto é grande o suficiente para permitir que a energia de excitação seja transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singlete, que é extremamente eletrofílico, sendo capaz de causar danos em membranas, proteínas e DNA, tanto por ação direta quanto por formação de radicais a partir do oxigênio singlete⁴⁷.

Ambos os processos são de particular interesse para a PDT, uma vez que conduzem à formação de moléculas muito reativas, mas estudos mostram que geralmente o efeito fotodinâmico ocorre pelo mecanismo TIPO II⁴⁸. O oxigênio singlete pode efetuar várias reações com substratos biológicos, como oxidação e ciclo-adição, levando ao dano em biomoléculas e induzindo à morte celular⁴⁷.

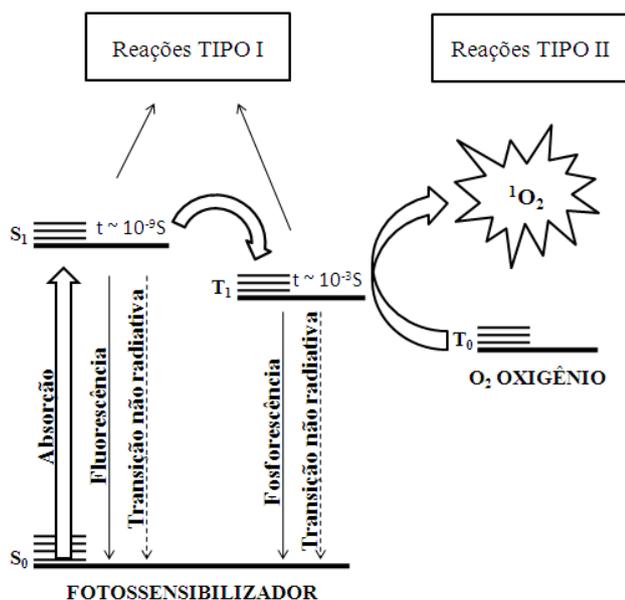


Figura 3 - Diagrama de Jablonski simplificado e mecanismo de ação da PDT⁴⁹. S- níveis de energia; S₀– estado eletrônico singlete fundamental; S₁- primeiro estado eletrônico singlete; T₀- estado tripleto fundamental; T₁- estado tripleto.

A Figura 3 ilustra o diagrama de Jablonski que representa os estados energéticos de uma molécula e as transições entre eles. As transições entre os vários níveis eletrônicos são verticais e podem ocorrer por meio de transições radiativas e não radiativas. As radiativas estão relacionadas com a absorção da energia elevando o sistema para estados excitados de alta energia e o retorno para o estado fundamental ocorre com a emissão de fótons. As transições não radiativas podem ocorrer por diferentes mecanismos, por relaxação da rede que consiste na dissipação da energia entre sítios vizinhos⁴⁹.

Ainda, entre as transições de energia pode ocorrer a conversão interna, quando estados vibracionais de um estado eletronicamente excitado segue para estados excitados mais baixos, e também pode ocorrer transição cruzada, um tipo de transição não radiativa que pode dar origem à fosforescência. Os processos de desativação das moléculas são simultâneos e competitivos entre si, sendo importante determinar a contribuição de cada processo, ou seja, o

rendimento quântico de cada processo. Assim, espera-se que um bom FS faça cruzamento intersistemas, apresentando um alto rendimento quântico do estado tripleto e de geração de oxigênio singlete⁴⁹.

Entre as vantagens da PDT em relação ao uso dos agentes antimicrobianos tradicionais, temos primeiramente que a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com os agentes anti-sépticos e antibióticos. Além disso, a morte celular mediada pela liberação de radicais livres torna o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos improvável. Também, o uso do FS ou da luz sozinhos não apresentam efeito significativo sobre a viabilidade das bactérias, de modo que a ação antimicrobiana da terapia fica restrita à região corada e irradiada simultaneamente⁵⁰. Finalmente, o caráter atraumático da PDT mostra-se bastante aplicável a pacientes especiais e pediátricos.

2.3. Histórico da terapia fotodinâmica

A terapia baseada em luz não é nova. O uso de FS exógenos para melhorar a eficácia da fototerapia foi descrito no Atharva Veda, um livro indiano sagrado datado de 1400 a.C. Civilizações antigas como a Índia, Egito e China, usavam a ação fotodinâmica através da ingestão de plantas contendo psoralenos, associadas à exposição da luz solar, para tratamento de doenças de pele, como vitiligo e psoríase, que o filósofo grego Heródoto chamava de Helio Terapia⁴⁷.

A PDT contemporânea começou em 1900, quando Oscar Raab⁵¹ observou, acidentalmente, que um meio de cultura contendo baixas concentrações de corante de acridina, exposto a uma luz intensa (neste experimento foram utilizados os raios de uma tempestade) apresentava como consequência a morte do paramécio cultivado, o protozoário causador da malária⁴⁷.

Em 1903, Von Tappeiner e Albert Jesionek⁵², realizaram o tratamento de carcinomas de células basais com a aplicação tópica de solução de eosina a 5% e posterior exposição à luz branca ou à luz solar. O termo Photodynamische Wirkung (Efeito Fotodinâmico), foi então

cunhado por Tappeiner e Jodlbauer, para todas as reações fotobiológicas envolvendo um FS, que ocorrem na presença de oxigênio molecular e levam à destruição de células⁴⁷.

Os efeitos biomédicos dessa terapia passaram a interessar ainda mais a comunidade científica desde o desenvolvimento do primeiro laser comercial em 1960. 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 biológicos⁴⁷.

O grande avanço da PDT ocorreu com a descoberta da primeira geração de FS, os derivados da hematoporfirina, começando com Schwartz⁵³ no início da década de 60 e então, na década de 70, os estudos se voltaram para a utilização da PDT em microrganismos. Em 1976 Weishaupt e colaboradores⁵³ postularam que o oxigênio singleto gerado nas reações fotoquímicas era o agente citotóxico responsável pela morte celular. Na busca por novos FS mais específicos, fotoativos e com menos efeitos colaterais, surgiu, na década de 90, a chamada segunda geração de fármacos (ftalocianinas, clorinas, bacterioclorinas) e a terceira geração (compostos fotossensíveis de segunda geração modificados: Visudyne® e outros)^{46, 47}.

Os primeiros trabalhos utilizando a PDT sobre bactérias bucais^{13, 17, 54-57} demonstraram que um grande número dessas bactérias, incluindo-se as periodontopatogênicas e as cariogênicas, eram susceptíveis a PDT. Assim, adaptou-se a utilização de uma técnica empregada a pacientes oncológicos para combater bactérias bucais, surgindo daí o interesse em desenvolver um método de descontaminação da dentina cariada¹⁰.

2.4. Os fotossensibilizadores

Diversos fotossensibilizadores (FS), como os corantes xantenos e os fenotiazínicos, com finalidade antimicrobiana são estudados e testados para odontologia⁵⁰. Dentre os mais comuns estão o azul de metileno e o azul de toluidina, da família das fenotiazinas^{58, 59}, e o rosa de bengala, a eosina, a eritrosina e a fluoresceína, que são corantes xantenos^{8, 60}.

É importante que os FS possuam algumas propriedades gerais⁴⁶ como:

- ✓ mínimo efeito tóxico às células normais;

- ✓ fotossensibilidade não prolongada;
- ✓ simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado;
- ✓ farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
- ✓ facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis;
- ✓ facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade;
- ✓ facilidade de análise total dos componentes da fórmula, inclusive com fornecimento de roteiros de validação;
- ✓ alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade).

2.4.1. Azul de metileno

O azul de metileno (MB) é um composto fenotiazínico aromático heterocíclico de cor azul, solúvel em água, com absorção máxima na região do vermelho visível ($\lambda = 660\text{nm}$). Apresenta baixa toxicidade, uma vez que este composto é utilizado na área médica para uma série de finalidades terapêuticas, como tratamento de metahemoglobinemia, antídoto para envenenamento por monóxido de carbono e cianureto e como marcador cirúrgico de ressecção de tumores, em concentrações muito superiores às utilizadas na PDT¹². A massa molar do MB é 319,85 g/mol, e sua fórmula molecular⁶¹, $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$, está representada na Figura 4.

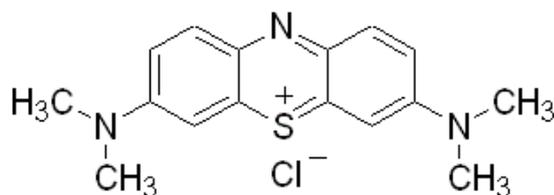


Figura 4 – Estrutura molecular do azul de metileno⁶¹.

2.4.2. Azul de o-toluidina

O azul de *orto*-toluidina (TBO) ou cloreto de tolônio também é um composto fenotiazínico e apresenta estrutura química e propriedades físico-químicas similares às do MB⁶². A derivação *orto* refere-se à posição em que o grupo metilo (-CH₃) está ligado ao grupo funcional amino (-NH₂). Esse composto tem sido usado como hemostático, corante biológico, pigmento da lã e da seda, ajuda diagnóstica para neoplasmas orais e gástricos, e na identificação da glândula paratireóide na cirurgia da tireóide. O TBO tem sido bastante empregado na PDT aplicada sobre microrganismos cariogênicos^{3, 4, 6, 7, 9-11}. Sua massa molar é 107,17 g/mol, e sua fórmula molecular⁶³, C₁₆H₁₆N₃S, está representada da Figura 5.

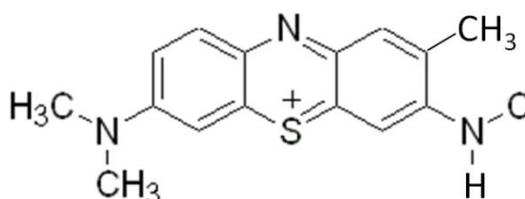


Figura 5 – Estrutura molecular do azul de o-toluidina⁶³.

2.4.3. Verde de malaquita

O verde malaquita (MG) é um corante usado como rotina na clínica odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, principalmente com o biofilme dentário¹⁹. Também é usado como corante biológico para análise microscópica de células e amostras de tecidos. O MG apresenta uma banda de absorção na região vermelha do espectro eletromagnético. Sua molécula é catiônica, pertencente à família dos trifenilmetanos com três anéis benzênicos, e sua fórmula molecular⁶⁴ é C₂₃H₂₅N₂, representada na Figura 6. O MG foi utilizado como FS para aplicação da PDT sobre o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, que ocupa um papel importante na ecologia das periodontites localizadas e generalizadas¹⁹. Também a viabilidade do *Staphylococcus aureus* foi testada com a aplicação da PDT e utilização do MG como FS⁶⁴.

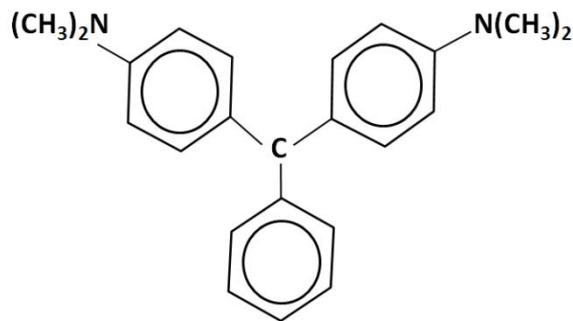


Figura 6 – Estrutura molecular do verde de malaquita⁶⁴.

2.5. Fontes de luz

Dentre as fontes de luz utilizadas, o laser é bastante empregado para ativar os FS devido às propriedades que o mesmo apresenta: concentração elevada de energia, baixa divergência, coerência e monocromaticidade. É possível iluminar um meio composto por materiais diversos e só interagir com um determinado componente. A essa característica do laser damos o nome de seletividade e ela ocorre devido à propriedade da monocromaticidade, que nos permite selecionar o comprimento de onda da luz laser de tal forma que ela só interaja com uma determinada molécula, dentro de um universo de várias moléculas⁴⁶.

O uso do LED como fonte luminosa na PDT tem sido discutido em alguns estudos^{10, 54, 65}, pois comparado ao laser de baixa potência também produz irradiação num comprimento de onda específico, porém em uma faixa mais ampla no espectro eletromagnético, favorecendo a obtenção de complementaridade com os FS utilizados. Além disso, apresenta custo menor, o que permitiria uma maior popularização desta técnica⁴⁶.

2.6. A terapia fotodinâmica e a cárie dentária

A aplicação da PDT sobre os microrganismos relacionados com o desenvolvimento da cárie dentária, principalmente o *Streptococcus mutans*, tem se mostrado efetiva de acordo com alguns estudos realizados:

BURNS; WILSON; PEARSON (1995)⁵ avaliaram o efeito da PDT sobre suspensões de *S. mutans* presentes em dentina humana, com a utilização de azul de toluidina a 0,1; 0,05 e 0,025 mg/mL ou fitalocianina dissulfonada de alumínio (AlPcS₂) como FS, e laser de hélio e neônio (HeNe) com 633 nm ou laser diodo de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) com 660 nm. Quando fatias de dentina com vários graus de desmineralização estavam interpostas entre a luz laser e a suspensão bacteriana, um efeito bactericida da ordem de 10⁷ UFC foi encontrado. Os resultados desse estudo sugeriram não haver relação entre a proporção de morte bacteriana e o grau de desmineralização da dentina ao passo que maiores dosagens de energia promoviam um aumento na proporção de mortes. Quando os microrganismos estavam embebidos em uma matriz de colágeno no momento da irradiação a redução no número de microrganismos (10⁸ até 10¹⁰ UFC) foi observada, sugerindo que a PDT pode ser efetiva sobre *S. mutans* mesmo quando as bactérias estão embebidas em dentina desmineralizada.

WILLIAMS *et al.* (2003)⁶ aplicaram a PDT sobre cultura de *S. mutans*, utilizando como FS o azul de o-toluidina a 0,013 mg/mL e como fonte de luz o laser diodo com comprimento de onda de 633 nm e potência de 20 a 80mW. A exposição dos microrganismos à luz foi de 5 a 60 segundos e os resultados mostraram que a ação antimicrobiana da PDT foi efetiva. Esse resultado também foi encontrado por ZANIN e colaboradores (2005)⁷, que utilizaram o mesmo FS a 0,1 mg/mL e microrganismo, porém outras duas fontes de luz: o laser HeNe, com comprimento de onda de 632,8 nm, e o LED, com comprimento de onda de 638,8 nm, 32 mW de potência e densidade de energia entre 49 e 294 J/cm². A exposição dos microrganismos à luz foi realizada em 5, 15 ou 30 minutos e observou-se redução de 99,99% da viabilidade das bactérias para ambas as fontes de luz constatando-se assim que o efeito bactericida é dose dependente.

Também PAULINO *et al.* (2005)⁶⁰ aplicaram a PDT em *S. mutans* e fibroblastos para verificar a toxicidade e seletividade do FS e da luz empregados. Utilizou-se como corante o rosa de bengala com variação da concentração de 0 a 0,05 mg/mL, e como fonte de luz um fotopolimerizador com comprimento de onda de 400 a 500 nm. A variação do tempo de exposição à PDT foi de 0 a 40 segundos. Os resultados mostraram que a luz aplicada isoladamente não produz ação bactericida e também não é tóxica às células. Entretanto, o FS

aplicado isoladamente em concentrações superiores a 0,0025 mg/mL apresentou efeito tóxico à viabilidade celular. A associação da luz e FS a 0,0005 mg/mL causou a completa inativação bacteriana sem afetar a viabilidade dos fibroblastos.

WOOD *et al.* (2006)⁸ aplicaram eritrosina, *Photofrin*® e azul de metileno como FS sobre *S. mutans*, utilizando como fonte de luz um filamento de tungstênio/luz branca. Os três FS foram utilizados na concentração de 1 mg/mL e o comprimento de onda da luz aplicada variou entre 500 e 550 nm com 22.7 mW/cm² de potência para a eritrosina, e entre 600 e 650 nm com 22.5 mW/cm² de potência para o azul de metileno e para o *Photofrin*®. Os microrganismos foram expostos à luz durante 15 minutos e os resultados mostraram que a eritrosina causou maior destruição celular comparada ao *Photofrin*® e azul de metileno. METCALF e colaboradores (2006)⁶⁶ também utilizaram a eritrosina e um filamento de tungstênio/luz branca na mesma concentração, comprimento de onda e potência, com períodos de exposição fracionados. O maior efeito bactericida ocorreu em 10 aplicações com 30 segundos de exposição e intervalo de 2 minutos entre as exposições.

ZANIN *et al.* (2006)⁴ aplicaram a PDT sobre *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. sanguinis*, utilizando como FS o azul de o-toluidina a 0,1 mg/mL e como fonte de luz um LED com comprimento de onda de 638,8 nm e 32 mW de potência. A exposição à luz foi realizada durante 7 minutos e observou-se que houve redução de 95% de *S. mutans* e *S. sobrinus* e redução de 99,9% de *S. sanguinis*. Estes resultados também foram encontrados por BEVILACQUA e colaboradores (2007)⁹. Foram utilizados o mesmo corante e fonte de luz, com a mesma concentração e comprimento de onda de 640 nm, e 116 mW de potência, sobre *S. mutans*. Após um período de 180 segundos de exposição à luz observou-se 100% de morte celular.

GIUSTI *et al.* (2008)¹⁰ aplicaram a PDT sobre *Lactobacillus acidóphilos* e *S. mutans* utilizando como FS a hematoporfirina a 1, 2 e 3 mg/mL, e também o azul de o-toluidina a 0,025 e 0,1 mg/mL. A fonte de luz empregada foi o LED com comprimento de onda de 630 nm e 200 mW de potência. Após exposição dos microrganismos à luz durante 60 e 120 segundos, observou-se redução bacteriana. A maior redução bacteriana resultou da associação da aplicação de azul de o-toluidina com concentração de 0,1 mg/mL e dose de luz de 48 j/cm².

ARAÚJO *et al.* (2009)¹¹ aplicaram a PDT em suspensões de *S. mutans*, utilizando um laser vermelho durante um minuto associado a dois FS: azul de o-toluidina ou azul de

metileno, com concentrações de 0,005; 0,01 e 0,025 mg/mL. Os resultados mostraram que houve uma redução bacteriana de 70% para o azul de o-toluidina e de 73% para o azul de metileno, ambos na concentração de 0,025 mg/mL. O uso do azul de metileno a 0,005mg/mL causou uma redução de 48%. Para as outras concentrações testadas não se observou nenhuma redução significativa em relação ao grupo controle.

LIMA *et al.* (2009)³ aplicaram a PDT em dentina cariada produzida *in situ*. Durante quatorze dias, vinte voluntários utilizaram placas contendo dentina humana em que aplicaram solução de sacarose a 40% dez vezes ao dia. Após esse período foi realizada a aplicação da PDT com a utilização do azul de o-toluidina a 0,1 mg/mL como FS associado a um LED com comprimento de onda de 638,8 nm e com densidade de energia de 47 ou 94 J/cm², irradiados durante cinco ou dez minutos respectivamente. As amostras de dentina foram avaliadas em relação à quantidade total de *Streptococcus*, *S. mutans* e *Lactobacillus* antes e após a aplicação da PDT. Em escala logarítmica, os resultados mostraram que para os períodos de cinco e dez minutos a diminuição de *Streptococcus* foi de 3,45 log₁₀ e 5,18 log₁₀; de *S. mutans* foi de 3,08 log₁₀ e 4,16 log₁₀; de *Lactobacillus* foi de 3,24 log₁₀ e 4,66 log₁₀, e para o total de microrganismos houve diminuição de 4,29 log₁₀e 5,43 log₁₀, respectivamente. Assim, a PDT mostrou-se efetiva na diminuição de microrganismos presentes em dentina cariada *in situ*.

BAPTISTA (2009)¹² inocularam *S. mutans* em ratos, submetidos à dieta cariogênica, para estimular o desenvolvimento da lesão cariada. A PDT foi aplicada nos animais utilizando como FS o azul de metileno, na concentração de 0,03 mg/mL, e como fonte de luz um LED com comprimento de onda de 640 nm, 240 mW de potência e fluência de 86J/cm², por 3 min. Os resultados obtidos sugerem que foi possível a indução de lesões de cárie *in vivo*, e que a PDT com finalidade antimicrobiana foi efetiva na redução de microaerófilos totais, nos parâmetros testados.

MAISCH *et al.* (2009)⁶⁷ aplicaram a PDT sobre *S. mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e utilizaram como FS o Photosan®, um derivado da hematoporfirina, nas concentrações de 0.0005; 0.001; 0.005; 0.01; 0.05 e 0.1 mg/mL, com adição de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% ao FS para o *A. actinomycetemcomitans*. A fonte de luz utilizada foi um LED com comprimento de onda de 450 nm e o tempo de exposição à luz foi de 60 ou 120 segundos sobre o *S. mutans* e o *E. faecalis*, e de 20, 30, 60, 90 e 120 segundos sobre o *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados mostraram que ocorreu 99,9% de morte bacteriana, uma redução de 3 log₁₀. Com a adição de

EDTA a 10% ocorreu redução de 4 log₁₀ e o EDTA, o FS e a LED isoladamente não causaram morte bacteriana.

Finalmente, BOLEAN e colaboradores (2010)⁶⁸ avaliaram a presença de “proteínas de choque térmico” (Heat-shock proteins – HSPs), que são indicadoras de condições de estresse e podem afetar a viabilidade celular, no *S. mutans* após a aplicação da PDT a fim de verificar o estresse que a terapia pode causar sobre o microrganismo. Como FS foi utilizado o rosa de bengala a 0.00009 mg/mL associado a um fotopolimerizador com comprimento de onda entre 400 e 500 nm, e o tempo de exposição à luz foi fracionado em quatro ciclos com 30 segundos de duração cada. Alta expressão de HSP foi detectada na bactéria após a aplicação da PDT comparada à aplicação isolada da luz ou do FS e não foi observada degradação do DNA após a aplicação da PDT.

Neste contexto, a PDT pode ser uma alternativa interessante na redução microbiana e, conseqüentemente, um importante coadjuvante no tratamento das lesões cariosas. Sendo assim, quaisquer contribuições teórico-práticas nesta linha de pesquisa são de grande valia, não só para aumentar o acervo de conhecimentos científicos, mas também para fornecer respaldo científico à democratização do acesso aos usuários da terapia.

No Quadro 1 encontram-se os dados resumidos utilizados nos estudos revisados.

Quadro 1 – Estudos realizados com a aplicação da PDT sobre microrganismos cariogênicos.

AUTOR(ES)/ ANO	TIPO DE ESTUDO	FS EMPREGADO	FONTE DE LUZ UTILIZADA	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
BURNS; WILSON; PEARSON (1995) ⁵	<i>In vitro</i> – <i>S. mutans</i> suspensões de dentina humana	TBO 0,1; 0,05 e 0,025 mg/mL e AlPcS ₂	Laser HeNe 633 nm e laser GaAlAs 660 nm	-
WILLIAMS <i>et al.</i> (2003) ⁶	<i>In vitro</i> cultura <i>S. mutans</i>	TBO 0,013 mg/mL	Laser diodo 633 nm 20 a 80 mW	5 a 60 s
ZANIN <i>et al.</i> (2005) ⁷	<i>In vitro</i> <i>S. mutans</i>	TBO 0,1 mg/mL	HeNe 632,5 nm LED 638,8 nm 32 mW	5, 15 ou 30 min

PAULINO <i>et al.</i> (2005) ⁶⁰	<i>In vitro</i> <i>S. mutans</i> e fibroblastos	Rosa de bengala 0-0,05 mg/mL	Fotopolimerizador 400-500 nm	0 a 40 s
WOOD <i>et al.</i> (2006) ⁸	<i>In vitro</i> <i>S. mutans</i>	Eritrosina, <i>Photofrin</i> ® e MB 1 mg/mL	Filamento de tungstênio 500-550 nm/ 600-650 nm	15 min
METCALF <i>et al.</i> (2006) ⁶⁶	<i>In vitro</i> <i>S. mutans</i>	Eritrosina 1 mg/mL	Luz branca 500-550 nm 22,7 mW	10x30 s
ZANIN <i>et al.</i> (2006) ⁴	<i>In vitro</i> - <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> e <i>S. sanguinis</i>	TBO 0,1 mg/mL	LED 638,8 nm 32 mW	7 min
BEVILACQUA <i>et al.</i> (2007) ⁹	<i>In vitro</i> <i>S. mutans</i>	TBO 0,1 mg/mL	LED 640 nm 116 mW	180 s
GIUSTI <i>et al.</i> (2008) ¹⁰	<i>In vitro</i> <i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i>	Hematoporfirina 1,2 3 mg/mL e TBO 0,025 e 0,1 mg/mL	LED 630 nm 200 mW	60 e 120 s
ARAÚJO <i>et al.</i> (2009) ¹¹	<i>In vitro</i> suspensões de <i>S.</i> <i>mutans</i>	TBO e MB 0,005; 0,01 e 0,025 mg/mL	Laser vermelho	1 min
LIMA <i>et al.</i> (2009) ³	<i>In situ</i> - <i>S. totais</i> , <i>S. mutans</i> e <i>Lactobacillus</i>	TBO 0,1 mg/mL	LED 638,8 nm 47 ou 94 J/cm ²	5 e 10 min
BAPTISTA (2009) ¹²	<i>In vivo</i> ratos	MB 0,03 mg/mL	LED 640 nm 240 mW 86 J/cm ²	3 min
MAISCH <i>et al.</i> (2009) ⁶⁷	<i>In vitro</i> - <i>S. mutans</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>A.</i> <i>actinomycetemcomi</i> <i>tans</i>	<i>Photosan</i> ® 0.0005; 0.001; 0.005; 0.01; 0.05 e 0.1 mg/mL	LED 450 nm	60 ou 120 s/ 20, 30, 60, 90 e 120 s
BOLEAN <i>et al.</i> (2010) ⁶⁸	<i>In vitro</i> - <i>S. mutans</i> e HSPs	Rosa de bengala 0.00009 mg/mL	Fotopolimerizador 400-500 nm	4x30 s

2.7. Permeabilidade dentinária

A permeabilidade refere-se ao estado ou característica de permitir a passagem especialmente de fluídos, íons, bactérias e minúsculas partículas. Na física, ela se refere à simples passagem ou difusão através do corpo ou tecido sob condições normais. Muitos fatores podem afetar essa “passagem”, incluindo a área exposta, a estrutura e a química do tecido envolvido, a espessura do tecido e a pressão exercida durante o processo. O tamanho da partícula também é um fator importante na permeabilidade, bem como a presença de interações químicas entre a dentina e o agente penetrante²⁶.

As observações sobre a vitalidade do esmalte e da dentina tiveram início em 1854 quando KOELLIKER constatou a presença de um fluído no interior da estrutura dentária. Os primeiros interesses relacionados à permeabilidade ocorreram quando M'QUILLEN, em 1866, demonstrou a presença de canalículos ou túbulos no tecido dentinário e, desde então, a dentina foi tratada como um tecido permeável por sua própria natureza. Em 1910, KIRK descreveu a histologia da dentina e chamou a atenção dos clínicos para a existência dos canalículos dentinários⁶⁹.

A dentina constitui a massa principal do dente e lhe dá a forma geral. É caracterizada como sendo um tecido duro com túbulos contendo prolongamentos de células especializadas em toda sua extensão. A dentina é composta por 35% de matéria orgânica e água, e por 65% de material inorgânico. Sua porção orgânica é constituída principalmente de colágeno e, em menor proporção, contém substância orgânica fundamental de mucopolissacarídeos. A porção inorgânica constitui-se basicamente de cristais de hidroxiapatita, cuja unidade tem como fórmula $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$, e também contém pequenas quantidades de fosfatos, carbonatos e sulfatos^{70, 71}.

Os túbulos dentinários têm um trajeto em curva suave que se assemelha a um “S” na porção coronária do dente e seu diâmetro e volume variam dependendo da idade e localização que se encontram dentro da dentina. Os túbulos geralmente são mais separados nas camadas periféricas e mais agrupados próximo da polpa, atingindo a relação de 5:1 entre as superfícies externa e interna da dentina. Além disso, possuem maior diâmetro junto à cavidade pulpar (3 a 4 μm) e menor diâmetro em suas extremidades externas (1 μm). Cerca de 80% do volume total da dentina próximo à polpa compreende os lúmens dos túbulos, que constituem apenas

4% do volume da dentina periférica. Há cerca de 45 mil túbulos por mm^2 perto da polpa e aproximadamente 20 mil periféricamente^{70,71}.

Por muito tempo o estudo da permeabilidade dentinária foi realizado de modo qualitativo²¹. Em 1933, FISH²⁰ estudou a permeabilidade dentinária do corante azul de metileno, utilizado para coloração histológica. Os dentes permaneceram no corante por um tempo de 24 horas a temperatura de 37 graus centígrados e observou-se que nas áreas em que a dentina se apresentava hipermineralizada, a permeabilidade estava acentuadamente reduzida. Os próximos testes de penetração em dentina foram realizados com a utilização de radioisótopos, como nicotinamida, uréia, tiouréia e acetamida. Esses compostos foram bastante utilizados no estudo da permeabilidade⁶⁹ uma vez que não ionizam facilmente, e sua permeação não é muito influenciada pela presença de íons, como ocorre com os compostos inorgânicos. Esses radioisótopos demonstraram capacidade de difusão e rápida permeação em esmalte²¹.

A necessidade de informações mais concretas fez com que os estudos se tornassem quantitativos. O Índice de Permeabilidade Dentinária (IPD) proposto por MARSHALL; MASSLER; DUTE em 1960²³ foi a primeira tentativa no sentido de quantificar a permeabilidade dentinária radicular. Eles avaliaram a permeação dos radioisótopos sulfato de sódio, cloreto de sódio, iodeto de sódio isotônico e fosfato de sódio após a instrumentação de canais radiculares com diversas soluções irrigadoras. Foram obtidas radiografias periapicais dos dentes tratados e cada hemisseção radicular das imagens foi dividida em terços cervical, médio e apical. Cada um desses terços foi subdividido em três partes, tanto no sentido transversal quanto no sentido longitudinal, perfazendo um total de nove quadrados para cada área delimitada. A permeação foi quantificada em 1,2 e 3 de acordo com o número de terços atingidos, e a partir desses escores calculou-se a taxa de permeação por meio da multiplicação da média da profundidade pela média da extensão obtida.

ANDERSON & RONNING (1962)²² avaliaram a permeabilidade da dentina coronária após confeccionarem secções dentinárias por meio de instrumentos rotatórios ou fratura da coroa. Comparando essas duas formas de obtenção das secções, eles observaram que nos cortes obtidos por instrumentos rotatórios, havia menos permeabilidade em relação aos cortes obtidos por fraturas. A presença de débris nas secções dentinárias obtidas por instrumentos rotatórios parece impedir uma maior infiltração nos canalículos dentinários.

A influência de fatores como a área da dentina exposta e sua espessura²⁴, bem como o efeito do tamanho das moléculas utilizadas no estudo da permeabilidade foram descritos²⁵. Também a influência do plasma e dos constituintes salivares sobre a permeabilidade dentinária foram avaliados⁷². Proteínas do plasma, soro e microrganismos salivares, como o *Bacteroides melaninogenicus*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans*, parecem ser capazes de causar a redução da permeabilidade dentinária⁷².

A partir da década de 90, os estudos sobre permeabilidade dentinária passaram a avaliar as interações dos agentes clareadores⁷³⁻⁷⁵, como o peróxido de carbamida e o peróxido de hidrogênio, os quais podem causar alterações pulpares, os efeitos dos agentes dessensibilizantes⁷⁶ e a permeação de sistemas adesivos^{26, 77}. Alguns estudos encontram-se resumidos no Quadro 2.

Quadro 2 – Dados resumidos sobre estudos de permeabilidade realizados.

AUTORES/ANO	AMOSTRAS	PRODUTO TESTADO	EQUIPAMENTO UTILIZADO	TEMPO AVALIADO
HANKS; WATAHA; CORCORAN, 1993 ⁷³	12 discos de dentina 0,5mm molares permanentes humanos	3 marcas comerciais (Peróxido de Carbamida 10-15%) 3 marcas comerciais (Peróxido de Hidrogênio 2-10%)	Câmara pulpar <i>in vitro</i> (IVPC)	15 min, 1h e 6 h a 37°C
BENETTI <i>et al.</i> , 2004 ⁷⁸	60 incisivos laterais bovinos com medidas semelhantes	- água destilada - Peróxido de Carbamida 10% e 35%	Espectrofotômetro UV 1203 a 596 nm	60 min a 37°C
GOKAY; MÜJDECI; ALGIN, 2004 ⁷⁴	24 incisivos centrais superiores humanos	Peróxido de Hidrogênio a 6,5% e 14%	Espectrofotômetro UV 1601 a 596 nm	30 min a 37°C
GOKAY; MÜJDECI; ALGIN, 2005 ⁷⁹	50 incisivos centrais superiores humanos com medidas semelhantes	- água destilada - Peróxido de Hidrogênio 5,3%; 6,5% e 8,7%	Espectrofotômetro UV 1601 a 596 nm	30 min a 37°C
CARVALHO; HABITANTE; MARQUES, 2005 ⁸⁰	20 dentes unirradiculares humanos cortes de 2mm perpendicular ao longo eixo da raiz	Azul de metileno 0,5% injetado dentro do canal instrumentado; permeabilidade dentinária fornecida pela Endo PTC	Programa de Leitura de Imagem (Imagelab) – leitura da área de dentina corada	15 min de permanência do azul de metileno

CAMARGO <i>et al.</i> , 2007 ⁸¹	70 3 ^{os} molares humanos 70 incisivos laterais bovinos	Peróxido de Hidrogênio 38%	Espectrofotômetro UV 1203 a 596 nm	40 min
CAMARGO <i>et al.</i> , 2009 ⁷⁵	48 incisivos laterais bovinos com medidas semelhantes	Peróxido de Hidrogênio 35% ativado com LED, Laser Nd:YAG ou sem luz	Espectrofotômetro UV 1203 a 596 nm	20 min
SAURO <i>et al.</i> , 2009 ⁷⁷	72 segmentos de 3 ^{os} molares humanos não erupcionados	6 sistemas adesivos aplicados após lavagem com água ou etanol	Micropermeabilidade em microscopia confocal com dois fótons	-
PINTO <i>et al.</i> , 2010 ⁷⁶	84 dentes de rato 36 - <i>in vitro</i> 48 - <i>in vivo</i>	Nitrato de potássio 2% + fluoreto de sódio 2% gel; Fluoreto de sódio 2% verniz	Microscópio eletrônico de varredura Energia dispersiva de espectroscopia de raios-X	-

2.8. Espectroscopia fotoacústica

Em 1880, o escocês e inventor do telefone Alexander Graham Bell descobriu o efeito fotoacústico ao observar a incidência da luz solar, modulada por sua própria voz, sobre um sólido que tinha a forma de um diafragma e que estava em contato com um tubo. Ele observou então que essa montagem produzia um som audível. Posteriormente, Graham Bell estudou o efeito fotoacústico em líquidos e em gases. Ele observou que os efeitos sonoros induzidos dependiam da natureza das substâncias expostas à radiação e ainda do respectivo comprimento de onda absorvido pelo corpo, ou seja, ele estabeleceu na época que a intensidade do sinal fotoacústico dependia do coeficiente de absorção óptica da amostra⁸².

Subseqüentemente, Bell experimentou uma variedade de sólidos, líquidos e gases o que despertou muito interesse entre a comunidade científica. No entanto, foi com a invenção do microfone que as pesquisas envolvendo o efeito fotoacústico começaram a evoluir, inicialmente no estudo de gases. Somente na década de 70 do século passado é que, com a melhoria dos microfones e com a descrição teórica do efeito fotoacústico em sólidos, o efeito

passou a ser muito utilizado na pesquisa científica como uma ferramenta importante para a determinação das propriedades ópticas e térmicas de materiais⁸².

PARKER (1973)⁸³ e ROSENCWAIG & GERSHO (1976)⁸² propuseram um modelo padrão de célula fotoacústica para amostras sólidas que permitiu o desenvolvimento de toda a teoria que descreve o fenômeno. Em seus experimentos, eles demonstraram que o responsável pelo surgimento do sinal fotoacústico era o fluxo periódico de calor entre a superfície da amostra e o gás contido na célula fotoacústica, tratando-se, portanto, de um efeito fototérmico. Assim, a técnica passou a ser empregada nas mais diversas aplicações.

A espectroscopia fotoacústica (PAS) é uma técnica que permite a mensuração da penetração de uma substância em amostras não homogêneas e possibilita a realização de medidas de perfil de profundidade ao longo da amostra, como também a detecção de interações químicas com os componentes da amostra se realizadas em equipamentos capazes de transmitir energia na região do infravermelho. A técnica ocorre por meio do efeito fotoacústico que é gerado ao incidir-se um feixe de luz modulada sobre a amostra que se quer analisar. Essa amostra deve estar dentro de uma célula fotoacústica fechada que contenha um gás, que pode ser o próprio ar. A incidência da luz e sua absorção fazem com que haja uma excitação dos níveis internos de energia da amostra. Por um processo de desexcitação não radiativo, a radiação absorvida é transformada em energia térmica, ou seja, causa um aquecimento periódico local. Esse aquecimento periódico da amostra gera uma onda de pressão no gás em contato com ela e, acoplado à câmara, há um microfone que detecta a variação da pressão desse gás que resulta no sinal fotoacústico. Assim, é possível obter-se espectros de absorção óptica gerados pelo sinal fotoacústico devido à interação da matéria com uma radiação modulada de comprimento de onda conhecido²⁷.

Com o desenvolvimento da PAS diversos tipos de materiais passaram a ser estudados. Modificações químicas de acordo com diferentes graus de desmineralização em superfícies dentárias foram avaliadas com a técnica de espectroscopia fotoacústica em infravermelho (PA-FTIRS)²⁸ e também, a avaliação da permeação de diferentes substâncias em pele²⁹. Ainda, a permeação de agentes antifúngicos em unha foi mensurada em PAS³⁰. A técnica é muito sensível e permite avaliar amostras *in vivo*, *ex-vivo* ou *in vitro* com a possível detecção de baixas concentrações dos componentes absorvedores na amostra. Além disso, o método é não destrutivo o que permite que a amostra testada seja reutilizada em outros ensaios.

3. OBJETIVOS

- Avaliar *in vitro*, por meio da espectroscopia fotoacústica (PAS), a permeabilidade dentinária aos fotossensibilizadores azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita, empregados na PDT;

- Analisar o efeito de diferentes concentrações e tempos de exposição dos fotossensibilizadores sobre a permeabilidade dentinária;

- Avaliar *in vitro*, por meio da espectroscopia fotoacústica em infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-PAS), a existência de reações químicas entre os fotossensibilizadores azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita, e a dentina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá para o desenvolvimento desta pesquisa com a concessão dos dentes que foram utilizados encontra-se no ANEXO deste trabalho.

Para a realização da pesquisa foram utilizados trinta e seis dentes, molares ou pré-molares permanentes, humanos, hígidos e com indicação para extração, obtidos na Clínica Odontológica da Universidade Estadual de Maringá. Logo após a extração, os dentes foram limpos com gaze e água destilada ou solução fisiológica 0,9%, e então estocados em recipientes individuais contendo 5 mL de água destilada onde permaneceram até o momento em que foram realizados os cortes para confecção das amostras. Os dentes coletados foram utilizados para avaliação em espectroscopia fotoacústica (n=27) e para microscopia eletrônica de varredura e óptica (n=9).

4.1. Espectroscopia fotoacústica (PAS)

Para a avaliação da permeabilidade dos FS em amostras de dentina foram utilizados vinte e sete dentes, sendo que vinte e quatro desses dentes foram utilizados para a avaliação da permeabilidade em PAS e três dentes foram utilizados para avaliação de possíveis reações químicas existentes entre os FS empregados e a dentina em FTIR-PAS.

4.1.1. Confecção das amostras

Os dentes foram cortados em forma de bloco por um disco de diamante (South Bay Technology; Diamond Wheel, San Clement, California, USA) sob refrigeração acoplado a uma máquina de corte (IsoMet Low Speed Saw; Buehler, Lake Bluff, IL, USA), como mostra a Figura 7 (A). Cada dente originou um único bloco de amostra, sendo que os cortes foram realizados na seguinte ordem: (1) corte realizado a uma distância de 3 mm da junção amelo-

cementária, na região da dentina, com remoção da porção oclusal do dente, como mostra a Figura 7 (B) e (C); (2) corte realizado a uma distância de 2 mm da junção amelo-cementária, com obtenção de uma fatia de 0,4 mm de espessura considerando que a espessura do disco é de 0,3 mm, como mostra a Figura 7 (D); (3) remoção das faces laterais de esmalte das paredes vestibular, lingual, mesial e distal com lixa de granulação 600 (*NORTON®* Ind. Brasileira) acoplada a uma politriz DPU-10 (Panambra, São Paulo, Brasil) sob refrigeração, tomando-se cuidado para remover toda essa camada; (4) cortes em dentina, também na politriz, para obtenção de blocos com medidas de 4 mm (comprimento) x 4 mm (largura) x 0,4 mm (espessura) como esquematizado nas Figuras 8, 9 e 10, e; (5) padronização da *smear layer* das superfícies oclusal e pulpar com leve pressão sobre a lixa de granulação 600 sob refrigeração com monitoramento para não diminuir a espessura utilizando um micrômetro digital (Mitutoyo® Digimatic Micrometer; Kanagawa, Japan).

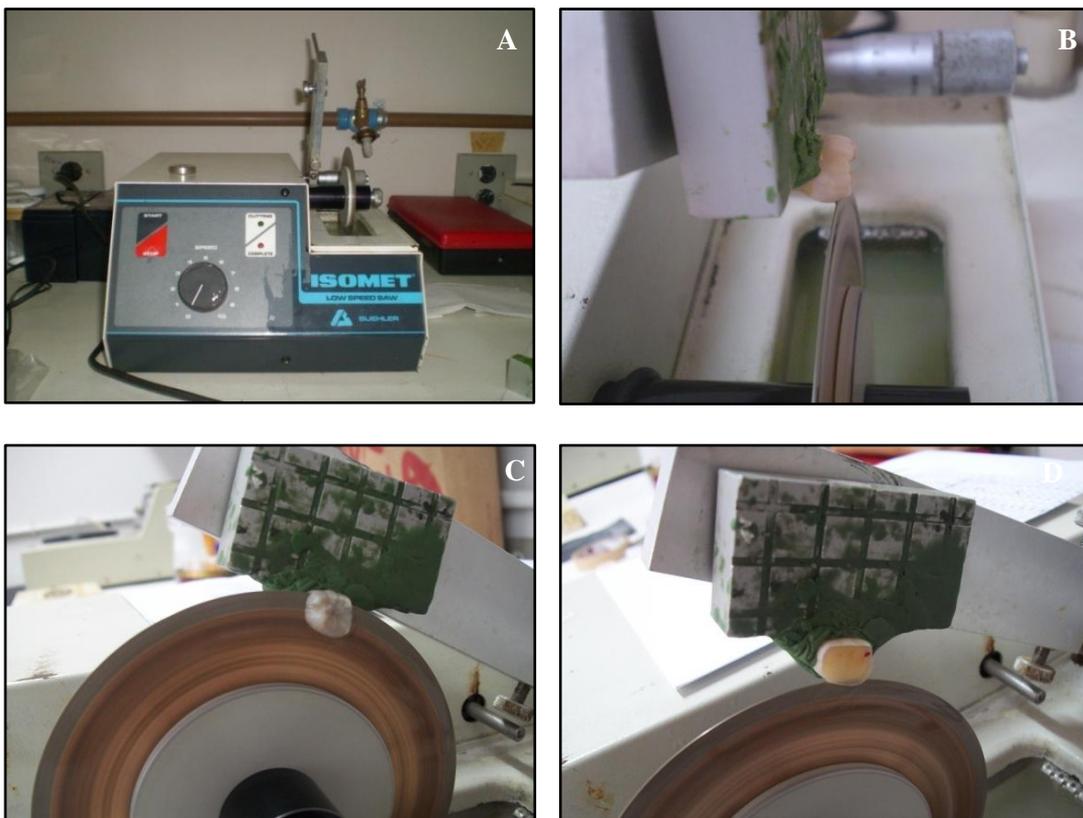


Figura 7 – (A) Máquina utilizada para cortar as amostras; (B) dente posicionado para iniciar o corte; (C) realização do primeiro corte; (D) realização do segundo corte, notar a marca vermelha feita para distinguir as superfícies.

Após a realização do primeiro corte, a superfície oclusal da futura amostra foi marcada com um esmalte de unhas vermelho (Risqué® Love) para distinguir as duas superfícies que seriam similares após a realização do segundo corte. Durante a remoção das paredes

vestibular, lingual, mesial e distal a marcação foi refeita para que as superfícies não fossem trocadas e para então determinar: superfície oclusal, com a marcação do esmalte e correspondente a superfície em que o FS seria posteriormente aplicado e, superfície pulpar, superfície oposta, sem marcação com esmalte e que seria submetida a desgastes progressivos.

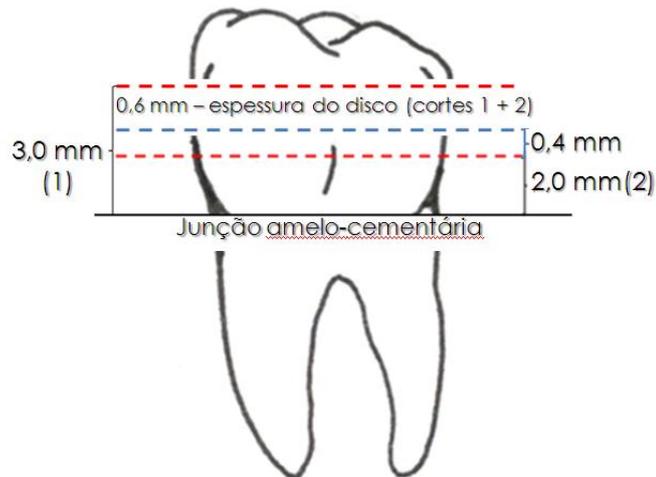


Figura 8 – Traço vermelho indicando o local de realização dos primeiro (1) e segundo (2) cortes.

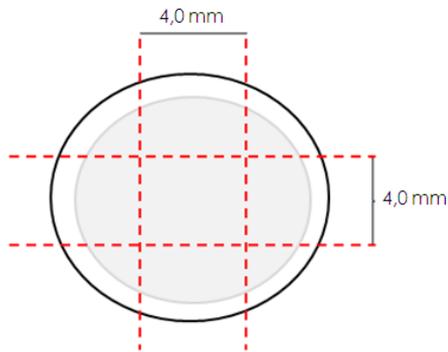


Figura 9 – Vista oclusal esquemática com as proporções adotadas para obtenção da amostra.

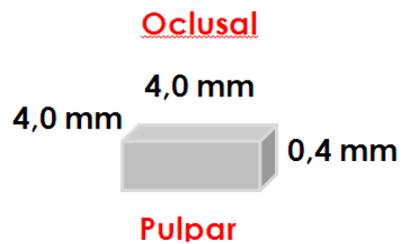


Figura 10 – Dimensões da amostra de dentina obtida.

As amostras obtidas, cujo aspecto final está representado na Figura 11 (A), foram armazenadas em recipientes identificados contendo 5 mL de água destilada, ilustrado na Figura 11 (B), e os remanescentes dentários também foram estocados em água destilada para utilização em outras pesquisas.

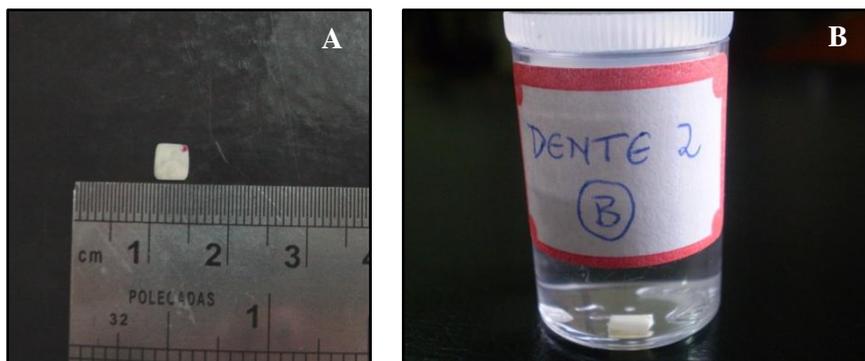


Figura 11- (A) Aspecto final da amostra; (B) recipiente contendo a amostra.

4.1.2. Os fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FS) azul de metileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), azul de orto-toluidina (Nuclear Produtos Para Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil) e verde de malaquita (Synth Produtos Para Laboratórios Ltda, São Paulo, Brasil) foram diluídos em água destilada e preparados nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL. Esses FS, representados na Figura 12, permaneceram estocados em recipientes isolados da luz e mantidos a temperatura ambiente.

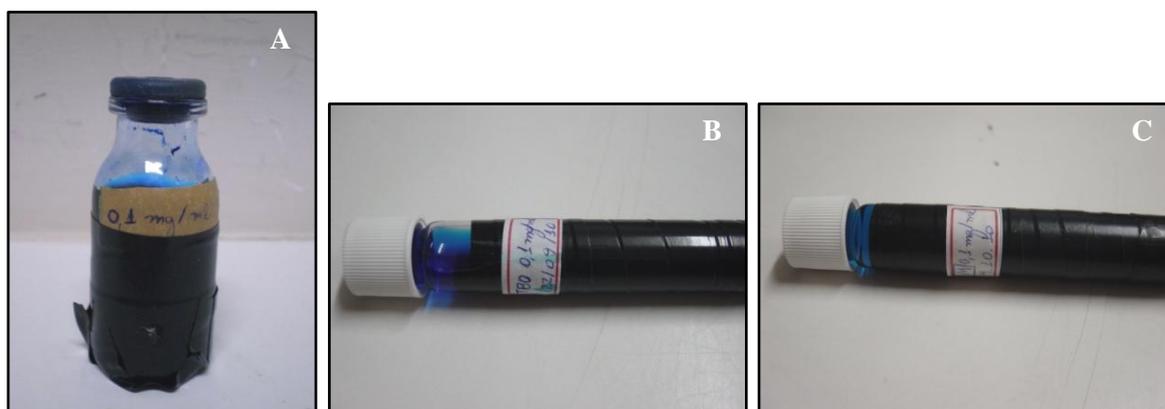


Figura 12 - (A) MB 0,1 mg/mL; (B) TBO 0,1 mg/mL; (C) MG 0,1 mg/mL.

Uma alíquota de 10 μ L do FS a ser testado foi aplicada sobre a superfície oclusal da amostra com auxílio de uma pipeta volumétrica (FINNPIPETTE® F1 Thermo Scientific) onde permaneceu durante 1, 5 ou 30 minutos. As amostras foram distribuídas aleatoriamente em grupos que variavam a concentração e o tempo de exposição aos FS empregados como mostra o Quadro 3.

Quadro 3 – Distribuição das amostras de acordo com a concentração e tempo de exposição aos FS empregados.

	Concentração de 0,1 mg/mL 30 minutos	Concentração de 0,1 mg/mL 5 minutos	Concentração de 0,1 mg/mL 1 minuto	Concentração de 0,01 mg/mL 5 minutos
Azul de Metileno (MB)	3 amostras	3 amostras	1 amostra	1 amostra
Azul de O-Toluidina (TBO)	3 amostras	3 amostras	1 amostra	1 amostra
Verde de Malaquita (MG)	3 amostras	3 amostras	1 amostra	1 amostra

Após o período de exposição ao FS aplicado, o excedente foi removido com auxílio de um cotonete, com leve pressão, e a amostra corada foi posicionada na célula fotoacústica para realização da leitura em PAS, como mostra a Figura 13. A aplicação do FS sobre a amostra foi realizada imediatamente antes da leitura, e as leituras das amostras de cada grupo foram realizadas de forma consecutiva assim as leituras do próximo grupo se iniciaram apenas com a conclusão das leituras do grupo anterior.

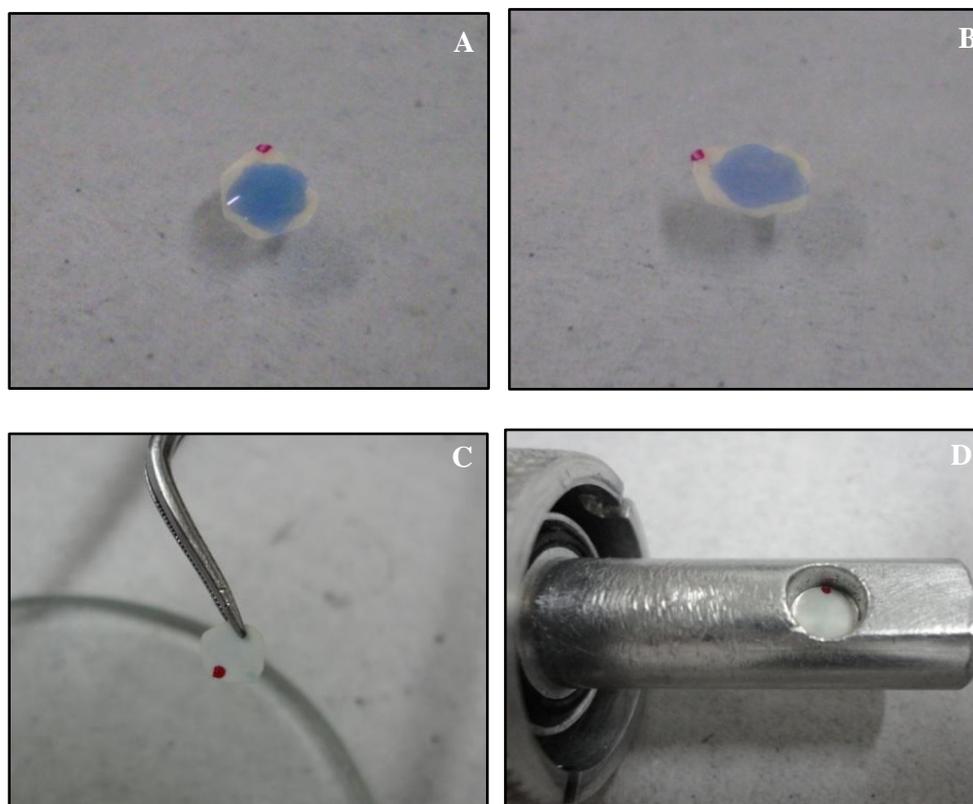


Figura 13 - (A) MB 0,1 mg/mL recém aplicado sobre a amostra; (B) amostra com MB 0,1 mg/mL 30 minutos após sua aplicação; (C) amostra com MB 0,01 mg/mL 5 minutos após sua aplicação; (D) amostra com MB 0,01 mg/mL 5 minutos após sua aplicação posicionada na célula.

4.1.3. *Leitura em PAS*

Para avaliação da profundidade de permeação do FS em dentina a técnica da espectroscopia fotoacústica (PAS) foi utilizada. Foram realizadas leituras das superfícies oclusal e pulpar de cada amostra previamente a aplicação do FS como controle para comparação dos espectros que foram obtidos posteriormente.

Após a aplicação do FS, como descrito anteriormente, foi realizada a leitura da superfície oclusal, referente à superfície que sofreu a aplicação do FS, seguida da leitura da superfície pulpar, referente ao lado oposto da aplicação, para verificar a passagem e possível detecção do FS pela espessura de dente pré-determinada. Estes procedimentos foram realizados para todas as amostras sendo que quando o FS não fosse detectado na espessura inicial, a superfície pulpar da amostra de dentina foi lixada a seco, com lixa de granulação 1500 (*NORTON*® Ind. Brasileira), para redução de sua espessura. Com auxílio de um micrômetro digital (*Mitutoyo*® Digimatic Micrometer; Kanagawa, Japan) a espessura foi gradativamente reduzida e monitorada, e a cada redução, novas leituras de PAS foram realizadas até que o FS pudesse ser detectado na superfície pulpar e assim quantificar a espessura em que o FS permeou na amostra.

A técnica de PAS consiste na geração de uma onda acústica, e pode ser observada quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula fechada contendo gás, podendo ser o próprio ar, acoplada a um microfone, como descrita no item 2.8. O aparelho utilizado para as leituras está ilustrado na Figura 14, e seu arranjo experimental está esquematizado na Figura 15.



Figura 14 – Equipamento utilizado para realização da PAS.

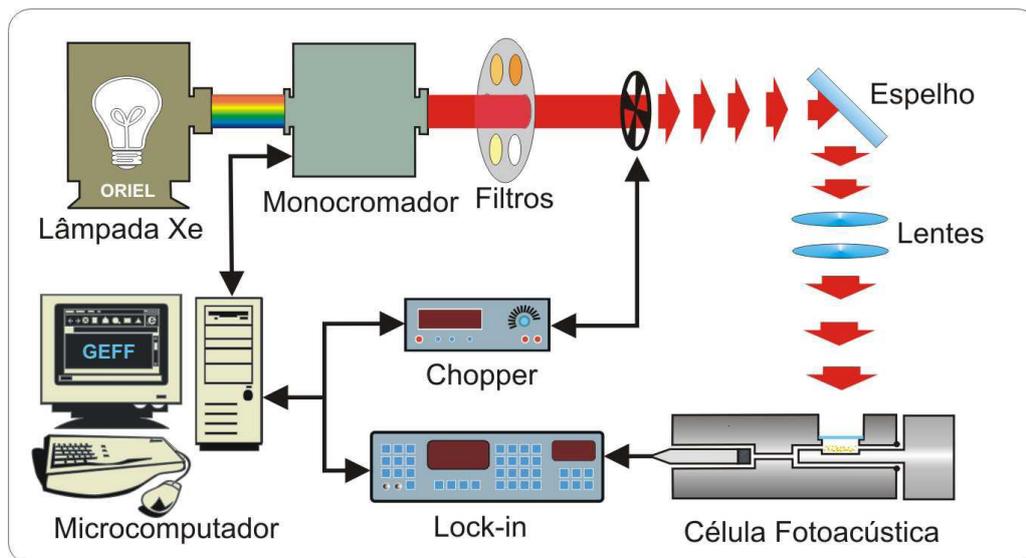


Figura 15 – Arranjo experimental para medidas de espectroscopia fotoacústica²³.

Nesta montagem a fonte de luz utilizada foi uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriël®, modelo 68820) com potência de 1000 W e emissão no intervalo entre 180 e 4000 nm. No monocromador (Oriël®, modelo 77250 - 1/8m), as fendas de entrada e saída foram ajustadas em 3,16 mm e 1,56 mm para que houvesse uma boa definição das bandas. Nas grades de difração foram utilizados comprimentos de onda de 300 a 800 nm e a frequência de modulação da luz foi fixada em 16 Hz. Esta é controlada por um modulador mecânico ou *chopper* (Stanford Research Systems®, modelo SR 540) que, por meio de um fotodiodo, fornece um sinal de referência para o amplificador *Lock-in* (EG & G Instruments®, modelo 5110). Antes de passar pelo modulador de frequência, o feixe de luz passa ainda por um filtro de bandas para que sejam eliminadas ordens superiores de difração. As trocas do filtro foram realizadas em 370 nm e 550 nm.

As lentes da montagem devem fazer com que a amostra seja atingida na região do foco do feixe de luz, para que esta receba o máximo de intensidade possível. A célula fotoacústica utilizada foi a célula fechada ou célula para medidas “*in vitro*”, nela a luz atinge a amostra após entrar na célula por uma janela óptica. Esta janela é de quartzo para que não haja diminuição da intensidade da luz, já que este material é transparente para todo o espectro da luz branca. Detalhes desta célula podem ser visualizados na Figura 16.

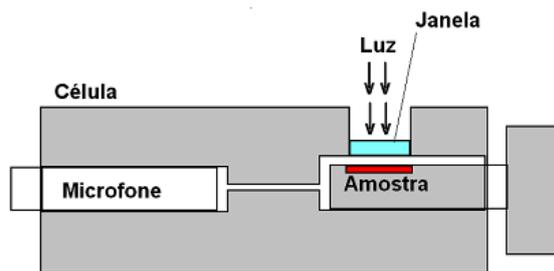


Figura 16 – Corte lateral da célula fotoacústica convencional²³.

O microfone acoplado à célula fotoacústica (Brüel & Kjaer®, modelo BK 2669) foi conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é levado ao *Lock-in* (amplificador sintonizado), que é responsável pela detecção da intensidade e fase do sinal fotoacústico, medido na ordem de alguns nanovolts até um volt, e pela transmissão destes dados ao sistema computacional. Os sinais foram obtidos em quadratura, de maneira que se obtém tanto a intensidade quanto a fase do sinal fotoacústico. A variação do sinal fotoacústico com o comprimento de onda da luz foi obtida a partir do sistema de aquisição de dados via interface GPIB em um microcomputador. Como a lâmpada não emite a mesma intensidade de luz em todos os comprimentos de onda, o sinal foi então normalizado pelo sinal de referência obtido em uma amostra de pó de carvão ultrapuro.

Os dados foram tabulados em gráficos que ilustraram o sinal fotoacústico em relação ao comprimento de onda. O comportamento da permeação foi analisado pela integração das áreas dos sinais fotoacústicos nas diferentes espessuras de dentina, com cálculo da estimativa da porcentagem de permeação dos FS empregados.

4.2. Espectroscopia fotoacústica (FTIR-PAS)

A técnica de espectroscopia fotoacústica em infravermelho por transformada de Fourier (FTIR – Fourier Transformed Infra-Red) foi realizada para verificar a possível existência de reações químicas entre os FS utilizados e os componentes da amostra. Apenas uma amostra para cada FS foi utilizada (n=3), e elas foram obtidas da mesma forma que aquelas utilizadas em PAS, conforme descrito no item 4.1.1.

As superfícies oclusal e pulpar das amostras foram lidas no aparelho previamente a aplicação do FS para controle de comparação dos espectros que foram obtidos posteriormente. Subseqüentemente, uma alíquota de 10 μL do azul de metileno a 0,1 mg/mL foi aplicada com auxílio de uma pipeta volumétrica (FINNPIPETTE® F1 Thermo Scientific) sobre a superfície oclusal da primeira amostra onde permaneceu durante 30 minutos. Após esse período o excedente do FS foi removido com um cotonete e a amostra foi então posicionada na célula fotoacústica e, seguindo o mesmo protocolo utilizado em PAS, foi realizada primeiramente a leitura da superfície oclusal seguida da leitura da superfície pulpar. Nesta técnica não foi realizada a diminuição da espessura da amostra uma vez que seu objetivo foi apenas o de detectar uma possível reação química existente entre o FS aplicado sobre a amostra e os componentes dentinários. As segunda e terceira amostras receberam o mesmo tratamento dado a primeira amostra, porém tiveram a aplicação do azul de o-toluidina a 0,1 mg/mL e verde de malaquita a 0,1 mg/mL respectivamente.

O aparelho utilizado nesta técnica foi o espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) 7000, Spectrometer (Varian, Randolph, Massachusetts), acoplado à célula fotoacústica 300 (MTEC, Ames, IA). A varredura foi feita pelo método Step-Scan na região de 2500 nm a 25000 nm com resolução de 16 cm^{-1} .

4.3. Espectrofotometria

Para se obter os espectros dos FS que estavam sendo empregados e assim ter uma referência para comparação desses espectros isolados com os que foram obtidos em PAS e em PAS-FTIR, utilizou-se a espectrofotometria. Para isso, o azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita tiveram suas concentrações diluídas a 0,001 mg/mL em água destilada para estabilizar os picos de absorção dos FS no espectrofotômetro.

Primeiramente, foram colocados com auxílio de uma pipeta volumétrica (FINNPIPETTE® F1 Thermo Scientific) 2,5 mL de água destilada em uma cubeta de quartzo. Essa cubeta foi cuidadosamente manuseada e posicionada no interior do espectrofotômetro, e seu espectro foi obtido para “zerar” o aparelho, ou seja, o espectro da água destilada serviu como controle ou branco das leituras subseqüentes. Também com auxílio de uma pipeta volumétrica, 2,5 mL do azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita a 0,001

mg/mL foram distribuídos em cubetas individuais que foram posicionadas sucessivamente no aparelho. A cada intervalo da leitura entre um FS e outro a cubeta com água destilada era relida para manter o controle entre os espectros obtidos.

O equipamento utilizado para obtenção dos espectros foi o espectrofotômetro T90 UV/VIS, Spectrometer, PG Instruments Ltd., London, England. A varredura foi feita na região de 190 nm a 900 nm e os espectros foram obtidos no sistema computacional por meio do programa Windows UVWin.

4.4. Microscopia

Foram utilizados nove dentes do número total da amostra para a avaliação microscópica, sendo que três desses dentes sofreram cortes transversais e seis cortes longitudinais. Os dentes que foram cortados transversalmente receberam o mesmo tratamento descrito no item 4.1.1., com a diferença que após o término da confecção das amostras, estas tiveram sua superfície pulpar lixada com lixa de granulação 600 sob refrigeração (*NORTON®* Ind. Brasileira) até atingirem a espessura de aproximadamente 0,1 mm.

Nas amostras que foram cortadas longitudinalmente os cortes foram realizados na seguinte ordem: (1) corte realizado a uma distância de 4,3 mm da junção amelo-cementária, na região da dentina, com remoção da porção oclusal do dente; (2) corte realizado a uma distância de 1,3 mm da junção amelo-cementária, com obtenção de uma fatia de 3 mm de espessura considerando que a espessura do disco de corte é de 0,3 mm; (3) cortes realizados nas paredes vestibular, lingual, mesial e distal em dentina para obtenção de blocos com medidas de 4 mm (comprimento) x 4 mm (largura) x 3 mm (espessura/altura); (4) desgaste das paredes vestibular e lingual com lixa de granulação 600 (*NORTON®* Ind. Brasileira) acoplada a uma politriz DPU-10 (Panambra, São Paulo, Brasil) sob refrigeração para diminuir a largura das amostras que atingiram as dimensões finais de 4 mm (comprimento) x 0,1 mm (largura) x 3 mm (espessura/altura), como esquematizado nas Figuras 17, 18 e 19.

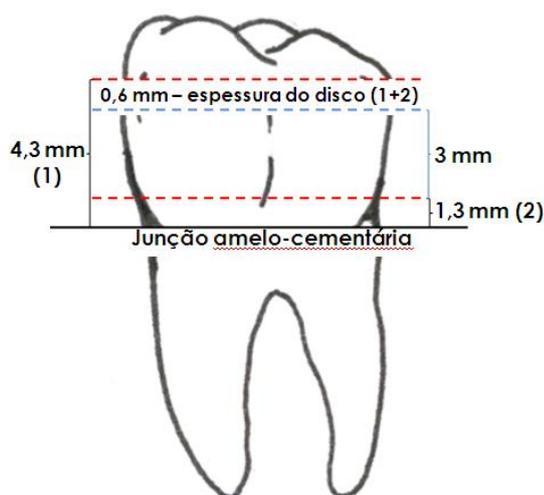


Figura 17 - Traço vermelho indicando o local de realização dos primeiro (1) e segundo (2) cortes.

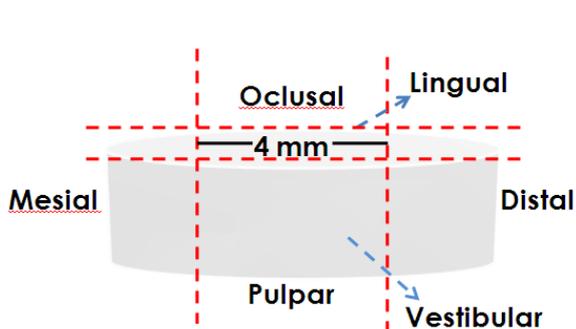


Figura 18 – Traço vermelho indicando os cortes que foram realizados para remover as paredes vestibular, lingual, mesial e distal.

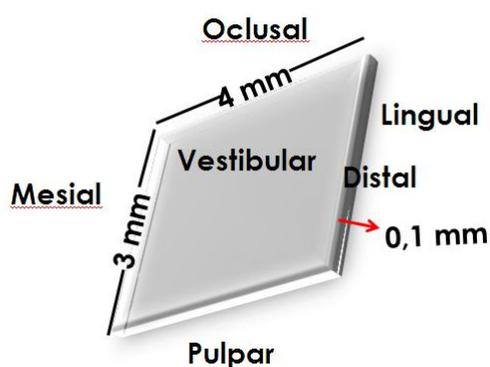


Figura 19 – Amostra obtida com as dimensões finais.

As amostras obtidas foram armazenadas em recipientes identificados contendo 5 mL de água destilada e os remanescentes dentários foram estocados em água destilada para utilização em outras pesquisas.

4.4.1. Microscopia eletrônica de varredura

As três amostras obtidas em corte transversal e três das seis amostras obtidas em corte longitudinal foram utilizadas para avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Esta técnica foi utilizada para verificar as dimensões dos túbulos dentinários na região de dentina em que as amostras do estudo foram obtidas.

As amostras utilizadas para a MEV foram retiradas dos recipientes em que estavam armazenadas com água destilada e passaram a ser estocadas em recipientes individuais devidamente identificados em que permaneceram durante 72 horas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 17% para desmineralização. Após esse período as amostras foram retiradas da solução desmineralizadora, colocadas sobre um papel absorvente durante 30 segundos para remover o excedente da solução e armazenadas novamente em recipientes contendo 5 mL de água destilada até o momento em que a leitura foi realizada.

Para realização das leituras em MEV as amostras foram secas a vácuo e metalizadas durante 5 minutos no aparelho para deposição de ouro (Ion Coater, IC-50, Shimadzu® Biotech., Japan), que utiliza o gás nitrogênio da atmosfera para realizar a deposição do material sobre a superfície da amostra, com corrente elétrica de 7mA, 1.8 Kv de tensão e 10 Pa de pressão. Após o preparo das superfícies as amostras foram colocadas no microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electronic Microscope, SS-550 Superscan, Shimadzu® Biotech., Japan) e as imagens foram transferidas ao sistema computacional.

4.4.2. Microscopia óptica

Para avaliação em microscopia óptica (MO) as outras três amostras obtidas em corte longitudinal foram utilizadas. A MO foi empregada para visualizar a impregnação dos FS utilizados nos túbulos dentinários na região de dentina em que as amostras do estudo foram obtidas.

As amostras foram retiradas dos recipientes em que estavam armazenadas e colocadas sobre um papel absorvente durante 30 segundos para remover o excedente de água destilada. A primeira amostra recebeu uma alíquota de 10 µL do azul de metileno 0,1 mg/mL, que foi aplicada com auxílio de uma pipeta volumétrica (FINNPIPETTE® F1 Thermo Scientific). Esse FS permaneceu durante 30 minutos sobre a amostra. As segunda e terceira amostras receberam da mesma maneira a aplicação do azul de o-toluidina 0,1 mg/mL e verde de malaquita 0,1 mg/mL respectivamente. Após o período de exposição ao FS seu excedente foi

removido com auxílio de um cotonete e cada amostra foi posicionada sobre uma lâmina histológica identificada. Uma alíquota de 30 μL de água destilada foi dispensada sobre a lâmina e uma lamínula foi posicionada sobre a lâmina.

As lâminas foram examinadas em MO e as imagens foram capturadas em aumentos de vinte e quarenta vezes.

5. RESULTADOS

5.1. Espectroscopia fotoacústica (PAS)

A Figura 20 mostra o espectro obtido das superfícies oclusal e pulpar previamente a aplicação dos FS. Essa leitura foi realizada em todas as amostras uma vez que serviu de controle para comparação dos espectros que foram obtidos posteriormente.

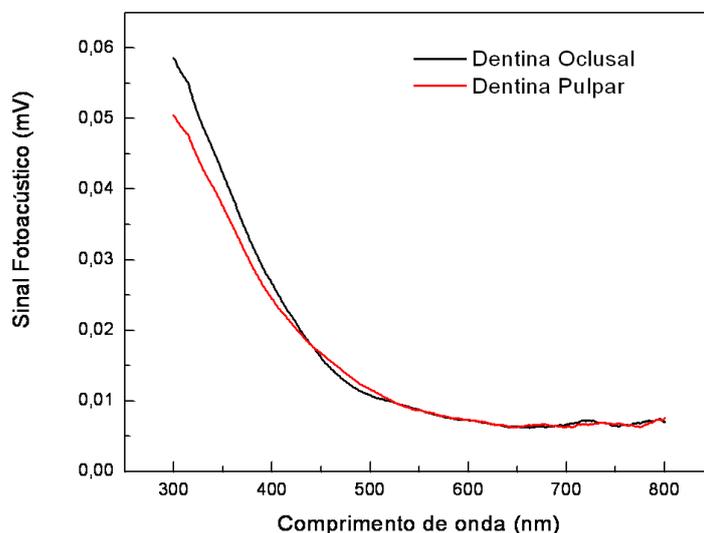


Figura 20 – Espectro das duas superfícies da amostra de dentina antes da aplicação do FS.

Nas leituras das amostras de dentina experimentais, as linhas preta e vermelha correspondem ao sinal fotoacústico das superfícies oclusal e pulpar respectivamente, previamente a aplicação do FS nas espessuras iniciais. As linhas azul e verde correspondem ao sinal fotoacústico das superfícies oclusal e pulpar respectivamente logo após a aplicação do FS. As leituras realizadas em todas as amostras avaliadas neste trabalho para os três FS empregados nos diferentes períodos de exposição constam no APÊNDICE. A Figura 21 representa a leitura realizada na amostra 1 utilizada para avaliar a permeação do azul de metileno a 0,1 mg/mL com período de exposição de 30 minutos. A espessura inicial das três amostras avaliadas nesse grupo foi de aproximadamente 0,350 mm e o pico de absorção máxima do MB ocorreu em 593 nm. Após as leituras de controle, previamente a aplicação do

FS, e as leituras das superfícies oclusal e pulpar seguidas imediatamente da aplicação do FS, as amostras sofreram desgastes na superfície pulpar para obtenção de diferentes espessuras e à medida que a amostra foi lixada, esta se tornava mais fina e se aproximava da região em que o FS fora aplicado, dessa forma, a banda do MB aumentou em função do desgaste da amostra. Na amostra 1, a primeira espessura de detecção do MB foi de 0,232 mm, destacada na Figura 21, e o valor médio de detecção encontrado para as três amostras avaliadas foi de 0,245 mm. Em todas as amostras utilizadas nesta técnica foram realizadas leituras entre as espessuras inicial e de detecção do FS que não constam nas ilustrações para os espectros não ficarem sobrepostos.

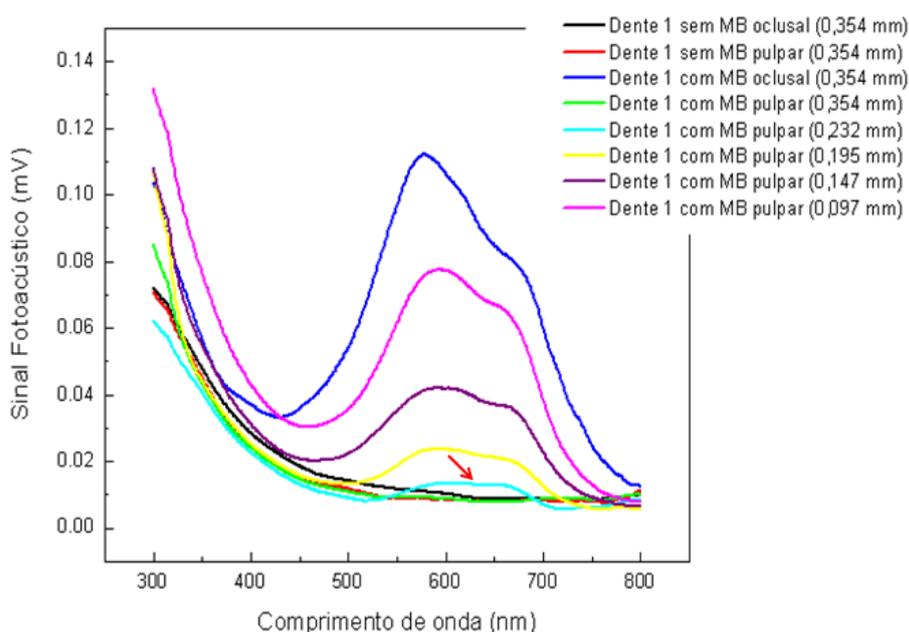


Figura 21 – Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 1 para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição, com detecção do FS em 0,232 mm.

Um fator importante que deve ser considerado na avaliação dos espectros obtidos é o comprimento de difusão térmica da amostra, que é definido como a profundidade na qual a onda de calor gerada pode se propagar até a superfície e contribuir para a geração do sinal fotoacústico⁸⁴. Esse comprimento é definido pela seguinte equação:

$$\mu = \left(\frac{D}{\pi f} \right)^{1/2}$$

Equação 1 - Equação teórica para estimar o comprimento de difusão térmica da amostra.

em que μ é o comprimento de difusão térmica (cm), D é a difusividade térmica (cm^2/s), π uma constante e f é a frequência de modulação (Hz) do feixe que iluminou a amostra testada. A difusividade térmica encontrada para a dentina foi $0,2 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}^{84}$, e a frequência utilizada para a obtenção dos espectros foi fixada em 16 Hz, assim o μ encontrado para as amostras avaliadas foi de 60 μm . Portanto, em uma amostra com 0,350 mm de espessura as leituras dos espectros, realizados pelo lado pulpar, são obtidas em uma profundidade de até 60 μm , ou seja, a região de varredura da leitura ocorre entre 0,290 mm e 0,350 mm de espessura.

O comportamento de permeação dos FS foi analisado pela integração das áreas referentes às bandas de absorção, nas diferentes espessuras de dentina. Estes valores foram ajustados a uma equação exponencial que prevê a saturação dos valores do sinal fotoacústico de permeação do fotossensibilizador em relação à espessura da amostra, dada por:

$$S(x) = S_0 + A * \exp(-x/\tau)$$

Equação 2 – Equação teórica para estimar a quantidade de FS em função da espessura da amostra.

em que S corresponde à área da banda do FS em dentina, x corresponde à espessura da amostra, S_0 e A são constantes de estágio de saturação e amplitude respectivamente, e τ um parâmetro que pode estimar a porcentagem de FS em uma determinada espessura do dente.

Na Figura 22 está representada a estimativa da porcentagem de azul de metileno que permeia em função da espessura da dentina na amostra 1, que recebeu a aplicação de MB 0,1 mg/mL durante 30 minutos. As outras amostras tiveram suas áreas calculadas da mesma maneira. Em (A) podemos observar que as áreas dos sinais fotoacústicos, calculadas na região formada entre 450 nm e 750 nm, originaram uma curva exponencial decrescente em função

do aumento da espessura da amostra, como previsto na Equação 2. O valor de τ encontrado para a amostra 1 foi de 80 μm . Em (B) o sinal fotoacústico foi fixado em seu ponto máximo (593 nm) e à medida que a espessura da amostra aumenta o sinal fotoacústico decresce. Neste caso os valores de τ encontrados em A e B são diferentes uma vez que em A o τ é calculado a partir da área e em B o valor de τ é originado a partir de um único ponto.

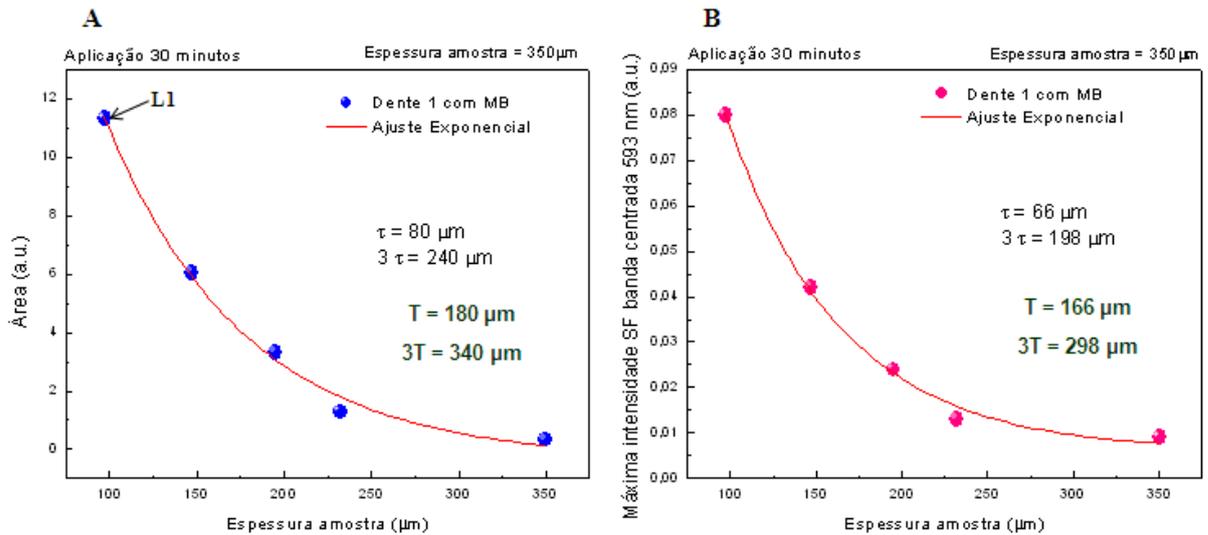


Figura 22 – Estimativa da porcentagem de azul de metileno que permeia em função da espessura da dentina. (A) Diminuição exponencial da área formada pelos sinais fotoacústicos à medida que ocorre o aumento da espessura da amostra; (B) diminuição do sinal fotoacústico fixado em 593 nm à medida que ocorre o aumento da espessura da amostra.

A partir dos valores de τ encontrados para todas as amostras que receberam a aplicação do azul de metileno, independente do período de exposição testado, uma média foi estabelecida como estimativa da porcentagem de azul de metileno que permeia em uma determinada espessura de dentina. O valor médio, respectivo ao cálculo das áreas, encontrado para todas as amostras foi de 80 μm . Este valor médio representa 1τ referente a 37% da quantidade de azul de metileno presente na amostra, e considerando o primeiro ponto obtido no gráfico, ou seja, a menor espessura analisada, que neste caso é ($L1=100 \mu\text{m}$), conclui-se que em 180 μm de espessura a quantidade de MB foi reduzida a 63%. Em uma espessura de 3τ esse valor aumenta para 95%, restando então, em 340 μm , 5% da concentração inicial de MB. O valor de τ encontrado para a amostra 1, como mostra a Figura 22, coincidentemente possui o mesmo valor médio citado anteriormente, que foi obtido a partir de todas as amostras que receberam a aplicação do azul de metileno.

A Figura 23 representa a permeação do azul de metileno a 0,1 mg/mL com período de exposição de 5 minutos, ilustrada por meio da amostra 3. A espessura inicial das três amostras

avaliadas nesse grupo foi de aproximadamente 0,300 mm. Na amostra 3, o MB foi detectado na espessura de 0,250 mm, marcada com a seta vermelha, e o valor médio de detecção encontrado para as três amostras avaliadas nesse grupo foi de 0,246 mm.

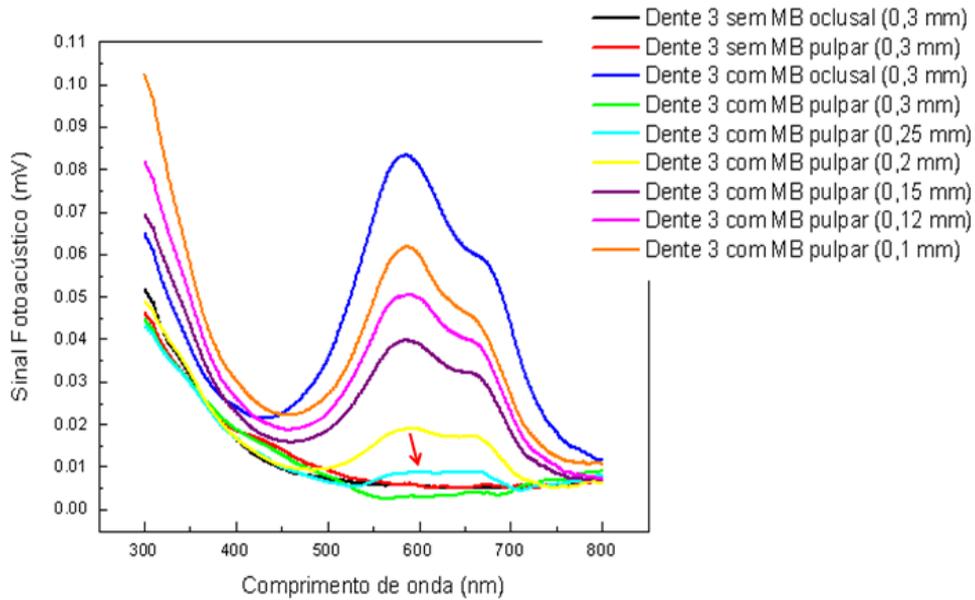


Figura 23 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 3 para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição, com detecção do FS em 0,250 mm.

Apenas uma amostra foi utilizada para avaliar a permeação do azul de metileno a 0,1 mg/mL com período de exposição de 1 minuto. A espessura inicial da amostra foi de 0,290 mm e o MB foi detectado em 0,150 mm apesar de haver uma pequena variação de espectro em 0,200 mm. Para melhor visualização, o detalhe no lado direito da Figura 24 mostra uma ampliação que comprova a presença do FS na espessura de 0,150 mm, correspondente a linha de cor amarela.

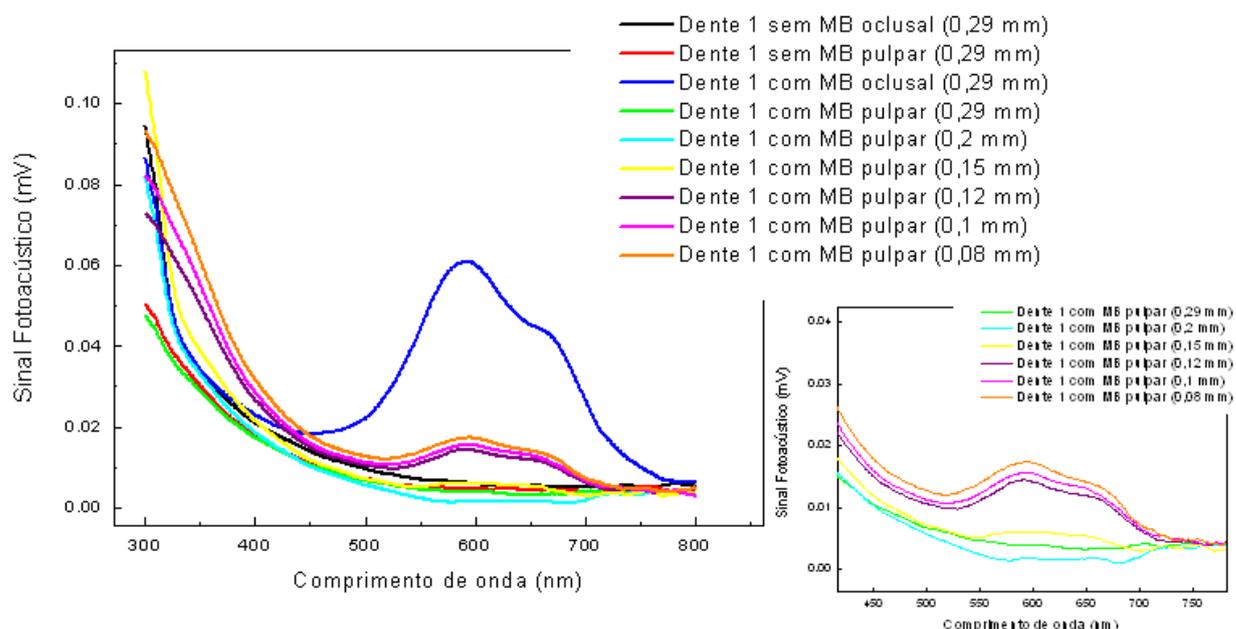


Figura 24 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 1 minuto de exposição com detecção do FS em 0,150 mm.

Também uma amostra foi utilizada para avaliar a permeação do azul de metileno a 0,01 mg/mL com período de exposição de 5 minutos. A solução preparada nessa concentração ficou com coloração muito clara dificultando a detecção do sinal fotoacústico. Mesmo quando a amostra atingiu uma espessura muito fina (0,080 mm) o sinal não foi detectado o que dificultou a utilização da técnica. A espessura inicial da amostra foi de 0,200 mm e o MB não foi detectado na superfície pulpar, referente à superfície contrária àquela em que o FS fora aplicado em nenhuma das espessuras obtidas, como mostra a Figura 25.

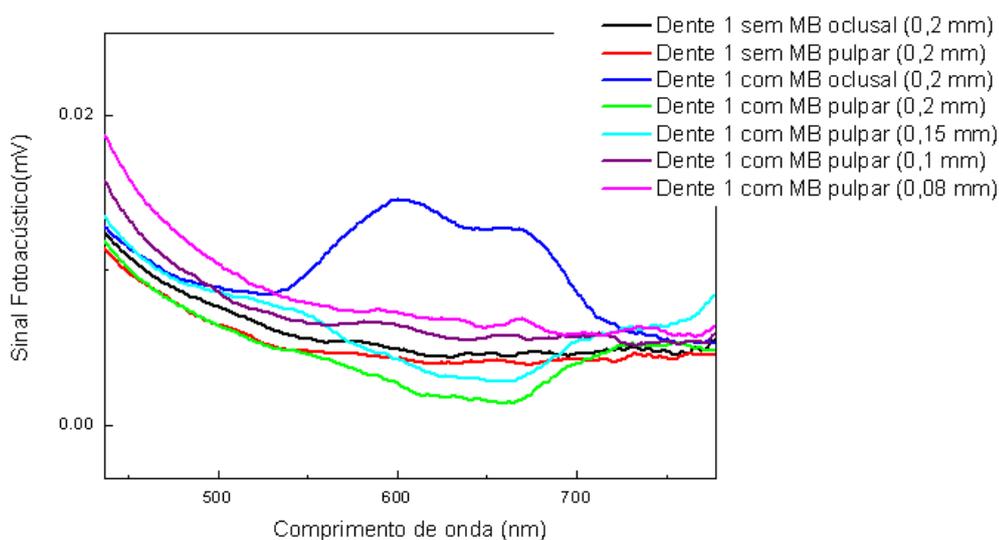


Figura 25 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MB 0,01 mg/mL no período de 5 minutos de exposição. Não houve detecção do FS na superfície pulpar.

Em relação ao azul de o-toluidina, a leitura realizada na amostra 1 para avaliação da permeação desse FS na concentração de 0,1 mg/mL com período de exposição de 30 minutos, está representada na Figura 26. A espessura inicial das três amostras avaliadas nesse grupo foi de aproximadamente 0,290 mm e o pico de absorção máxima do TBO apresentou-se em 570 nm. O TBO foi detectado na espessura de 0,190 mm na amostra 1 e o valor médio encontrado para as três amostras avaliadas nesse grupo foi de 0,193 mm.

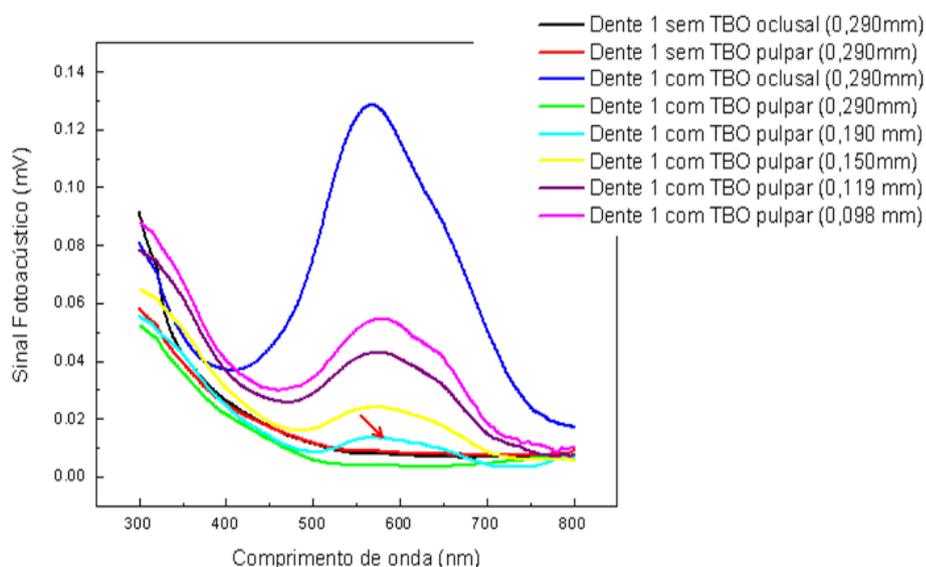


Figura 26 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 1 para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição, com detecção do FS em 0,190 mm.

A Figura 27 representa a amostra 1 utilizada para avaliar a permeação do azul de o-toluidina a 0,1 mg/mL com período de exposição de 5 minutos. A espessura inicial das três amostras avaliadas foi de aproximadamente 0,300 mm. Na amostra 1, o TBO foi detectado na espessura de 0,200 mm, e o valor médio encontrado para as três amostras avaliadas nesse grupo foi de 0,220 mm.

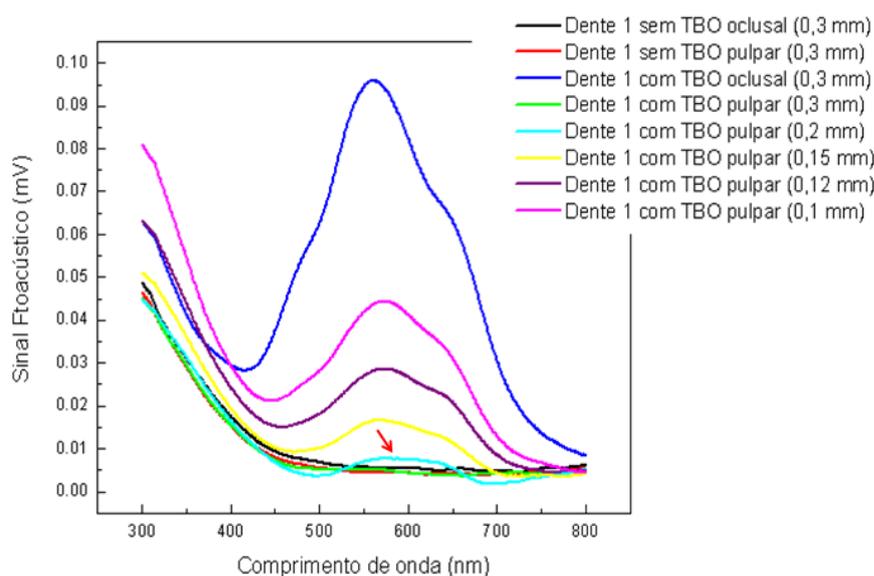


Figura 27 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 1 para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição, com detecção do FS em 0,200 mm.

O comportamento de permeação do azul de o-toluidina foi calculado de acordo com a Equação 2. O valor médio de τ encontrado para todas as amostras avaliadas, independente do período de exposição, foi de 61 μm . Considerando a menor espessura analisada ($L_1=100 \mu\text{m}$), referente ao primeiro ponto avaliado, a estimativa mostra que 37% do azul de o-toluidina está presente em 161 μm .

A Figura 28 representa a estimativa da porcentagem de azul de o-toluidina que permeia em função da espessura da dentina na amostra 1, que recebeu a aplicação de TBO 0,1 mg/mL durante 5 minutos. As outras amostras tiveram seus sinais fotoacústicos calculados da mesma maneira. Em (A) podemos observar que as áreas dos sinais fotoacústicos, calculadas na região formada entre 450 nm e 750 nm, originaram uma curva exponencial decrescente em função do aumento da espessura da amostra. Observar que para a amostra 1 o τ encontrado foi 42 μm , diferente do valor médio citado anteriormente ($\tau=61\mu\text{m}$) que foi obtido a partir de todas as amostras. Em (B) o sinal fotoacústico foi fixado em seu ponto máximo (570 nm) e à medida que a espessura da amostra aumenta o sinal fotoacústico decresce. Neste caso os valores de τ encontrados em A e B foram coincidentemente iguais.

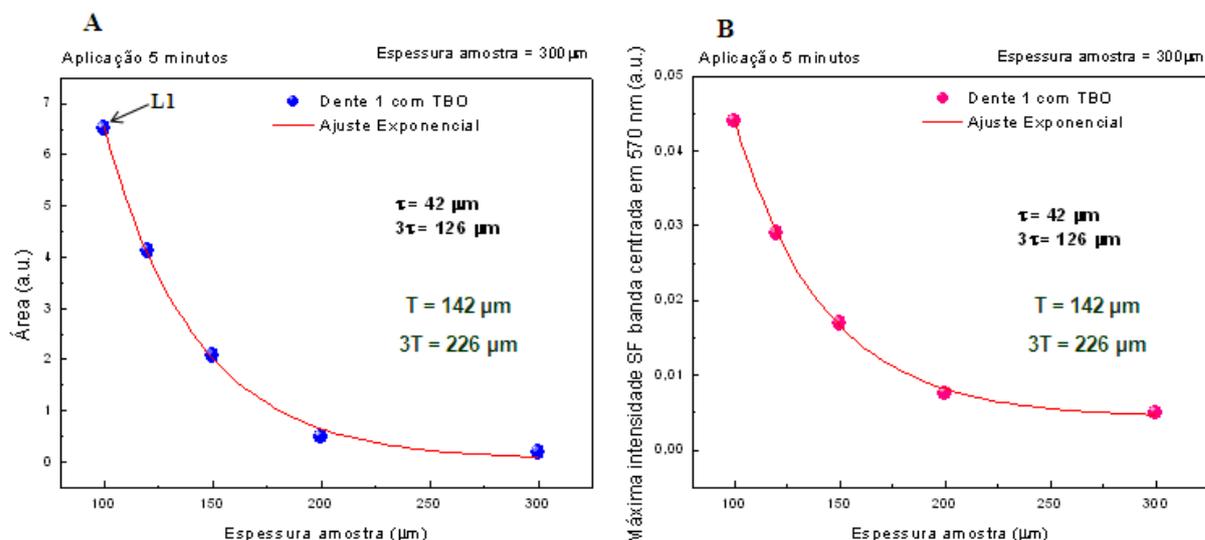


Figura 28 - Estimativa da porcentagem de azul de o-toluidina que permeia em função da espessura da dentina. (A) Diminuição exponencial da área formada pelos sinais fotoacústicos à medida que ocorre o aumento da espessura da amostra; (B) diminuição do sinal fotoacústico fixado em 570 nm à medida que ocorre o aumento da espessura da amostra.

Os espectros obtidos a partir da amostra que foi utilizada para avaliar a permeação do azul de o-toluidina a 0,1 mg/mL com período de exposição de 1 minuto encontram-se na Figura 29. A espessura inicial da amostra foi de 0,250 mm e o TBO foi detectado em 0,150 mm apesar de haver uma pequena variação de espectro em 0,200 mm.

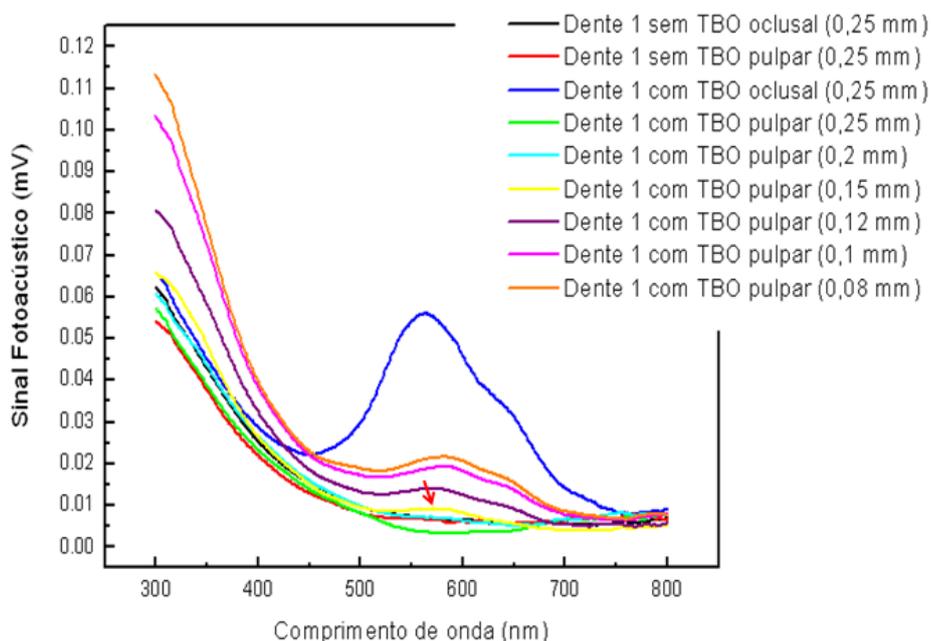


Figura 29 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 1 minuto de exposição com detecção do FS em 0,150 mm.

A leitura da amostra utilizada para avaliar a permeação do azul de o-toluidina a 0,01 mg/mL com período de exposição de 5 minutos encontra-se na Figura 30. Também com o TBO a solução preparada nessa concentração ficou com coloração muito clara dificultando a detecção do sinal fotoacústico. Mesmo quando a amostra atingiu uma espessura muito fina (0,060 mm) a ponto de fraturar após a leitura, o sinal não foi detectado o que dificultou a utilização da técnica. A espessura inicial da amostra foi de 0,300 mm e o TBO não foi detectado na superfície pulpar em nenhuma das espessuras obtidas. Na espessura de 0,060 mm uma última leitura foi realizada na superfície pulpar e também na superfície oclusal, que havia recebido a aplicação do FS. Entretanto não houve detecção do sinal nem na superfície oclusal nessa última leitura.

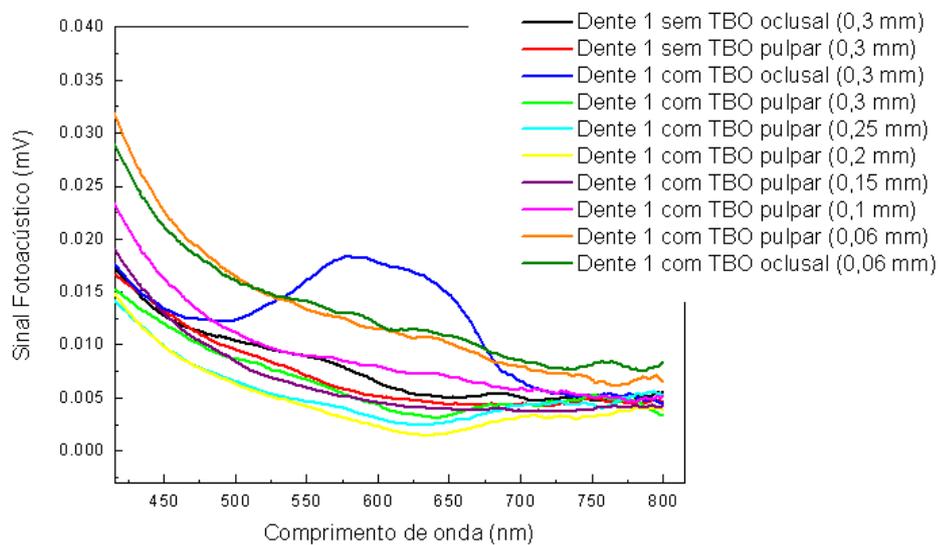


Figura 30 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do TBO 0,01 mg/mL no período de 5 minutos de exposição. Não houve detecção do FS na superfície pulpar.

A permeação do verde de malaquita na concentração de 0,1 mg/mL com período de exposição de 30 minutos está ilustrada na Figura 31, representada pela amostra 2. A espessura inicial das três amostras avaliadas foi de aproximadamente 0,340 mm e o pico de absorção máxima do MG apresentou-se em 627 nm. Na amostra 2, a detecção do FS ocorreu em 0,205 mm, apesar de haver uma leve alteração do sinal fotoacústico em 0,255 mm, e o valor médio encontrado para as três amostras avaliadas nesse grupo foi de 0,237 mm.

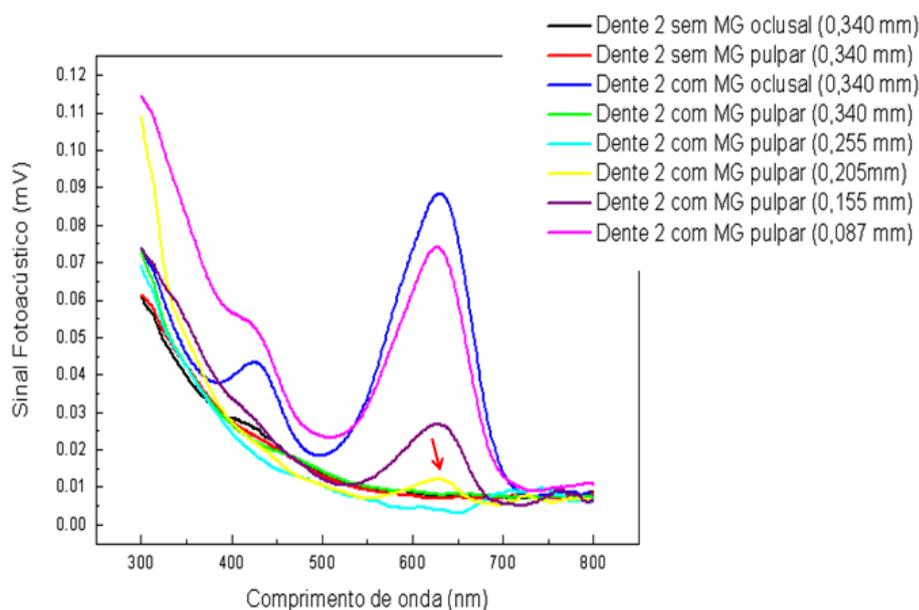


Figura 31 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 2 para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição, com detecção do FS em 0,205 mm.

O comportamento de permeação do verde de malaquita foi calculado de acordo com a Equação 2. O valor médio encontrado para todas as amostras que receberam a aplicação desse FS foi de 48 μm . Considerando a menor espessura analisada ($L_1=100 \mu\text{m}$), referente ao primeiro ponto avaliado, estima-se que 37% do verde de malaquita está presente em 148 μm de espessura da amostra.

A Figura 32 representa a estimativa da porcentagem de verde de malaquita que permeia em função da espessura da dentina na amostra 1, que recebeu a aplicação de MG 0,1 mg/mL durante 30 minutos. As outras amostras tiveram seus sinais fotoacústicos calculados da mesma maneira. Em (A) podemos observar que as áreas dos sinais fotoacústicos, calculadas na região formada entre 450 nm e 750 nm, originaram uma curva exponencial decrescente em função do aumento da espessura da amostra. Observar que para a amostra 1 o τ encontrado foi 38 μm , diferente do valor médio citado anteriormente ($\tau=48\mu\text{m}$) que foi obtido a partir de todas as amostras. Em (B) o sinal fotoacústico foi fixado em seu ponto máximo (627 nm) e à medida que a espessura da amostra aumenta o sinal fotoacústico decresce. Neste caso os valores de τ encontrados em A e B são diferentes uma vez que em A o τ é calculado a partir da área e em B o valor de τ é originado a partir de um único ponto. Assim, o valor médio de τ citado anteriormente ($\tau=48\mu\text{m}$) é calculado a partir dos valores obtidos em A.

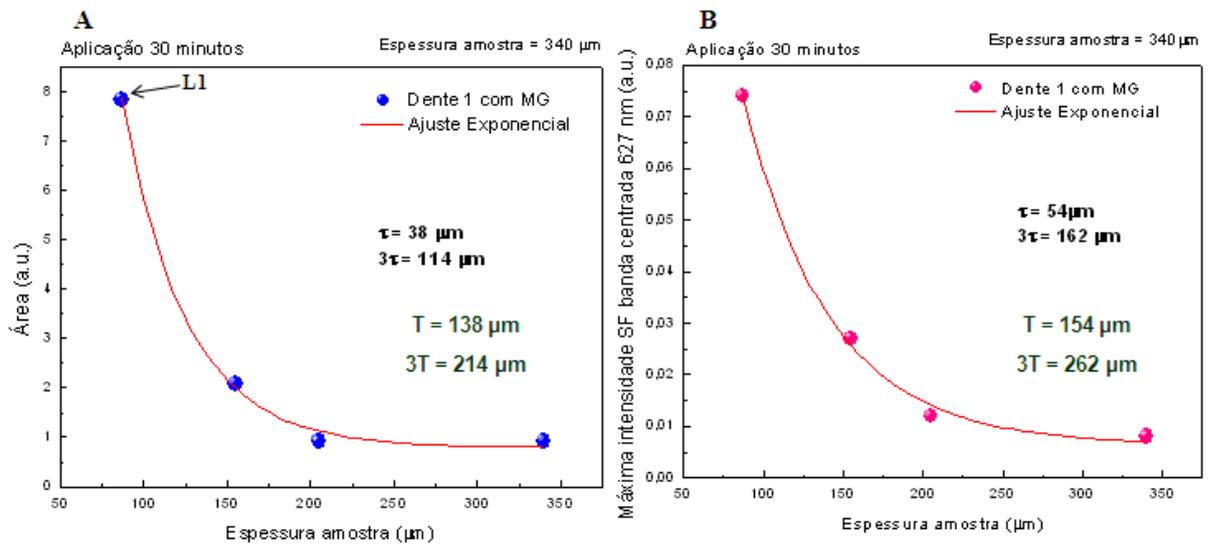


Figura 32 - Estimativa da porcentagem de verde de malaquita que permeia em função da espessura da dentina. (A) Diminuição exponencial da área formada pelos sinais fotoacústicos à medida que ocorre o aumento da espessura da amostra; (B) diminuição do sinal fotoacústico fixado em 627 nm à medida que ocorre o aumento da espessura da amostra.

Os espectros obtidos a partir da amostra 3, utilizada para avaliar a permeação do verde de malaquita a 0,1 mg/mL com período de exposição de 5 minutos, estão representados na Figura 33. A espessura inicial das três amostras avaliadas foi de aproximadamente 0,300 mm. Na amostra 3 o MG foi detectado em 0,200 mm, e o valor médio da primeira espessura de detecção encontrado para as três amostras avaliadas nesse grupo foi de 0,180 mm.

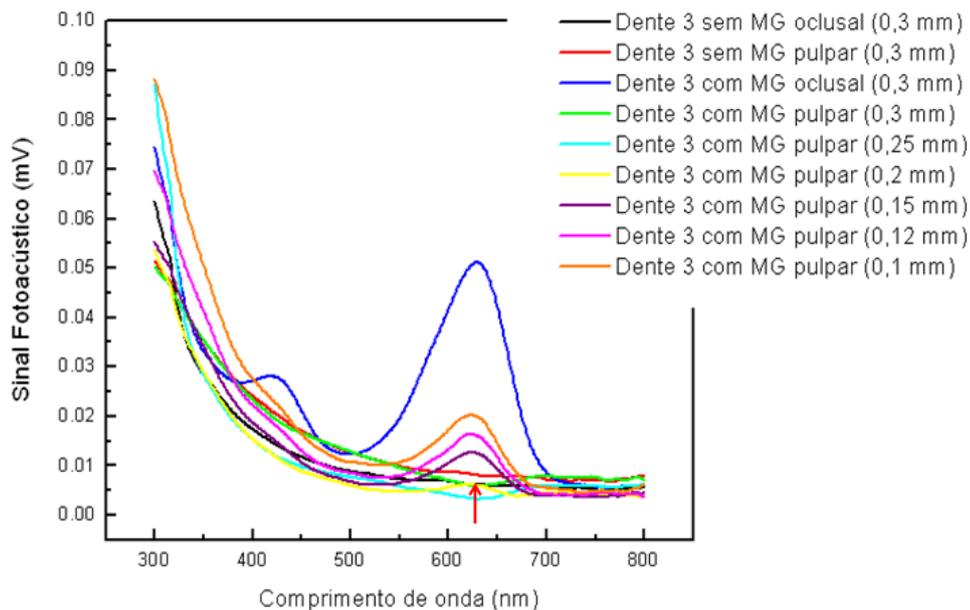


Figura 33 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra 3 para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição, com detecção do FS em 0,200 mm.

A evolução dos sinais fotoacústicos obtidos em função da amostra que foi utilizada para avaliar a permeação do verde de malaquita a 0,1 mg/mL com período de exposição de 1 minuto está representada na Figura 34. A espessura inicial da amostra foi de 0,280 mm e o MG foi detectado em 0,150 mm apesar de haver uma pequena variação de espectro em 0,200 mm.

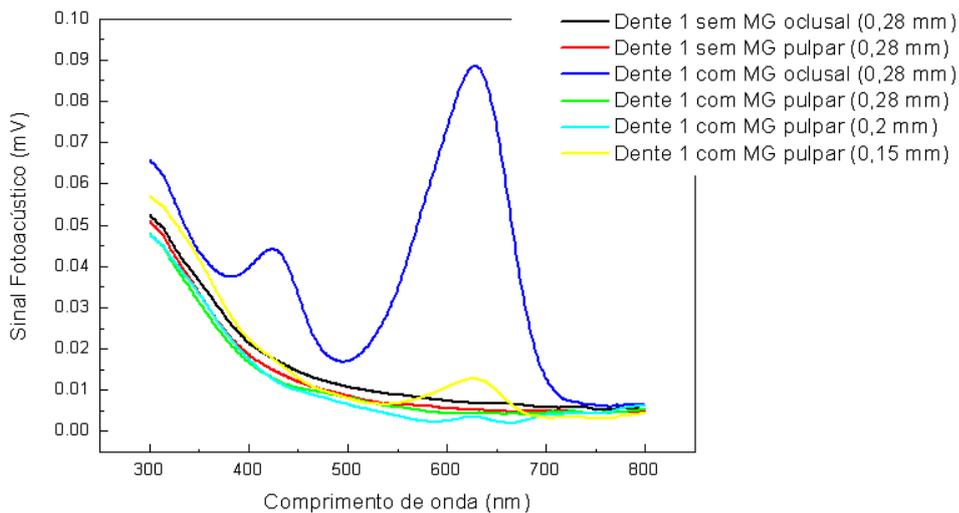


Figura 34 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 1 minuto de exposição com detecção do FS em 0,150 mm.

A leitura da amostra utilizada para avaliar a permeação do verde de malaquita a 0,01 mg/mL com período de exposição de 5 minutos encontra-se na Figura 35. A mesma limitação foi encontrada em relação à concentração mais baixa utilizada, como ocorreu com os outros FS. A espessura inicial da amostra foi de 0,200 mm e o MG não foi detectado na superfície pulpar, referente à superfície contrária àquela em que o FS fora aplicado, em nenhuma das espessuras obtidas. A menor espessura possível atingida foi de 0,060 mm. Nessa espessura, além de realizar a leitura da superfície pulpar em frequência de 16 Hz, como realizado em todas as outras leituras, realizou-se também uma leitura da superfície pulpar com frequência em 10 Hz. Com a diminuição da frequência ocorre um aumento na profundidade de leitura do espectro, ou seja, a leitura é realizada em região mais profunda da amostra e conseqüentemente mais próxima da superfície em que o FS havia sido aplicado. Entretanto, a detecção do MG não ocorreu, o que demonstrou que nessa concentração a técnica é inviável. Também foi realizada uma leitura com frequência em 40 Hz na superfície oclusal, que havia recebido a aplicação do FS. Com o aumento da frequência a leitura é mais superficial e ainda assim o FS não foi detectado.

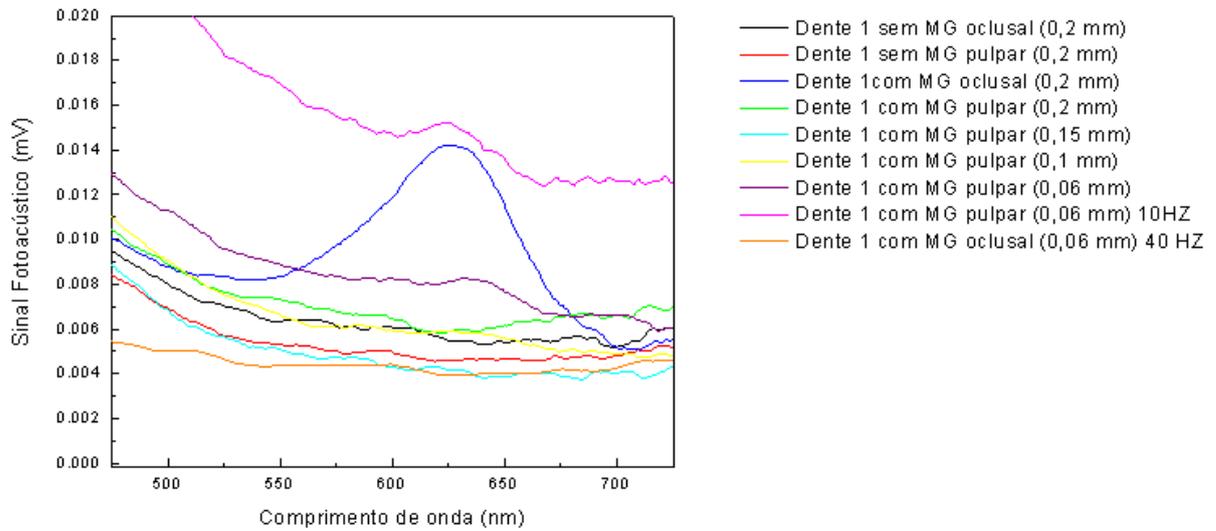


Figura 35 - Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura da amostra para verificação da permeação do MG 0,01 mg/mL no período de 5 minutos de exposição. Não houve detecção do FS na superfície pulpar mesmo com a mudança da frequência para 10 Hz. Também não houve detecção do FS na superfície oclusal com frequência em 40 Hz.

No Quadro 4 estão representadas as primeiras espessuras de detecção dos FS avaliados obtidas por meio dos sinais fotoacústicos encontrados a partir de cada amostra avaliada, e o Quadro 5 apresenta as médias dos valores encontrados para as primeiras espessuras de detecção em função do FS e período de exposição utilizados, bem como os valores de τ encontrados para cada FS, referente à espessura em que encontra-se 37% do FS aplicado, somando a menor espessura analisada (100 μ m).

Quadro 4 – Primeiras espessuras de detecção (mm) encontradas para cada amostra avaliada.

	Espessura da primeira detecção de MB (mm) amostras 1, 2 e 3			Espessura da primeira detecção de TBO (mm) amostras 1, 2 e 3			Espessura da primeira detecção de MG (mm) amostras 1, 2 e 3		
0,1 mg/mL 30 minutos	0,232	0,254	0,250	0,190	0,190	0,200	0,255	0,205	0,253
0,1 mg/mL 5 minutos	0,250	0,240	0,250	0,200	0,230	0,230	0,190	0,150	0,200
0,1 mg/mL 1 minuto	0,150	-	-	0,150	-	-	0,150	-	-
0,01 mg/mL 5 minutos	ND*	-	-	ND*	-	-	ND*	-	-

*ND – não detectado

Quadro 5 – Média das espessuras de detecção (mm) encontradas para cada FS e períodos testados, e média dos valores de τ de cada FS testado.

	MB	TBO	MG
Média das espessuras 0,1 mg/mL 30 minutos	0,245 mm	0,193 mm	0,237 mm
Média das espessuras 0,1 mg/mL 5 minutos	0,246 mm	0,220 mm	0,180 mm
Média do valor de τ para todas as amostras	80 μm + 100 μm (primeiro ponto avaliado) = 0,18 mm	61 μm + 100 μm (primeiro ponto avaliado) = 0,16 mm	48 μm + 100 μm (primeiro ponto avaliado) = 0,14 mm

A Figura 36 representa uma estimativa do comportamento da concentração encontrada para os três fotossensibilizadores avaliados em função da espessura da amostra de dentina considerando o valor médio de τ obtido para cada FS. Neste gráfico a espessura mínima avaliada ($L_1=100\mu\text{m}$) não foi considerada, assim pode-se observar que o eixo horizontal do gráfico corresponde ao valor de τ . Portanto, para 1τ tem-se a concentração equivalente a 37% do FS, mas é importante ressaltar que para aplicar essa estimativa às amostras de dentina deve-se considerar L_1 .

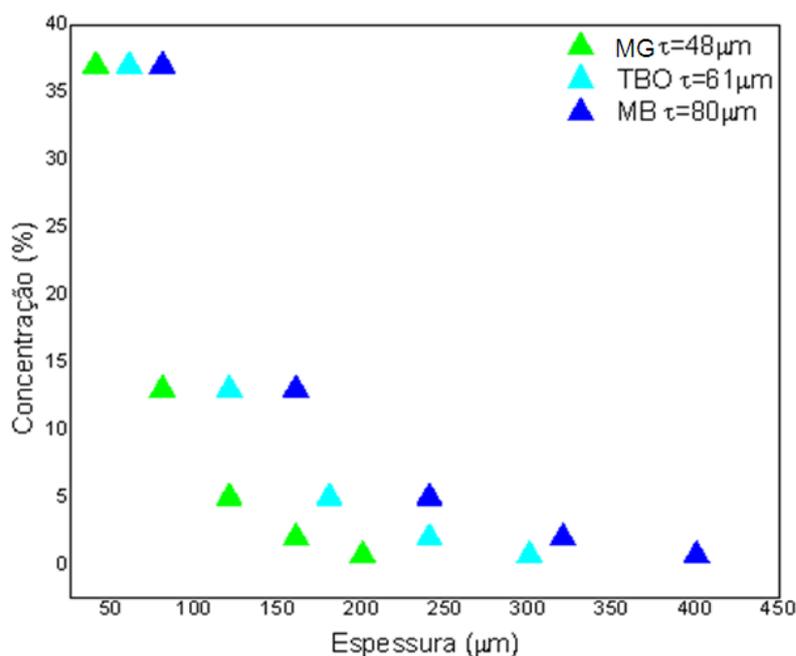


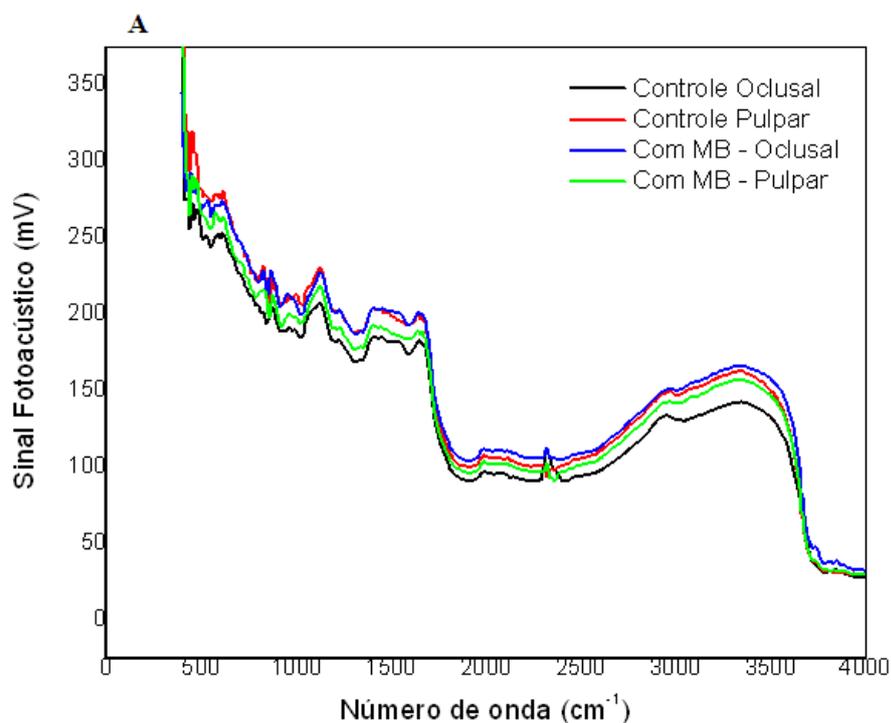
Figura 36 – Comportamento da concentração do azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita em função da espessura da amostra de dentina de acordo com o valor de τ encontrado para cada FS.

5.2. Espectroscopia fotoacústica (FTIR-PAS)

Nas leituras das amostras de dentina experimentais, as linhas preta e vermelha correspondem ao sinal fotoacústico das superfícies oclusal e pulpar respectivamente, previamente a aplicação do FS. As linhas azul e verde correspondem ao sinal fotoacústico das superfícies oclusal e pulpar respectivamente logo após a aplicação do FS. Nesta técnica não foi realizado o desgaste da superfície pulpar para diminuição da espessura assim as três amostras utilizadas permaneceram com a espessura inicial de 0,400 mm.

Na Figura 37 está representada a evolução dos sinais fotoacústicos obtidos antes e após a aplicação dos FS nas três amostras utilizadas nesta técnica. As amostras 1, 2 e 3 receberam a aplicação do azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita respectivamente, com concentração de 0,1 mg/mL e período de exposição de 30 minutos.

Não houve alteração dos sinais obtidos antes e após a aplicação dos FS em nenhuma das três amostras avaliadas, assim o resultado sugere que não ocorreu alteração causada por possíveis reações químicas existentes entre o FS empregado e a dentina.



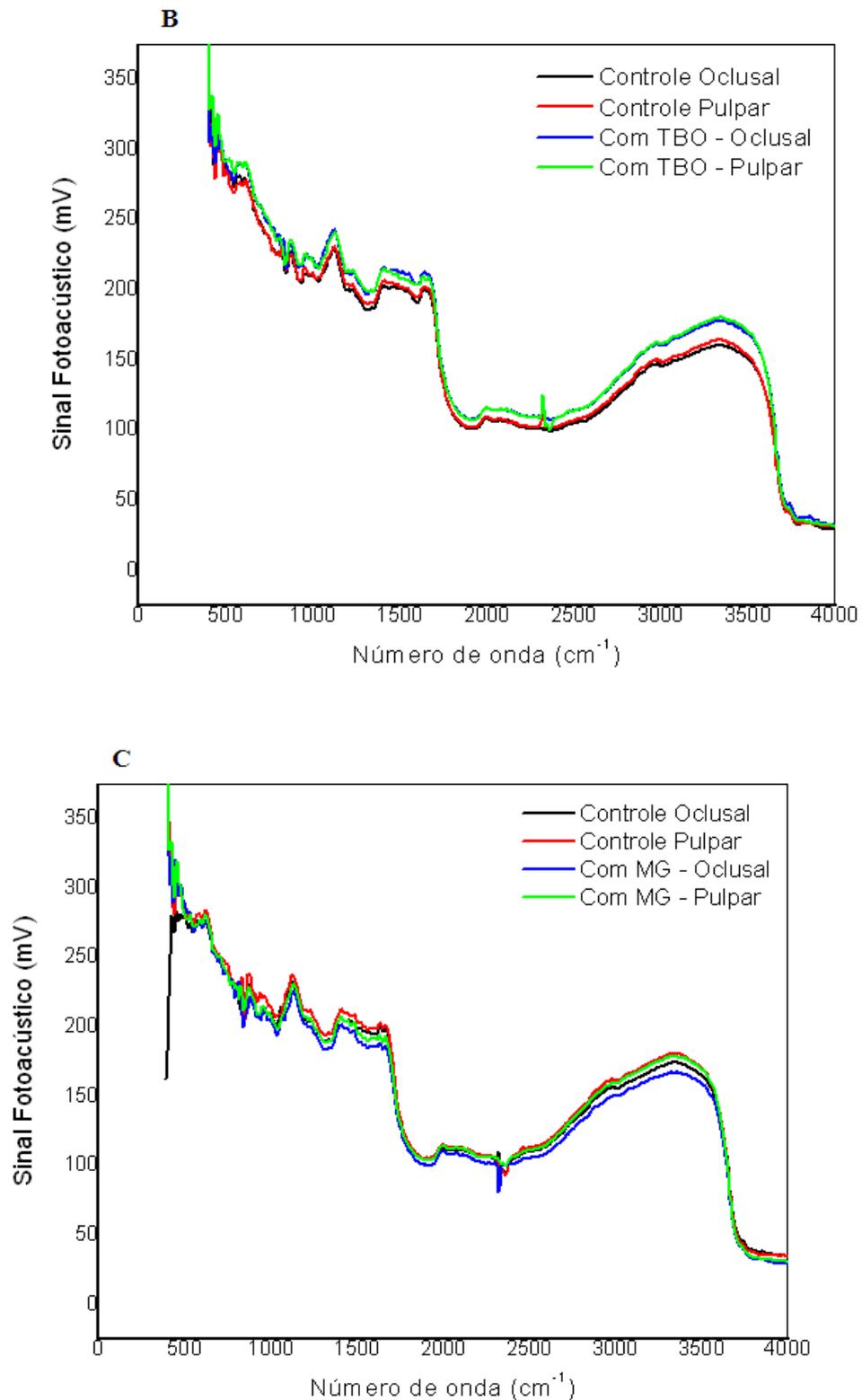


Figura 37 - Evolução dos sinais fotoacústicos para verificação de alteração causada por possíveis reações entre os FS e a estrutura dentária. (A) aplicação do MB 0,1 mg/mL durante 30 minutos; (B) aplicação do TBO 0,1 mg/mL durante 30 minutos e ; (C) aplicação do MG 0,1 mg/mL durante 30 minutos.

5.3. Espectrofotometria

A Figura 38 mostra os espectros obtidos do azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita a 0,001 mg/mL, que serviram de referência para comparação com os espectros que foram obtidos por meio da associação dos FS com a dentina, em PAS e em PAS-FTIR.

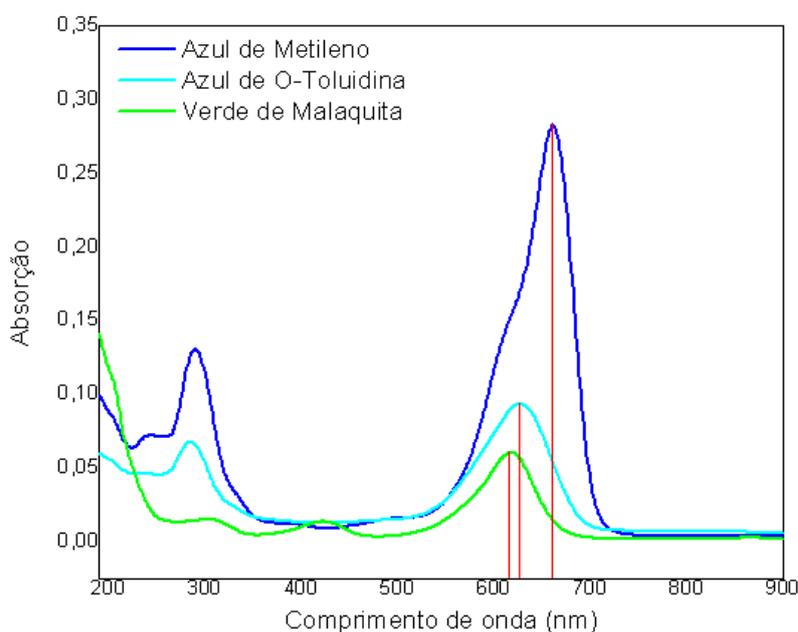


Figura 38 – Espectro dos FS azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita a 0,001 mg/mL, e seus respectivos picos de absorção máxima em 660 nm, 630 nm e 615 nm demarcados com as linhas vermelhas.

Observa-se que com a diminuição da concentração a banda de absorção dos FS é modificada, assim o pico de absorção máxima encontrado em PAS é diferente dos picos obtidos nesta espectrofotometria, demarcados com as linhas vermelhas, isso se deve às formas monoméricas e agregadas dos FS que variam de acordo com sua concentração, como ilustra o Quadro 6.

Quadro 6 – Picos de absorção máxima encontrados em PAS e na espectrofotometria para o azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita, de acordo com as concentrações utilizadas.

FOTOSENSIBILIZADORES	PICOS DE ABSORÇÃO MÁXIMA	
	<i>0,1 mg/mL (agregados) PAS</i>	<i>0,001 mg/mL (monômeros) espectrofotometria</i>
<i>Azul de Metileno</i>	593 nm	660 nm
<i>Azul de O-Toluidina</i>	570 nm	630 nm
<i>Verde de Malaquita</i>	627 nm	615 nm

5.4. Microscopia

5.4.1. Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 39 mostra as imagens obtidas em MEV nos cortes transversal e longitudinal. A média do diâmetro dos túbulos dentinários encontrada para as amostras utilizadas nesta técnica foi de 3,64 μm . A média da distância entre os túbulos encontrada nessa região para as amostras utilizadas foi de 2,8 μm . A média da espessura encontrada para as amostras utilizadas foi de 30,3 μm , um valor menor comparado à espessura inicial das amostras (0,1 mm) provavelmente devido à desmineralização e tratamento dado às superfícies das amostras para possibilitar a realização da técnica.

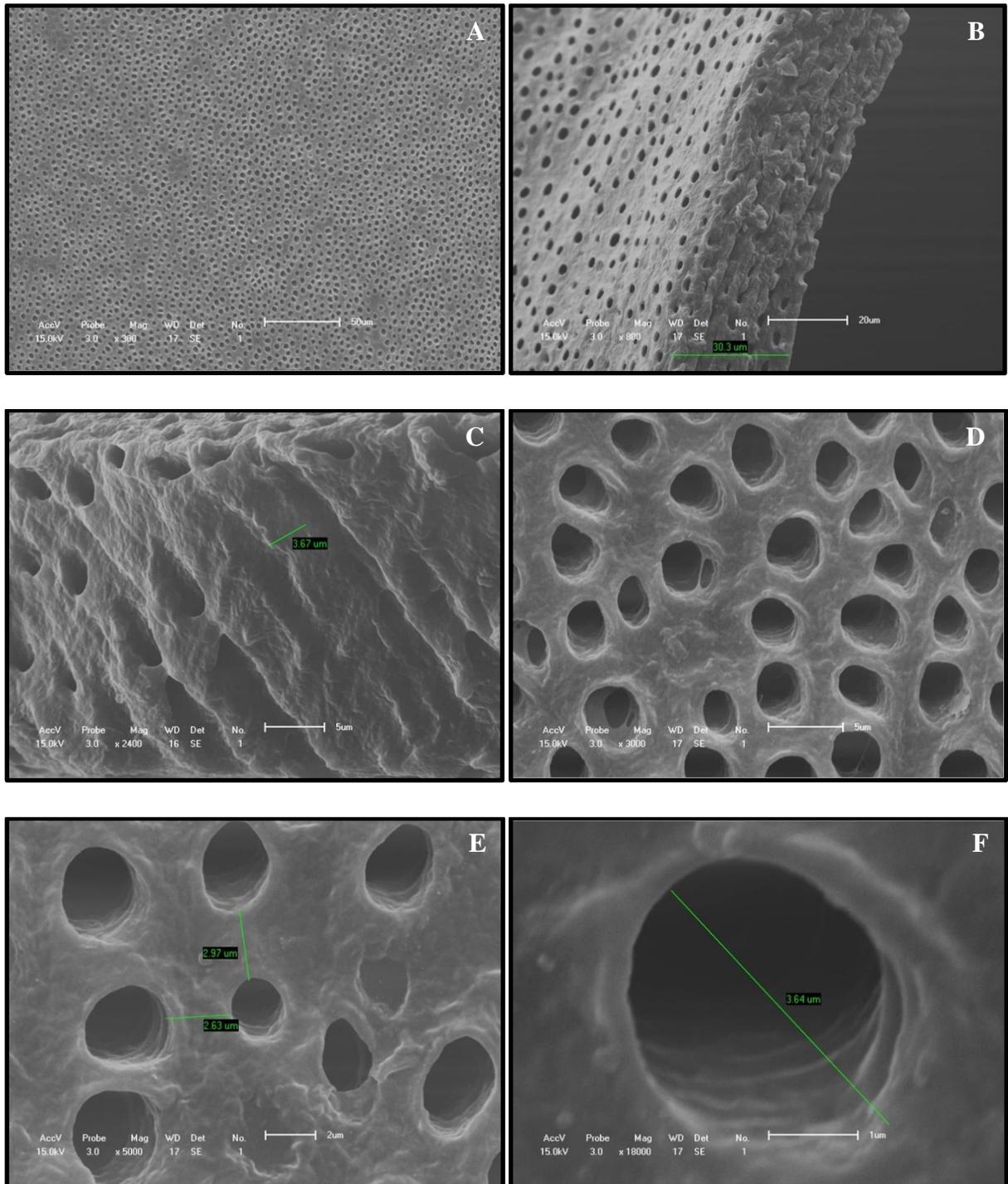


Figura 39 – Imagens obtidas em MEV. (A) corte transversal com aumento de 300 vezes; (B) corte longitudinal com aumento de 800 vezes; (C) corte longitudinal com aumento de 2400 vezes; (D) corte transversal com aumento de 3000 vezes; (E) corte transversal com aumento de 5000 vezes e; (F) corte transversal com aumento de 18000 vezes.

5.4.2. Microscopia óptica

As imagens obtidas em MO, ilustradas na Figura 40, a partir das três amostras utilizadas nesta técnica, obtidas de cortes longitudinais, mostram a impregnação do azul de metileno (A e B), azul de o-toluidina (C e D) e verde de malaquita (E e F) nos túbulos dentinários em aumentos de 20 vezes e 40 vezes respectivamente. Os três FS foram utilizados na concentração de 0,1 mg/mL com período de exposição de 30 minutos sobre as amostras.

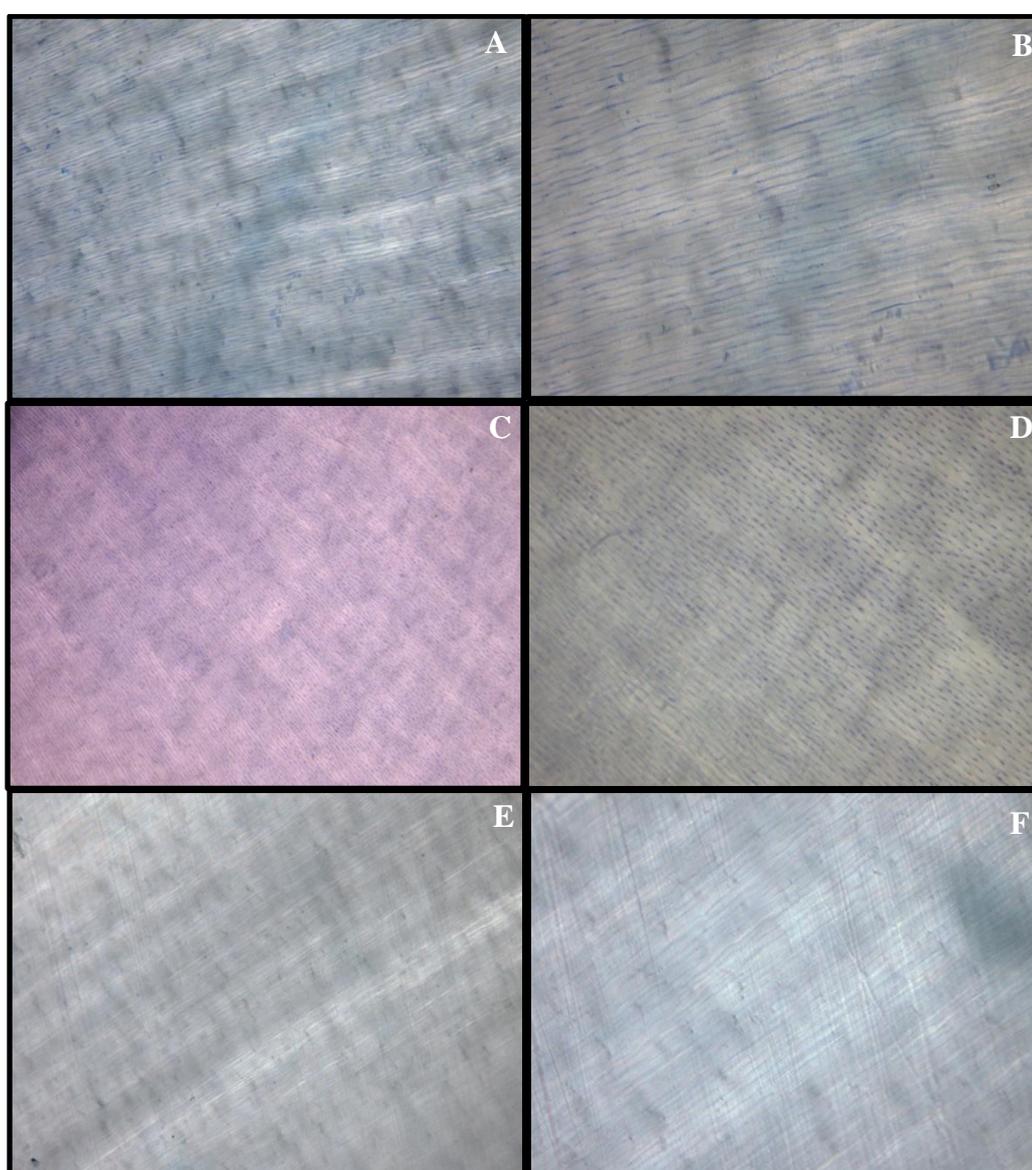


Figura 40 – Imagens obtidas em MO de amostras de dentina em cortes longitudinais mostrando a impregnação dos FS nos túbulos dentinários. (A) MB 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 20 vezes; (B) MB 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 40 vezes; (C) TBO 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 20 vezes; (D) TBO 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 40 vezes; (E) MG 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 20 vezes e; (F) MG 0,1 mg/mL durante 30 minutos, aumento de 40 vezes.

6. DISCUSSÃO

O efeito da terapia fotodinâmica sobre os microrganismos cariogênicos tem sido avaliado empregando-se diversos fotossensibilizadores em diferentes concentrações, fontes de luz aplicadas em diferentes períodos de exposição, em estudos *in vitro*^{4-11, 60, 66-68}, *in situ*³ e *in vivo*¹². No entanto, até o presente momento, um ponto importante não havia sido considerado para viabilizar a aplicação da PDT em dentina: o comportamento da permeação dos fotossensibilizadores na estrutura dentinária. Este é o primeiro estudo que avalia a permeabilidade dentinária dos FS empregados na PDT, o que limita a comparação dos resultados obtidos com outros trabalhos. Além do fato deste ser o primeiro estudo a avaliar esta questão foram obtidos resultados favoráveis já que todos os FS analisados permearam na estrutura dentinária, um achado importante que viabiliza a aplicação da PDT sobre a dentina.

6.1. Discussão dos resultados

De acordo com os resultados obtidos observou-se que o azul de metileno a 0,1 mg/mL com período de aplicação de 5 minutos apresentou permeação de 0,246 mm, referente ao maior valor médio encontrado. Por outro lado, o verde de malaquita a 0,1 mg/mL com período de aplicação de 5 minutos apresentou permeação de 0,180 mm, referente ao menor valor médio encontrado. Para o azul de metileno a variação do período de exposição de 5 minutos (0,246 mm) ou 30 minutos (0,245 mm) parece não interferir na quantidade de permeação do FS. Já os FS azul de o-toluidina e verde de malaquita tiveram valores médios diferentes para os períodos de 5 minutos, 0,220 mm e 0,180 mm, e 30 minutos, 0,193 mm e 0,237 mm, respectivamente. É interessante observar que apenas o verde de malaquita permeou menos no período de 5 minutos. No período de 1 minuto os três FS empregados tiveram comportamento de permeação semelhante (0,150 mm).

Os resultados encontrados são aplicáveis ao estudo de LIMA e colaboradores (2009)³ que realizaram uma pesquisa *in situ* sobre amostras de dentina. Foi utilizado o azul de o-toluidina a 0,1 mg/mL como FS associado a um LED com comprimento de onda de 638,8 nm. A inativação bacteriana foi efetiva aliada à capacidade de permeação do azul de o-toluidina

nas amostras de dentina. A concentração de 0,1 mg/mL para o azul de o-toluidina tem sido bastante aplicada na literatura^{3, 4, 5, 7, 9, 10}, fator que influenciou a escolha desse valor de concentração para avaliação da permeação nesta pesquisa.

A permeação do azul de metileno também é aplicável ao estudo de BAPTISTA (2009)¹² que avaliou a ação da PDT sobre dentes de ratos inoculados com *S. mutans* e submetidos à dieta cariogênica. O azul de metileno a 0,03 mg/mL permaneceu em contato com o molar dos animais por 5 minutos e, após irrigação com solução salina para remoção do excesso do FS, realizou-se a irradiação com LED com comprimento de onda de 640 nm, por 3 min. Após a aplicação da PDT os molares foram extraídos e submetidos à análise microbiológica, que evidenciou a inativação bacteriana. Nota-se que mesmo com a utilização de uma concentração mais baixa (0,03 mg/mL), compatível com o período de exposição testado (5 minutos), a inativação bacteriana ocorreu aliada à permeação do FS nos molares dos animais.

Quando se realizou o ajuste exponencial pela integração das áreas formadas pelos sinais fotoacústicos na região de 450 nm a 750 nm, observou-se que os valores médios de τ encontrados para o azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita diferiram. O azul de metileno alcançou o maior índice de permeação uma vez que os resultados estimaram que 37% desse FS está presente em 0,180 mm de espessura das amostras de dentina que receberam a aplicação desse FS, independente do período de exposição utilizado. Apesar de o verde de malaquita apresentar o menor índice de permeação, pois os resultados estimaram que 37% desse FS está presente em 0,140 mm de espessura das amostras de dentina avaliadas, essa diferença foi de apenas 0,040 mm comparada ao azul de metileno. Entretanto, é importante salientar que o objetivo do presente trabalho foi verificar a existência e a quantidade de permeação dos FS na dentina, e não selecionar um FS.

Mesmo apresentando os menores valores de permeação, o verde de malaquita é um FS bastante viável por ser utilizado na rotina do consultório odontológico como evidenciador de placa bacteriana. Não foram encontrados trabalhos que utilizaram o verde de malaquita para a aplicação da PDT sobre microrganismos cariogênicos, entretanto PRATES (2005)¹⁹ avaliou *in vitro* a ação do verde de malaquita a 0,1 mg/mL sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, espécie associada à doença periodontal. O FS permaneceu em contato com os microrganismos durante 5 minutos e após esse período, realizou-se a irradiação com um laser diodo GaAIAs vermelho, com comprimento de onda de 660 nm, 30 mW de potência e fluência de 5,4 e 9

J/cm² durante 3 e 5 minutos respectivamente. A associação do FS e da fonte de luz causou redução bacteriana de 97,4% para o período de irradiação de 3 minutos e 99,9% para o período de irradiação de 5 minutos. O verde de malaquita também foi aplicado *in vitro*⁶⁴ sobre o *Staphylococcus aureus* com uma concentração de 2,5 mg/mL associado à uma lâmpada de arco de xenônio com comprimento de onda de 630 nm. Foram realizados períodos de irradiação de 30 segundos, 1 minuto e 5 minutos, e notou-se que a inativação bacteriana é dose-dependente e susceptível a fatores externos como o preparo das amostras e a performance durante a irradiação. Assim, o verde de malaquita apresenta potencial antimicrobiano o que possibilita a sua utilização na PDT sobre os microrganismos cariogênicos.

Também é importante considerar a aplicabilidade da PDT sobre a cárie instalada, uma vez que nessa condição há a presença de microrganismos específicos que possuem certa capacidade de permeação. O intuito da aplicação da PDT é atingir a profundidade alcançada por esses microrganismos e inviabilizá-los. De acordo com a espécie, o tempo de instalação da doença e a região da dentina afetada bactérias foram encontradas⁸⁵ em até 500 µm de distância de sua fonte de infecção, entretanto o *Streptococcus*, que é uma espécie potencialmente cariogênica, foi encontrado⁸⁶ em 200 µm de profundidade. De acordo com os resultados do presente estudo, o azul de metileno, com exposição de 5 e 30 minutos, o azul de o-toluidina, com exposição de 5 minutos, e o verde de malaquita, com exposição de 30 minutos, seriam capazes de atingir a profundidade em que o *Streptococcus* foi encontrado. Estudos realizados^{87, 88} mostraram que a pasta de hidróxido de cálcio pode reduzir a viabilidade bacteriana a uma profundidade de 200 µm de dentina em sete dias, que também não inviabiliza a aplicação dos fotossensibilizadores avaliados uma vez que sua ação é imediata. Também a efetividade da profundidade de penetração do érbio, cromo: ítrio-escândio-gálio-granada (Er,Cr:YSGG) a laser para verificar a redução microbiana foi avaliada⁸⁹. Discos de dentina radicular inoculados com *Enterococcus faecalis* foram irradiados em espessuras que variavam de 100 a 1000 µm. A redução bacteriana ocorreu a partir da espessura de 500 µm. Entretanto, os LEDs são uma fonte de luz bastante acessíveis ao odontólogo devido à sua eficácia na associação com os FS empregados neste estudo e ao seu baixo custo^{10, 54, 65}.

Por outro lado, apesar dos FS apresentarem capacidade de permeação viáveis para realização da inativação bacteriana, deve-se considerar também que as espessuras reais

encontradas de detecção dos FS, aferidas com o micrômetro, não se referem necessariamente àquelas em que os FS foram realmente detectados devido ao comprimento de difusão térmica da dentina⁸⁴. O valor de μ encontrado para a dentina ($\mu=60 \mu\text{m}$), na frequência de 16 Hz, mostra que as leituras em PAS foram realizadas a uma profundidade de 60 μm , ou seja, a varredura de frequência foi realizada nos primeiros 60 μm de profundidade da amostra e não se sabe exatamente em que local desses 60 μm o FS foi detectado. Assim, se a espessura em que a amostra se encontrava na primeira detecção do FS aferida com o micrômetro era de 0,250 mm, considerando o μ , sabe-se que o FS permeou pelo menos 0,190 mm em dentina. Porém, se a frequência fosse aumentada para 40 Hz por exemplo, ocorreria uma diminuição de profundidade de leitura ou uma leitura mais superficial. Assim, pode-se afirmar que o FS atingiu 0,190 mm, mas não se pode dizer que esse valor não foi maior uma vez que a variação da frequência não foi realizada.

Em relação às possíveis reações ocorridas entre os fotossensibilizadores e a dentina, e a composição e concentração dos FS utilizados, os resultados obtidos em FTIR-PAS sugerem que não ocorreram ligações químicas entre os FS utilizados e a dentina. Outro fator importante é relacionar a concentração do FS utilizado e a sua influência na efetividade da PDT. A formação de agregados modifica o espectro de absorção do FS e suas propriedades fotofísicas, como mostra a Figura 38 e o Quadro 6, que pode influenciar na sua ação como um fotossensibilizador. O estado agregado geralmente ocorre com o aumento da concentração do FS, especialmente em corantes hidrofóbicos, que passam de monômeros para dímeros ou formas auto-agregadas. Em baixas concentrações, a forma monomérica predomina e o espectro do FS possui uma banda de absorção predominante, mas com o aumento da concentração, pode ocorrer o aparecimento de uma banda adicional e a absorção do FS pode ser modificada. Para o azul de metileno na forma monomérica sua máxima absorção ocorre no comprimento de onda de 660 nm, enquanto que no seu estado agregado essa máxima absorção ocorre em 610 nm. O azul de toluidina na forma monomérica possui máxima absorção em 630 nm, e em seu estado agregado ela ocorre em 590 nm⁹⁰. Na PDT, o FS na forma monomérica reage predominantemente pelo mecanismo TIPO II, com formação de oxigênio singleto, enquanto os FS que se encontram na forma de dímeros realizam o mecanismo TIPO I. Os dois tipos de reação são importantes para o processo fotodinâmico^{46, 91}. Para o azul de toluidina em concentrações superiores a 0,01 mg/mL ocorre predominância de agregados, e para o azul de metileno esse fato ocorre em concentrações superiores a 0,0003 mg/mL⁹⁰. Dessa maneira, deve-se correlacionar a concentração do FS utilizado e o estado das moléculas

desse FS com a capacidade de absorção no comprimento de onda adequado. No entanto, nos trabalhos avaliados neste estudo que aplicaram a PDT sobre os microrganismos bucais com a utilização do azul de metileno ou azul de toluidina como fotossensibilizadores, poucos trabalhos^{6, 8} utilizaram a capacidade máxima de absorção do FS em função do uso adequado da concentração e comprimento de onda utilizados. As pesquisas devem atentar-se para este fato a fim de buscar a melhor efetividade da PDT.

Os resultados de permeação para os fotossensibilizadores testados foram efetivos, principalmente no tempo de exposição de 5 minutos que é aplicável para a prática clínica. O fato de trabalhar em concentrações baixas diminui o risco de manchamento das restaurações e também o fotossensibilizador verde de malaquita associado ao LED é bastante acessível ao odontólogo.

6.2. Discussão da metodologia

Os dentes coletados para utilização neste estudo foram extraídos e imediatamente armazenados em água destilada bem como as amostras obtidas a partir desses dentes, assim deve-se considerar a provável presença de líquido no interior dos túbulos dentinários ao receber a aplicação do fotossensibilizador. Clinicamente, os túbulos dentinários são preenchidos pelo fluido pulpar²⁶ e este fator pode influenciar na permeabilidade do composto, bem como a composição do fluído⁹².

Quando se realizou a delimitação do corte para obtenção das amostras avaliadas no estudo, deve-se considerar que elas foram confeccionadas a partir de uma região profunda da dentina, próxima à câmara pulpar. A dentina é um tecido extremamente poroso, não homogêneo e sua estrutura e fisiologia possuem particularidades que variam de acordo com a idade, região da dentina e de acordo com reações que podem ocorrer em resposta a estímulos traumáticos ou patológicos, como a calcificação e a desmineralização por exemplo, e ainda a geração de outros tipos de dentina²⁶. Assim, cada dente é um elemento individual o que dificulta a homogeneização das amostras.

Em relação à idade, sabe-se que dentes jovens são menos mineralizados e conseqüentemente mais permeáveis. À medida que ocorre o envelhecimento dentário

gradualmente tem-se mais mineralização devido ao aumento da dentina peritubular, que causa certa obstrução dos túbulos dentinários e a diminuição da permeabilidade²⁶. A permeabilidade dentinária radicular foi testada⁹³ de acordo com a idade e para isso utilizou-se o azul de metileno a 5% como marcador. Foram avaliados dentes unirradiculares extraídos de pacientes com idade de até 30 anos, de 30 a 45 anos, de 45 a 60 anos e com mais de 60 anos. A região de secção, a idade do paciente e o tempo de permeação do marcador influenciaram significativamente na permeabilidade. As áreas de permeação do corante diminuíram com o aumento da idade. No presente estudo a maioria dos dentes utilizados foram de adultos jovens, pois de maneira geral os dentes coletados eram terceiros molares não irrompidos ou pré-molares extraídos por indicação ortodôntica, mas ainda assim não se conseguiu padronizar a idade dos dentes.

Os túbulos dentinários encontrados na região em que as amostras foram obtidas apresentam características correspondentes às da dentina profunda, localizada próxima à câmara pulpar, ou seja, possuem um diâmetro maior comparado ao diâmetro dos túbulos encontrados na região próxima ao esmalte dentário. De acordo com a microscopia eletrônica de varredura realizada neste estudo, o valor médio do diâmetro das amostras utilizadas foi de 3,64 μm , compatível com os valores estimados para essa região^{70, 71}. Obviamente, a permeabilidade dentinária é mais acentuada na região em que o diâmetro dos túbulos é maior, ainda assim essa região foi escolhida para ser testada por tratar-se de uma área crítica em que a PDT atua como coadjuvante no tratamento conservador da cárie. A permeabilidade dentinária da região cervical de cortes de dentina realizados na porção oclusal e vestibular foi testada⁹². A condutância hidráulica da água e de soro bovino foram avaliadas nessas duas regiões que curiosamente apresentaram características similares *in vitro*. Já a composição do fluido influenciou na permeabilidade dentinária.

Também deve-se observar as propriedades ópticas da dentina, como a absorção e a dispersão ou espalhamento do feixe de luz do equipamento utilizado sobre as amostras. Estudos mostram^{94, 95} que o coeficiente de absorção parece não depender do comprimento de onda utilizado e a absorção não apresentou diferença significativa entre diferentes regiões do dente. Os cristais minerais presentes na dentina parecem não ser a causa predominante da dispersão da luz, esta parece estar diretamente relacionada ao diâmetro dos túbulos dentinários uma vez que o coeficiente de dispersão da dentina foi maior em regiões próximas à polpa. O coeficiente de dispersão parece depender do comprimento de onda utilizado e

comporta-se de maneira inversamente proporcional⁹⁵. Os valores dos coeficientes de absorção e dispersão encontrados para a dentina normal foram 0,03 e 9,0 respectivamente⁹⁴. Esses valores estão diretamente relacionados com o grau de transparência e espessura da amostra, além disso o coeficiente de dispersão possui maior variação de acordo com as particularidades da amostra e o coeficiente de absorção possui maior estabilidade. No presente estudo os túbulos dentinários não se encontravam vazios, pois estavam armazenados em água destilada e, de acordo com a microscopia óptica realizada neste estudo, ocorreu a impregnação dos túbulos com os fotossensibilizadores utilizados. Este fato pode influenciar nos coeficientes de absorção e dispersão óptica da amostra.

Algumas condições clínicas também influenciam sobre a permeabilidade dentinária²⁶. As amostras utilizadas foram confeccionadas a partir de dentes hígidos, entretanto a calcificação e o grau de desmineralização dentária são fatores que afetam a permeabilidade, e certamente a aplicação da PDT será realizada em dentes que sofreram alterações. A calcificação do tecido dentinário, ou mineralização, é uma reação biológica de proteção do tecido à câmara pulpar frente à determinada agressão, ou também pode ocorrer em resposta a um processo fisiológico de envelhecimento. Nesses tipos de reações ocorre a deposição de cristais minerais dentro dos túbulos dentinários e conseqüentemente sua obstrução, o que torna a dentina menos permeável. Cristais minerais intratubulares foram encontrados²⁶ após a aplicação de hidróxido de cálcio e água em preparo cavitário realizado em dentina de dente jovem e hígido. Foi observada redução da permeabilidade com a utilização do azul de metileno como marcador. Também, de acordo com estudo de detecção e prevalência⁹⁶, a calcificação é a principal resposta do tecido à cáries, restaurações e erosões. A calcificação no assoalho da câmara pulpar e nos canais radiculares está relacionada com o aumento da idade, bem como sua extensão na direção apical à cervical e redução da permeabilidade dentinária. No presente estudo, observou-se que os dentes que apresentavam calcificação dentinária não permitiram a permeação dos fotossensibilizadores, o que dificultou a comparação com os dentes que não apresentavam calcificação. Dessa maneira, os dentes calcificados foram descartados.

A desmineralização do esmalte e da dentina é uma característica predominante da cárie aguda. Nesse estágio, ocorre perda da estrutura mineral do dente e formação de porosidades que causa o aumento da permeabilidade dentinária. A cárie aguda possui progressão rápida e caracteriza-se por apresentar tecido desmineralizado e mole, com

coloração amarela ou amarelo-alaranjada e aspecto úmido. Já a cárie crônica caracteriza-se por apresentar tecido moderadamente mole, com cor marrom escura e aspecto seco. Sua progressão é lenta, com deposição mineral e oclusão dos túbulos dentinários subjacente à área desmineralizada. Parte do mineral depositado é perdido com a progressão da cárie, mas como o processo ocorre de forma lenta, o mineral é re-precipitado como cristais intratubulares caracterizando um mecanismo de defesa físico-químico do tecido, com redução da permeabilidade da dentina afetada²⁶. Modificações químicas de acordo com diferentes graus de desmineralização em superfícies dentárias causadas pelos ácidos maleico, cítrico, nítrico e fosfórico com pH=1.0 foram avaliadas com a técnica de espectroscopia fotoacústica em infravermelho (PA-FTIRS). Uma diminuição das bandas referentes à hidroxiapatita e carbonato-apatita foi observada²⁸.

Finalmente, com as considerações realizadas, observa-se que a aplicação da PDT sobre a dentina cariada possui aplicabilidade clínica e pode se tornar uma técnica efetiva e viável no consultório odontológico uma vez que apresenta características promissoras atuando como coadjuvante no tratamento da cárie. Os resultados obtidos mostraram-se efetivos para o tempo de exposição de 5 minutos, aplicável para a prática clínica. O fato de trabalhar em concentrações baixas diminui o risco de manchamento das restaurações e também o fotossensibilizador verde de malaquita associado ao LED é bastante acessível ao odontólogo. No entanto, devido à pequena quantidade de amostras avaliadas e ao fato de não conseguirmos avaliar os FS empregados em concentrações menores, outros estudos devem ser realizados. Futuras pesquisas podem ser realizadas com a utilização de amostras obtidas a partir de uma região mais próxima ao esmalte dentário ou ainda avaliar o comportamento de permeação dos fotossensibilizadores aplicados sobre amostras afetadas pela cárie. A continuidade e complementação dos resultados obtidos seriam um respaldo aos conhecimentos adquiridos com este estudo.

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais, observou-se que:

- O azul de metileno, azul de o-toluidina e verde de malaquita a 0,1 mg/mL apresentaram capacidade de permeação em dentina;

- O período de exposição de 5 ou 30 minutos não influenciou no comportamento de permeação do MB (0,246 mm) e (0,245 mm), respectivamente. Entretanto, o TBO e o MG apresentaram variação no comportamento de permeação para os períodos de 5 minutos (0,220 mm) e (0,180 mm), e 30 minutos (0,193 mm) e (0,237 mm), respectivamente. Para o tempo de exposição de 1 minuto, os três FS apresentaram comportamento de permeação semelhante (0,150 mm). Em relação à concentração de 0,01 mg/mL, não foi possível quantificar a permeação dos FS;

- Não foram detectadas modificações químicas entre os FS e a dentina;

- Houve impregnação dos FS nos túbulos dentinários;

- Os três FS avaliados apresentaram comportamento de permeação favorável sobre a estrutura dentinária o que viabiliza sua aplicação na superfície dentinária e utilização na PDT para a descontaminação da dentina cariada como coadjuvante no tratamento da cárie dentária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOURADIAN, W.E.; WERH,E.; CRALL, J.J. Disparities in children's oral health and access to dental care. *JAMA*. 284(20): 2625-31, 2000.
2. PORTO, C.L.A.; PEREIRA, J.C.; NETTO, C.A. *Cariologia: grupo brasileiro de professores de dentística*. São Paulo: Artes Médicas, 2008.
3. LIMA, J.P.M.; MELO, M.A.S.; BORGES, F.M.C.; TEIXEIRA, A.H.; STEINER-OLIVEIRA, C.; SANTOS, M.N.; RODRIGUEUS, 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*. 117: 568-574, 2009.
4. ZANIN, I.C.J.; LOBO, M.M.; RODRIGUES, L.K.A.; PIMENTA, L.A.F.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci*. 114: 64-9, 2006.
5. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Effect of dentine and collagen on the lethal photosensitization of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 29(3): 192-7, 1995.
6. 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*. 37: 190-3, 2003.
7. ZANIN, J.C.I.; GONÇALVES, R.B.; BRUGNERA JR, A.; HOPE, C.K.; PRATTEN, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother*. 56: 324-30, 2005.
8. WOOD, S.; METCALF, D.; DEVINE, D.; ROBINSON, C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 57: 680-4, 2006.
9. BEVILACQUA, I.M.; NICOLAU, R.A.; KHOURI, M.; BRUGNERA JR, A.; TEODORO, G.R.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T.T. The impact of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photomed Laser Surg*. 25(6): 513-18, 2007.
10. GIUSTI, J.S.M.; SANTOS-PINTO, L.; 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 Surg*. 26(4): 281-7, 2008.
11. ARAÚJO, P.V.; TEIXEIRA, K.I.R.; LANZA, L.D.; CORTES, M.E.; POLETTO, L.T.A. *In vitro* lethal photosensitization of *S. Mutans* using methylene blue and toluidine blue o as photosensitizers. *Acta Odontol Latinoam*. 22(2): 93-7, 2009.
12. BAPTISTA, A. *Efeito da terapia fotodinâmica na doença cárie. Estudo in vivo*. Dissertação de mestrado profissionalizante em *lasers* em odontologia apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2009.
13. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, J.; PEARSON, G.J. Bacteria in supra gingival plaque samples can be killed by low – power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacterio*. 78(5): 569-574, 1995.
14. SOARES, R.R.S. *Estudo de propriedades da clorofila a e da feofitina a visando a terapia fotodinâmica*. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, 2006.
15. KOMERIK, N.; MACROBERT, A.J. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 25(1-2): 487-504, 2006.

16. MALIK, Z. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B.* 5(3-4): 281-93, 1990.
17. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol.* 38(6): 401-5, 1993.
18. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON, G.J. Killing of cariogenic bacteria by light from gallium arsenide diode laser. *J Dent.* 22(5): 273-8, 1994.
19. PRATES, R.A. *Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: Ação bactericida sobre Actinobacillus actinomycescomitans - um estudo in-vitro.* Dissertação de mestrado profissionalizante em lasers em odontologia apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2005.
20. FISH, E.W. An experimental investigation of enamel, dentine and pulp. London, 1983 apud MARSHALL, J.F.; MASSLER, M.; DUTE, H.L. Effects of endodontic treatments on permeability of root dentine. *Oral Surg.* 13(2): 208-23, 1960.
21. WAINWRIGHT, W.W.; BELGOROD, H.H. Time studies the penetration of extracted human teeth by radioactive nicotinamide, urea, thiourea and acetamide. *J Dent Res.* 34(1): 28-36, 1955.
22. ANDERSON, D.J.; RONNING, G.A. Dye diffusion in human dentine. *Arch Oral Biol.* 7(4): 505-12, 1962.
23. MARSHALL, F.J.; MASSLER, M.; DUTE, H.L. Effects of endodontics treatment of root dentine. *Oral Surg.* 13(2): 208-23, 1960.
24. OUTHWAITE, W.C.; LIVINGSTON, M.J.; PASHLEY, D.H. Effects of changes in surface area, thickness, temperature and post-extraction tissue on human dentine permeability. *Arch Oral Biol.* 21(10): 599-603, 1976.
25. PASHLEY, D.H.; LIVINGSTON, M.J. Effect of molecular size on permeability coefficients in human dentine. *Arch Oral Biol.* 23(5): 391-95, 1978.
26. MJÖR, I.A. Dentin permeability: the basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J.* 20(1): 3-16, 2009.
27. PEDROCHI, F. *Estudo de sistemas biológicos "in vitro" e "in vivo" utilizando a espectroscopia fotoacústica.* Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, 2004.
28. DI RENZO, M.; ELLIS, T.H.; SACHER, E.; STANGEL, I. A photoacoustic FTIRS study of the chemical modifications of human dentin surfaces: I. Demineralization. *Biomaterials.* 22(8):787-92, 2001.
29. BAESSO, M.L.; SNOOK, R.D.; ANDREW, J.J. Fourier-transform infrared photoacoustic-spectroscopy to study the penetration of substances through skin. *J Phys IV.* 4(C7): 449-51, 1994.
30. NUGLISCH, L.E.R.; DIAS, D.T.; SEHN, E.; BENTO, A.C.; BAESSO, M.L.; SANTOS, S.T.S.; FUSHIMI, M.Y. Photoacoustic spectroscopy to evaluate the penetration of two antifungal agents through the human nail. *J Phys IV.* 125: 631-33, 2005.
31. PINTO, V.G. Relacionamento entre padrões de doença e serviços de atenção odontológica. *Rev Saude Publ.* 23(6): 509-14, 1989.
32. PETERSEN, P.E.; LENNON, M.A. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 32: 319-21, 2004.

33. NARVAI, P.C.; FRAZÃO, P.; RONCALLI, A.G.; ANTUNES, J.L.F. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*. 19(6): 385-93, 2006.
34. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 50(4): 353-80, 1986.
35. BOWEN, W.H.; TABAK, L.A. *Cariologia para a década de 90*. 1.ed. São Paulo: Santos, 1995.
36. RUSSELL, R.R. Changing concepts in caries microbiology. *Am J Dent*. 22(5): 304-10, 2009.
37. MARSH, P.D.; BRADSHAW, D.J. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*. 15: 169-75, 1995.
38. ZAMPIERI, M.J.P.; COGO, J.C.; GENOVESE, W.J.; BARBOSA, A.D. Photodynamic therapy in bacterias *St. mitis St sanguis*, "in vitro". *Rev Bras Implant*. 9(2): 16-7, 2003.
39. MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 8: 263-71, 1994.
40. MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(1): 71-109, 1998.
41. THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. *Cariologia clínica*. 2.ed. São Paulo: Santos, 1995.
42. WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol*. 25(2): 77-81, 1992
43. HEWITT, P.G. *Física conceitual*. 9 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
44. FEITOSA-SANTANA, C.; OIWA, N.N.; COSTA, M.F.; TIEDEMANN, K.B.; SILVEIRA, L.C.L.; VENTURA, D.F. Espaço de cores. *Psicologia USP*. 17(4): 35-62, 2006.
45. WILSON, B.C.; PATTERSON, M.S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol*. 53: 61-109, 2008.
46. SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*. 25(5): 801-7, 2002.
47. TEDESCO, A.C. Processos Fotodinâmicos: "A Luz" de uma nova terapia aplicada à saúde humana. *J Bras Laser*. 1(4): 32-41, 2007.
48. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 42: 13-28, 1998.
49. SILVA, R.C. *Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica*. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.
50. WILSON, M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol*. 3:412-18, 2004.
51. RAAB, O. *Z Biol*. 39, 524, 1900 apud SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*. 25(5): 801-7, 2002.
52. VON TAPPEINER, H. *Muench. Med Wochenschr*. 47, 2024, 1903 apud SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova*. 25(5): 801-7, 2002.
53. STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. *Tetrahedron*. 54: 4151-4202, 1998.

54. DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low – power laser. *Arch Oral Biol.* 37(11): 883-7, 1992.
55. OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye–mediated bactericidal effect of He–Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg Med.* 12(4): 450-8, 1992.
56. WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol.* 75(4): 299-306, 1993.
57. WILSON, M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque – related diseases. *Int Dent J.* 44(2): 181-9, 1994.
58. 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.* 29(2): 165-73, 2001.
59. MELLISH, K.J.; COX, R.D.; VERNON, D.I.; GRIFFITHS, J.; BROWN, S.B. *In vitro* photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochem Photobiol.* 75(4): 392–7, 2002.
60. PAULINO, T.P.; RIBEIRO, K.F.; THEDEI, G.; TEDESCO, A.C.; CIANCAGLINI, P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 50: 353-9, 2005.
61. TARDIVO, J.P.; GIGLIO, A.D.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R.F.; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2: 175-191, 2005.
62. BUCK, S.T.G. *Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica.* Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2009.
63. HARRIS, F.; SAYED, Z.; HUSSAIN, S.; PHOENIX, D.A. An investigation into the potential of phenothiazinium-based photo-sensitisers to act as PDT agents. *Photodiagnosis and Photodyn Ther.* 1: 231-39, 2004.
64. GOLDING, P.S.; KING, T.A.; MADDOCKS, L.; DRUCKER, D.B.; BLINKHORN, A.S. Photosensitization of *Staphylococcus aureus* with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. *J Photochem Photobiol B.* 47(2-3): 202-10, 1998.
65. GIUSTI, J.S.M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITTO, A.C.; KURACHI, C.; BAGNATO, V.S. Effectiveness of Photogem® activated by LED on the descontamination of artificial carious bovine dentin. *Lasers Physics.* 16(5): 859-64, 2006.
66. METCALF, D.; ROBINSON, C.; DEVINE, D.; WOOD, S. Enhancement of erithrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *J Antimicrob Chemother.* 58: 190-2, 2006.
67. MAISCH, T.; WAGNER, J.; PAPASTAMOU, V.; NERL, H.J.; HILLER, K.A.; SZEIMIES, R.M.; SCHMALZ, G. Combination of 10% EDTA, Photosan, and a blue light hand-held photopolymerizer to inactivate leading oral bacteria in dentistry *in vitro*. *J Appl Microbiol.* 107: 1569-78, 2009.
68. BOLEAN, M.; PAULINO, T.P.; THEDEI JR, G.; CIANCAGLINI, P. Photodynamic therapy with rose bengal induces Groel expression in *Streptococcus mutans*. *Photomed Laser Surg.* 28(1): 79-84, 2010.
69. BODECKER, C.F.; LEFKOWITZ, W. Further observations on vital staining of dentin and enamel. *J Dent Res.* 25(5): 387-99, 1946.
70. BHASKAR, S.N. *Histologia e embriologia oral de Orban.* 10 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989.

71. MJÖR, I.A.; FEJERSKOV, O. *Embriologia e histologia oral humana*. São Paulo: Panamericana, 1990.
72. PASHLEY, D.H.; NELSON, R.; KEPLER, E.E. The effects of plasma and salivary constituents on dentin permeability. *J Dent Res*. 61(8): 978-81, 1982.
73. HANKS, C.T.; FAT, J.C.; WATAHA, J.C.; CORCORAN, J.F. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *J Dent Res*. 72(5): 931-8, 1993.
74. GÖKAY, O.; MÜJDECI, A.; ALGIN. E. Peroxide penetration into the pulp from whitening strips. *J Endod*. 30(12): 887-9, 2004.
75. CAMARGO, S.E.A.; CARDOSO, P.E.; VALERA, M.C.; ARAÚJO, M.A.M.; KOJIMA, A.N. Penetration of 35% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine teeth after LED or Nd:YAG laser activation. *Eur J Esthet Dent*. 4(1): 82-8, 2009.
76. PINTO, S.C.S.; POCHAPSKI, M.T.; WAMBIER, D.S.; PILATTI, G.L.; SANTOS, F.A. In vitro and in vivo analyses of the effects on desensitizing agents on dentin permeability and dentinal tubule occlusion. *J Oral Sci*. 52(1): 23-32, 2010.
77. SAURO, S.; WATSON, T.F.; MANNOCCI, F.; MIYAKE, K.; HUFFMAN, B.P.; TAY, F.R.; PASHLEY, D.H. Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 90(1): 327-37, 2009.
78. BENETTI, A.R.; VALERA, M.C.; MANCINI, M.N.G.; MIRANDA, C.B.; BALDUCCI, I. *In vitro* penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Int Endod J*. 37: 120-4, 2004.
79. GÖKAY, O.; MÜJDECI, A.; ALGIN. *In vitro* peroxide penetration into the pulp chamber from newer bleaching products. *Int Endod J*. 38: 516-20, 2005.
80. CARVALHO, G.L.; HABITANTE, S.M.; MARQUES, J.L.L. Análise da alteração da permeabilidade dentinária promovida pela substância Endo PTC empregando diferentes veículos. *Cienc Odontol Bras*. 8(4): 23-8, 2005.
81. CAMARGO, S.E.A.; VALERA, M.C.; CAMARGO, C.H.R.; MANCINI, M.N.G.; MENEZES, M.M. Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique. *JOE*. 33(9): 1074-77, 2007.
82. ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. *J Appl Phys*. 47(1): 64-9, 1976.
83. PARKER, J.G. Optical absorption in glass: Investigation using an acoustic technique. *Appl Opt*. 12(12): 2974-77, 1973.
84. MAGALHÃES, M.F.; FERREIRA, R.A.N.; GROSSI, P.A.; ANDRADE, R.M. Measurement of thermophysical properties of human dentin: Effect of open porosity. *J Dent*. 36: 588-94, 2008.
85. HAAPASALO, M.; ORSTAVIK. D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 66(8): 1375-79, 1987.
86. LOVE, R.M.; MCMILLAN, M.D.; JENKINSON, H.F. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infect Immun*. 65(12): 5157-64, 1997.
87. CWIKLA, S.J.; BÉLANGER, M.; GIGUÈRE, S.; PROGULSKE-FOX, A.; VERTUCCI, F.J. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *J Endod*. 31(1): 50-2, 2005.
88. LIN, S.; TESIS, I.; ZUKERMAN, O.; WEISS, E.I.; FUSS, Z. Effect of electrophoretically activated calcium hydroxide on bacterial viability in dentinal tubules – *in vitro*. *Dent Traumatol*. 21(1): 42-5, 2005.

89. FRANZEN, R.; ESTEVES-OLIVEIRA, M.; MEISTER, J.; WALLERANG, A.; VANWEERSCH, L.; LAMPERT, F.; GUTKNECHT, N. Decontamination of deep dentin by means of erbium, chromium:yttrium-scandium-gallium-garnet laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 24: 75-80, 2009.
90. USACHEVA, M.N.; TEICHERT, M.C.; BIEL, M.E. The role of methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B.* 71: 87-98, 2003.
91. VALDES-AGUILERA, O.; NECKERS, D.C. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc Chem Res.* 22: 171-77, 1989.
92. ÖZOK, A.R.; WU, M.-K.; WESSELINK, P.R. Comparison of the in vitro permeability of human dentine according to the dentinal region and the composition of the simulated dentinal fluid. *J Dent.* 30: 107-11, 2002.
93. THALER, A.; EBERT, J.; PETSCHERT, A.; PELKA, M. Influence of tooth age and root section on root dentine dye penetration. *Int Endod J.* 41: 1115-22, 2008.
94. MANLY, R.S.; RONNER, J.F.; HODGE, H.C. Light scattering in normal human dentine. The calculation of absorption and scattering constants. *Department of Biochemistry and Pharmacology, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, Rochester, New York.* 745-51, 1939.
95. BOSCH, J.J.; ZIJP, J.R. Optical properties of dentin. [In: *Dentine and dentine reactions in the oral cavity.* THYLSTRUP, A.; LEACH, S.A.; QVIST, V. eds. (IRL Press Ltd, Oxford, England, 1987) pp 59-65, by permission of Oxford University Press.]
96. STANLEY, H.R.; PEREIRA, J.C.; SPIEGEL, E.; BROOM, C.; SCHULTZ, M. The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. *J Pathol.* 12: 257-89, 1983.

ANEXO



Universidade Estadual de Maringá

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Registrado na CONEP em 10/02/1998

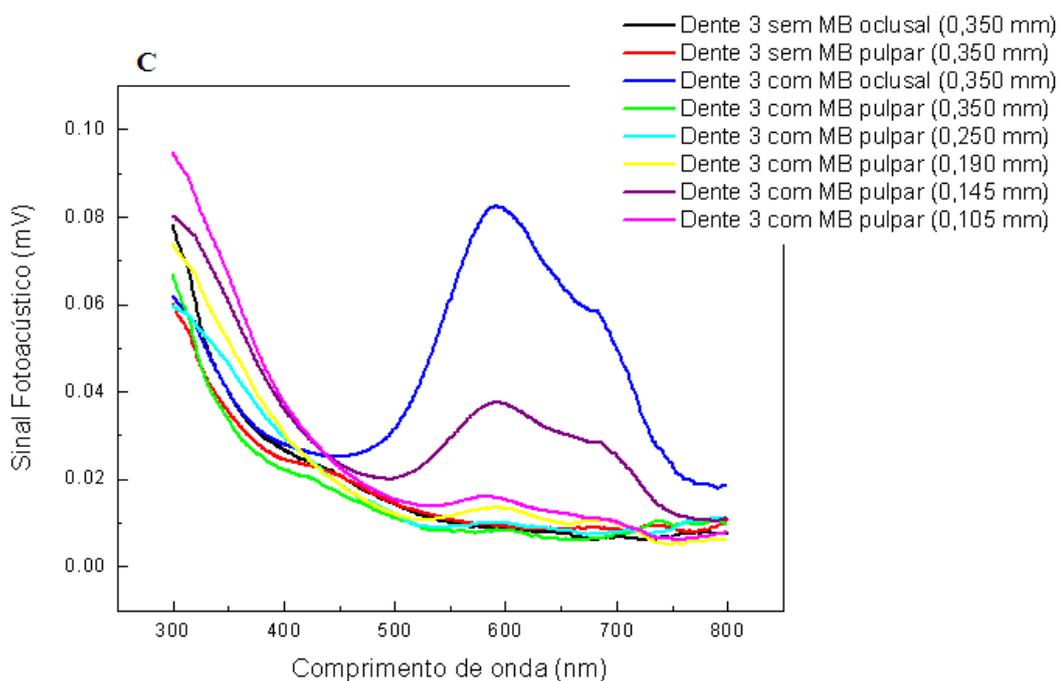
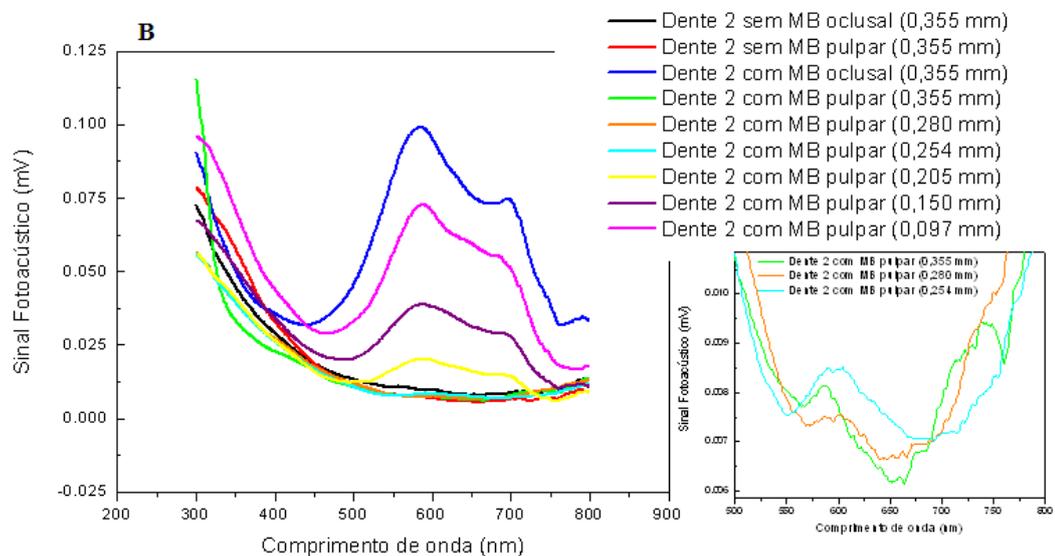
CAAE Nº.0355.0.093.000-09

PARECER Nº. 674/2009

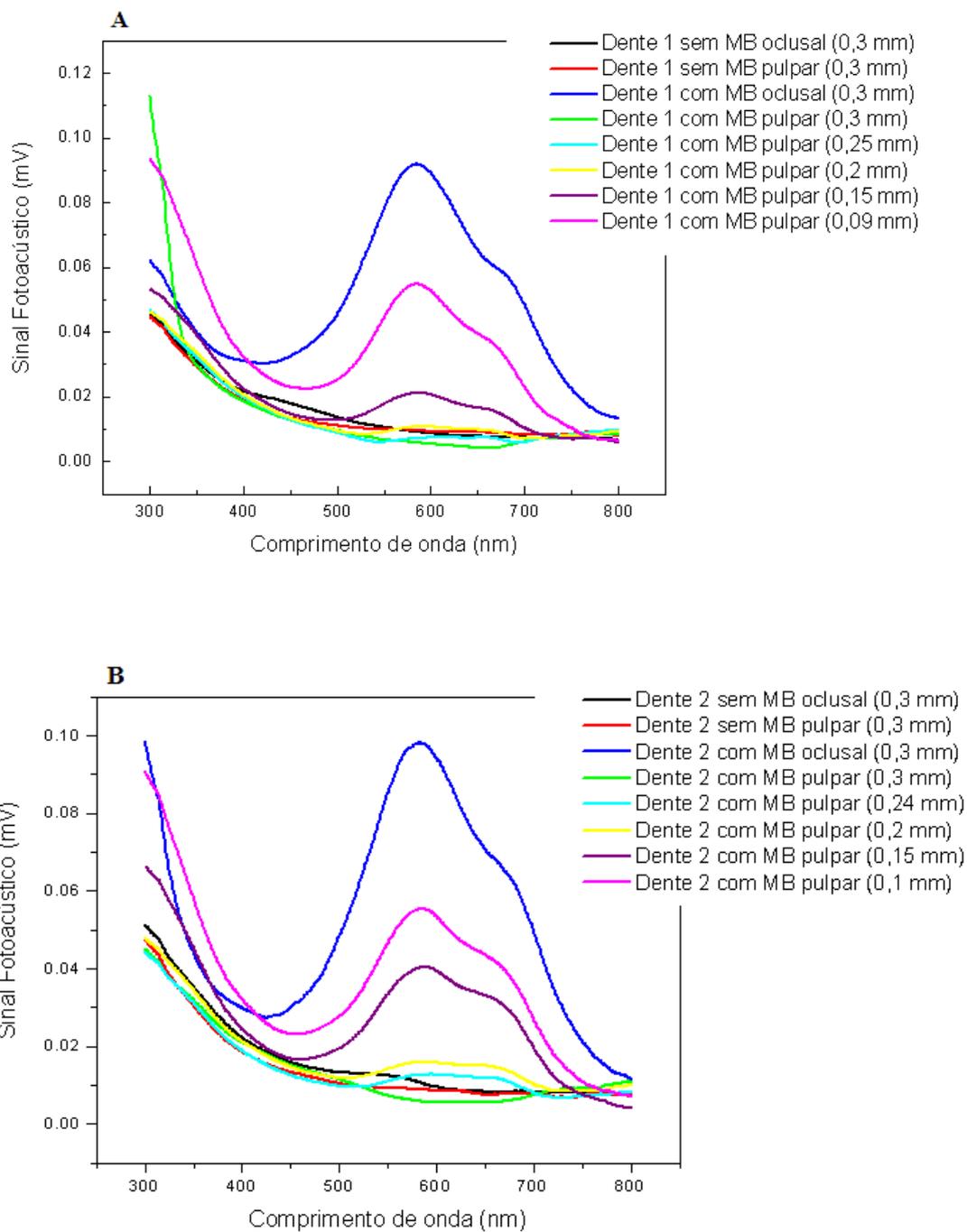
Pesquisador (a) Responsável: RAQUEL SANO SUGA TERADA	
Centro/Departamento: CCS/Departamento de Odontologia	
Título do projeto: Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica associada ao tratamento restaurador atraumático sobre a cárie dentária.	
Considerações: <p>Trata-se de um projeto de pesquisa que tem como objetivo geral determinar a melhor aplicação clínica da terapia fotodinâmica sobre a cárie dentária. Este estudo será realizado em duas fases: primeiramente serão realizados testes <i>in vitro</i>, onde será definida a combinação de corante-fonte de luz mais eficiente na indução de morte bacteriana. Serão testados os corantes azul de metileno, azul de o-toluidina, clorofila e verde de malaquita, os quais serão irradiados com led vermelho ou laser. Na segunda fase, a melhor combinação corante-fonte de luz na indução de morte bacteriana <i>in vitro</i> será aplicada em 10 sujeitos jovens da Clínica Odontológica da UEM que apresentam cárie ativa, avaliando-se o número de colônias obtidas a partir do material cariado coletado antes e após tratamento fotodinâmico antimicrobiano.</p> <p>A documentação apresentada inclui cronograma de execução com início de coleta dos dados dos pacientes em abril de 2010 e encerramento do projeto em novembro de 2010; TCLE de acordo com a Res. 196/96 CNS; cronograma financeiro relativo a material de consumo a ser fornecido pelo Departamento de Química e pela Clínica Odontológica da UEM no valor de R\$1839,63; autorizações do coordenador da Clínica Odontológica da UEM, (Prof. Dr. Helio Hissashi Terada), do chefe adjunto do Departamento de Química (Prof. Dr. Eduardo Rodovanovic); e da chefia do Departamento de Farmácia e Farmacologia, (Profª. Dra. Graciete Matioli), os quais, <u>no entanto</u>, não mencionam especificamente, a sessão dos materiais de consumo arrolados no projeto no valor total de R\$1839,63.</p> <p>Sendo assim, somos de parecer favorável à aprovação do presente projeto com a recomendação de que seja especificada (explicitada) no corpo do projeto a autorização dos departamentos aos quais caberá o custeio (fornecimento) do material de consumo necessário para o desenvolvimento do projeto.</p>	
Situação: APROVADO	
CONEP: (X) para registro () para análise e parecer Data: 11/12/2009	
O pesquisador deverá apresentar Relatório Final para este Comitê em: Fevereiro de 2011	
O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 187ª reunião do COPEP em 11/12/2009.	 H PROFª.DRª. Ieda Harumi Higarashi Presidente do COPEP

Em suas comunicações com esse Comitê cite o número de registro do seu CAAE.
Bloco 10 sala 01 – Avenida Colombo, 5790 – CEP: 87020-900 – Maringá - PR
Fone-Fax: (44) 3261-4444 – e-mail: coep@uem.br

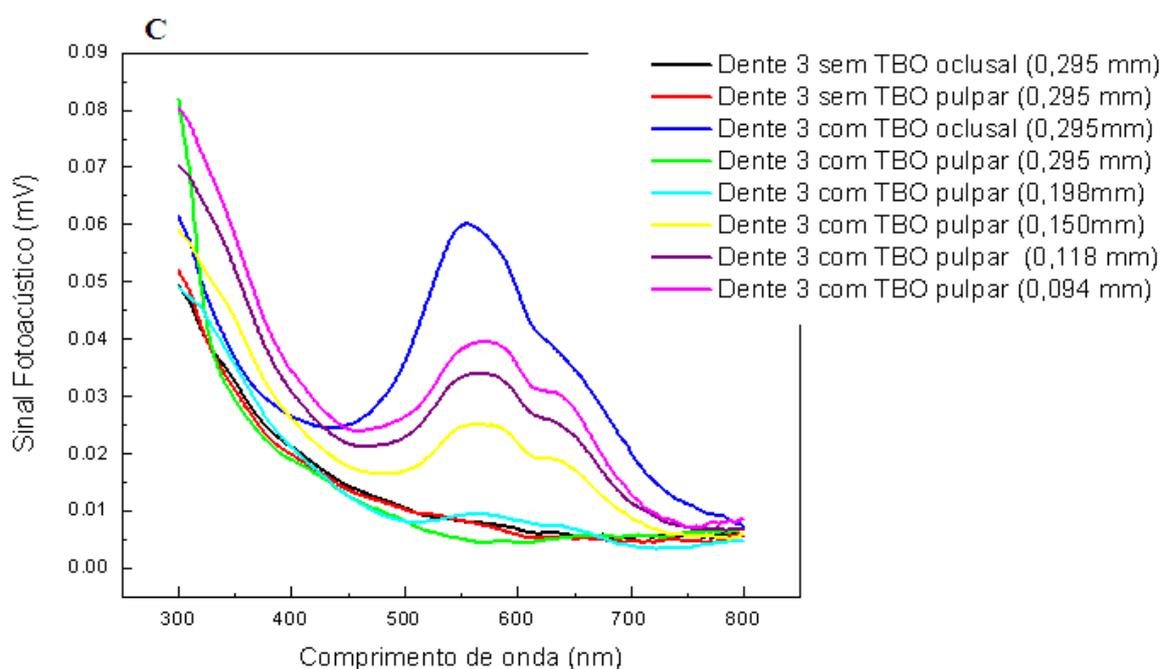
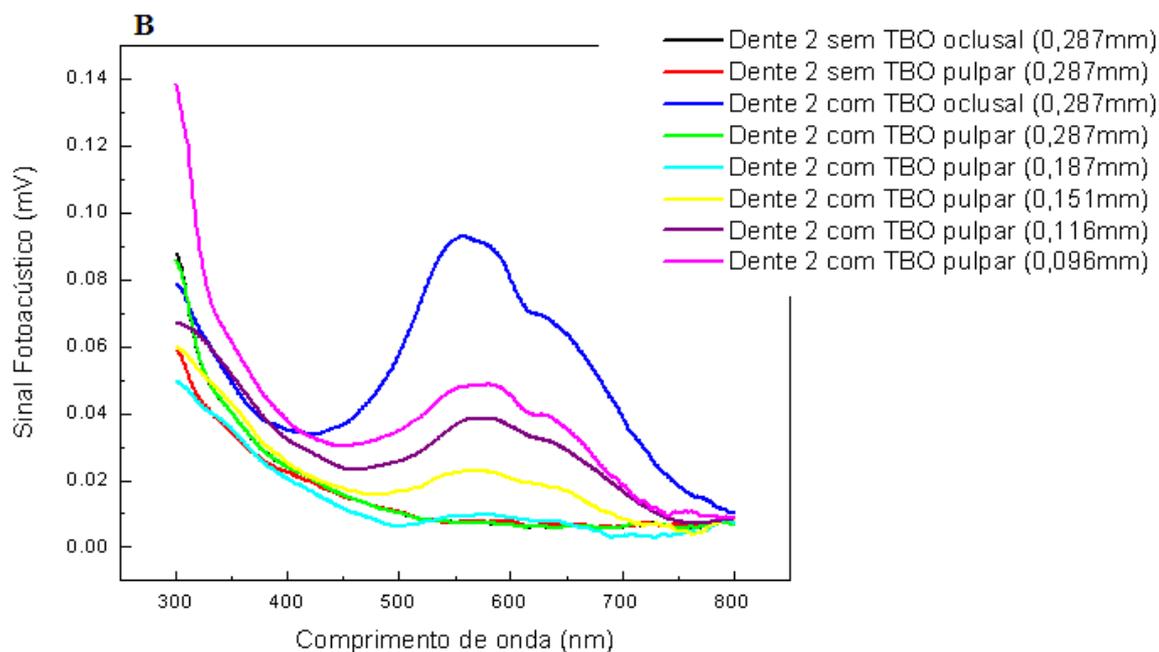
APÊNDICE



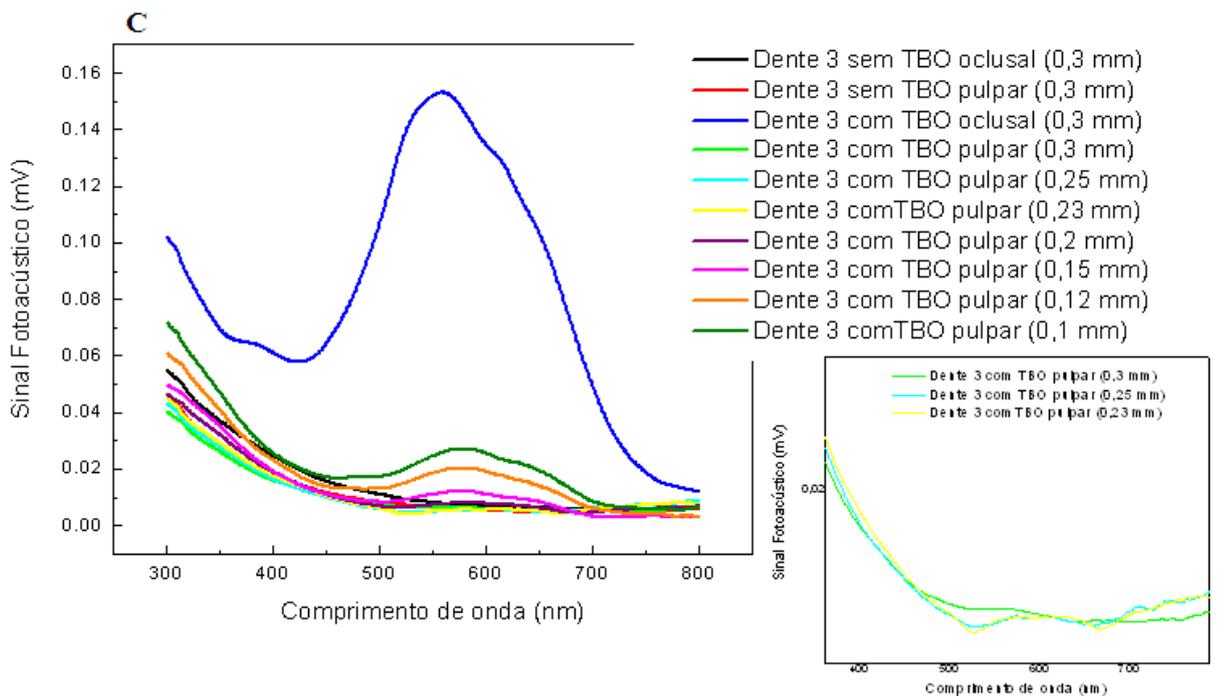
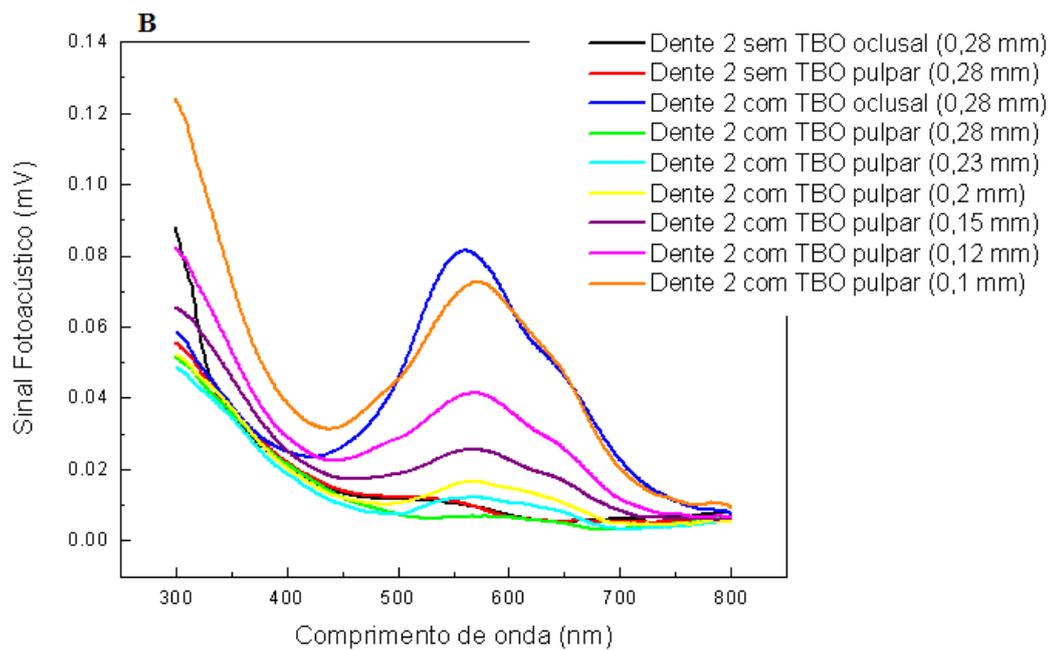
Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura das amostras para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição. (B) amostra 2 com detecção em 0,254 mm e ; (C) amostra 3 com detecção em 0,250 mm.



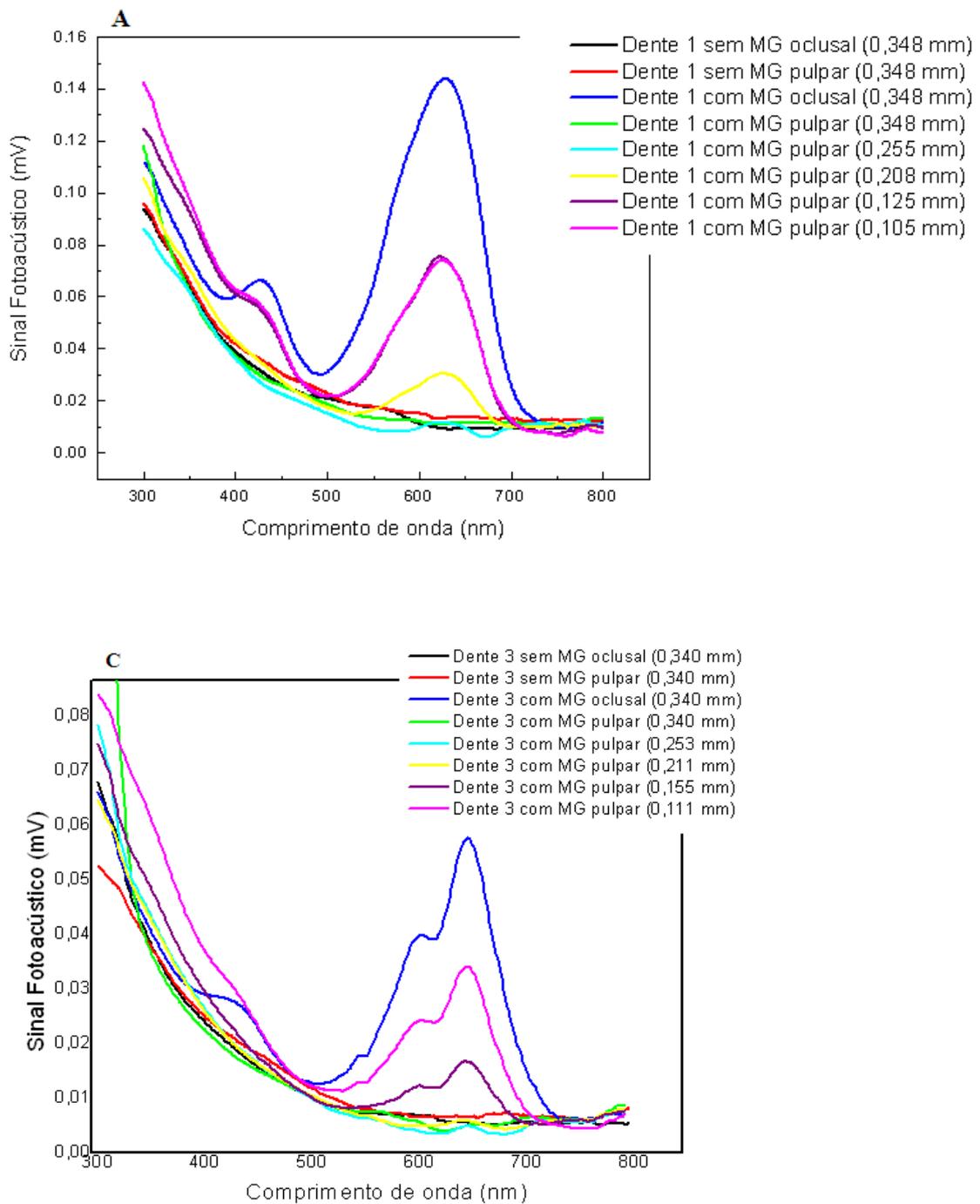
Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura das amostras para verificação da permeação do MB 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição. (A) amostra 1 com detecção do FS em 0,250 mm; (B) amostra 2 com detecção em 0,240 mm.



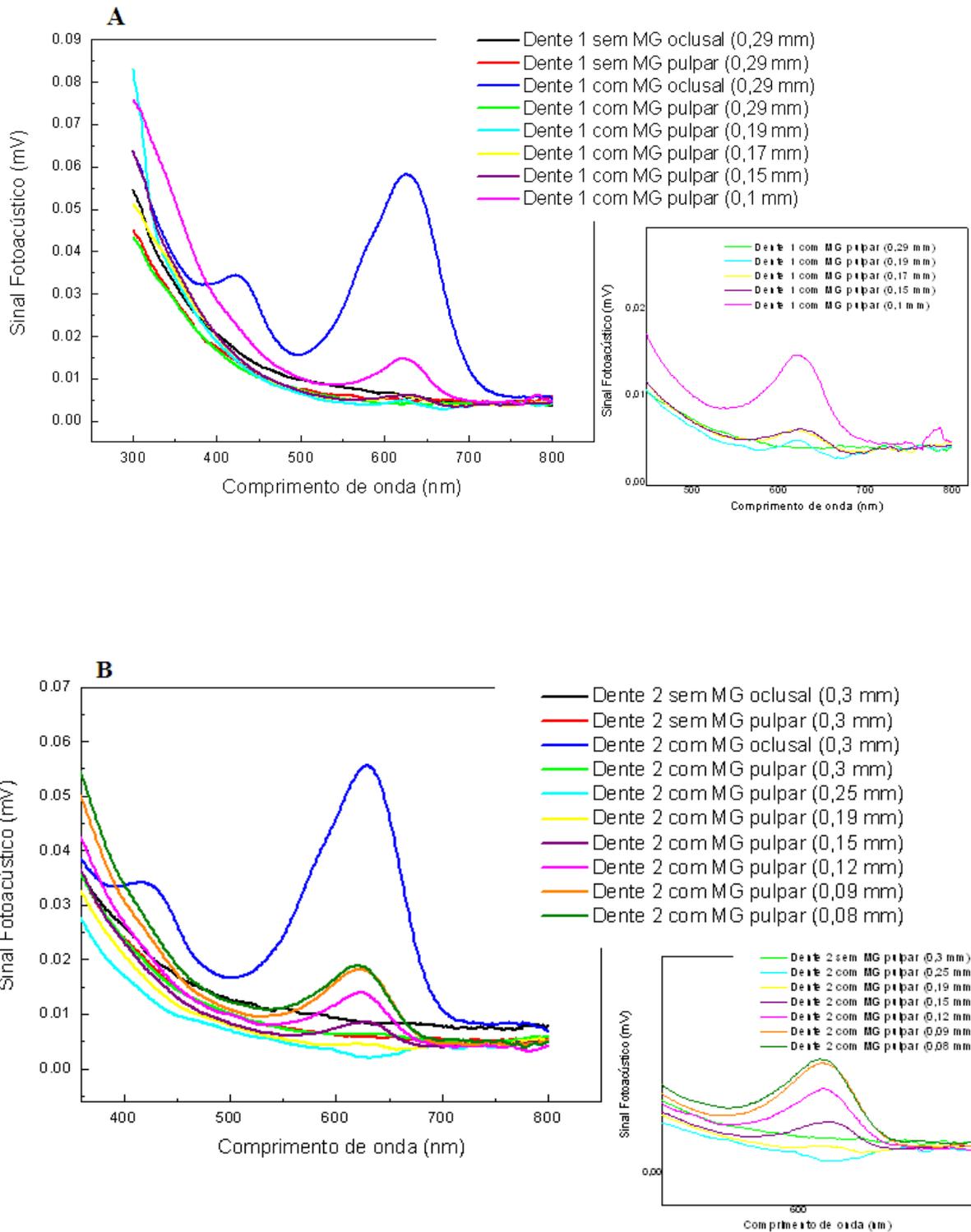
Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura das amostras para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição. (B) amostra 2 com detecção em 0,190 mm e ; (C) amostra 3 com detecção em 0,200 mm.



Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura das amostras para verificação da permeação do TBO 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição. (B) amostra 2 com detecção em 0,230 mm e ; (C) amostra 3 com detecção em 0,230 mm.



Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura das amostras para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 30 minutos de exposição. (A) amostra 1 com detecção do FS em 0,255 mm e ; (C) amostra 3 com detecção em 0,253 mm.



Evolução dos sinais fotoacústicos em função da espessura das amostras para verificação da permeação do MG 0,1 mg/mL no período de 5 minutos de exposição. (A) amostra 1 com detecção do FS em 0,190 mm e ; (B) amostra 3 com detecção em 0,150 mm.