



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ODONTOPEDIATRIA

MARCOS XIMENES PONTE FILHO

**CÁRIE SEVERA NA INFÂNCIA: AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DE
COMUNIDADES BACTERIANAS E PERFIL DE SENSIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS**

Tese de Doutorado

Florianópolis

2013

MARCOS XIMENES PONTE FILHO

**CÁRIE SEVERA NA INFÂNCIA: AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DE
COMUNIDADES BACTERIANAS E PERFIL DE SENSIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS**

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria

**Professor Orientador:
Dr. Ricardo de Sousa Vieira**

**Professora Co-Orientadora:
Dr^a. Mariane Cardoso**

**Professor Co-Orientador Estrangeiro:
Dr. Luiz André Pimenta**

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ximenes Ponte Filho, Marcos
CÁRIE SEVERA NA INFÂNCIA: AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA DE
COMUNIDADES BACTERIANAS E PERFIL DE SENSIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS / Marcos Ximenes Ponte Filho ;
orientador, Ricardo de Sousa Vieira ; co-orientador,
Mariane Cardoso. - Florianópolis, SC, 2013.
181 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Microbiologia. 3. Odontopediatria.
4. Cariologia. 5. DNA. I. de Sousa Vieira, Ricardo . II.
Cardoso, Mariane . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV.
Título.

MARCOS XIMENES PONTE FILHO

**“CÁRIE SEVERA NA INFÂNCIA: AVALIAÇÃO DA
ESTRUTURA DE COMUNIDADES BACTERIANAS E PERFIL
DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS”**

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de
Doutor em Odontologia- Área de Concentração Odontopediatria e
aprovada em sua forma final pelo o Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da UFSC.

Florianópolis, 02 de agosto de 2013.



Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Apresentada perante a banca examinadora, composta pelos professores:



Dr. Ricardo de Sousa Vieira
Orientador (UFSC)



Dr.ª Carolina Castro Martins
Membro (UFMG)



Dr. Antônio J. S. Nogueira
Membro (UFPA)



Dr. Sylvio Monteiro Júnior
Membro (UFSC)



Dr. Rafael Dutra de Armas
Membro (UFSC)

Dedicatória

À Deus,

Aos meus pais **Marcos e Tereza** e às minhas irmãs **Mahiany e Maytê**,
que sempre me compreenderam e me apoiaram, o meu eterno amor,
respeito e admiração.

Obrigado por formarem esta família maravilhosa.

Eu amo muito vocês!

Agradecimentos especiais

À Deus...

Obrigado pela vida, saúde, pela minha família maravilhosa, e pela energia para buscar meus sonhos todos os dias.

*Aos meus amados pais **Marcos e Tereza Ximenes,***

Vocês foram meus primeiros e eternos professores. Muito obrigado por todos os ensinamentos na arte de viver e compreender a vida. Obrigado pelo exemplo de amor, coragem, respeito, dedicação e persistência. Sem vocês nada disso seria possível.

*Às minhas irmãs **Mahiany e Maytê Ximenes,***

Apesar da distância vocês sempre se fizeram presentes dando apoio, carinho e incentivo. Obrigado pelas conversas, pelos momentos de descontração e principalmente pela amizade! Amo vocês!

*Aos meus sobrinhos **Thomas e Noah Luther.** Obrigado por encherem nossa família de alegria, pureza e amor.*

*À minha namorada **Liliam Gervasi,***

Meu amor, obrigado por todo o seu companheirismo e amizade ao longo de todos estes anos. Você sempre se fez presente me ajudando com muito carinho e dedicação. Obrigado pela ajuda na realização deste trabalho, pela paciência e compreensão.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira**, ao meu co-orientador estrangeiro **Prof. Dr. Luiz André Pimenta**, e à minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. Mariane Cardoso**,

Pessoas a quem admiro muito pela inteligência, conhecimento, competência e profissionalismo. Sou grato por todo o tempo cedido na elaboração deste trabalho. Muito obrigado pela disponibilidade, confiança, dedicação, ensinamentos e, principalmente, amizade.

Ao Prof. Dr. Rafael Dutra,

Agradeço toda sua dedicação à execução desta pesquisa. Muito obrigado por todas as orientações, os ensinamentos, a disponibilidade e a convivência. Você é um exemplo de pesquisador e professor. Tenho certeza que além de muito conhecimento, ganhei um grande amigo!

*À minha amiga-irmã **Thaís Triches**, que esteve sempre presente durante estes cinco anos de pós-graduação. Muito obrigado por todos os momentos que juntos passamos. Sua amizade, carinho, companheirismo e cumplicidade fizeram esses momentos muito mais prazerosos e produtivos. Não tenho dúvida que formamos uma dupla de sucesso!*

*À minha “família” em Florianópolis, amigos de longa data que se tornaram irmãos: **Eduardo Altieri, Nelson Oliveira, Thiago Aragão e Armando Lopes Pereira Neto**. Obrigado por compartilharem os momentos importantes da minha vida, pela amizade verdadeira e sincera, e pela torcida na realização dos meus sonhos.*

*Aos meus amigos, amigas e colegas de **Mestrado e Doutorado** que compartilharam dificuldades e superações, anseios e alegrias, pela nova amizade, pelo companheirismo, apoio e pelos bons momentos de convívio.*

*À Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, pela oportunidade*

de aprendizado, aperfeiçoamento e contribuição na minha formação profissional.

*Aos professores do Curso de Graduação e Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, em especial aos da Área de Concentração em Odontopediatria, **Prof. Dr.ª. Izabel Cristina Santos Almeida, Prof. Dr.ª. Joecí de Oliveira, Prof. Dr.ª. Michele Bolan,** e a Psicóloga **Rosamaria Areal Nogueira,** pela disponibilidade, dedicação, atenção e amizade. Pelos ensinamentos e exemplos profissionais. Pelo carinho e pela valiosa contribuição profissional.*

*À amiga de Doutorado, **Ana Paula Silveira Caldeira de Andrada Beltrame,** por todos os momentos agradáveis e divertidos que passamos juntos, por compartilhar desafios, experiências, conquistas, e, principalmente, pelo carinho e amizade.*

*Aos **alunos do Curso de Graduação em Odontologia da UFSC,** pela amizade e por me proporcionarem a experiência da docência.*

*Aos **pacientes e seus responsáveis,** pelo respeito, confiança e por me permitirem a realização pessoal e profissional ao trabalhar com a Odontopediatria.*

*À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, **Ana Maria Vieira Frandolozo,** pela disposição, atenção, pelo auxílio, carinho e pela eficiência com que atende a todas as solicitações.*

*Aos professores do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da UFSC, em especial ao, **Prof. Dr. Admir Giachini** e ao **Prof. Dr. Márcio José Rossi** pela disponibilidade, receptividade, ensinamento e amizade.*

*Aos colegas de pós-graduação do MIP, em especial a **Kelly Justin,** que esteve presente na execução de parte desta pesquisa, oferecendo todo o seu conhecimento técnico e científico.*

*À Universidade da Carolina do Norte (UNC) – Chapel Hill, EUA em especial ao Departamento de Ecologia Dental, na pessoa do **Prof. Dr. Luiz André Pimenta**, pela oportunidade de aprendizado, aperfeiçoamento e contribuição na minha formação profissional.*

*Ao **Prof. Dr. Roland Arnold**, chefe do Departamento de Microbiologia da UNC, pela participação na execução da pesquisa, cedendo o laboratório e toda a estrutura necessária para a realização dos experimentos.*

*Ao técnico em microbiologia do laboratório da UNC, **Eric Simmons**, por todos os ensinamentos, disponibilidade e confiança no trabalho.*

*Ao colega de pós-graduação da UNC, **Dr. Fernando Astorga**, pela a participação na parte laboratorial desta pesquisa.*

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida durante todo o período do doutorado no Brasil e nos Estados Unidos.

“A persistência é o caminho mais curto para o êxito”

(Charles Chaplin)

XIMENES, M. **Cárie severa na infância: avaliação da estrutura de comunidades bacterianas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos.** 2013. 181 P. Tese (Doutorado em Odontologia – Área de Concentração em Odontopediatria) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a estrutura da comunidade bacteriana do biofilme de dentes decíduos em pacientes com cárie severa na infância através da análise de PCR-DGGE e verificar a ação de agentes antimicrobianos sobre bactérias prevalentes nesse tipo de lesão. Foram coletadas amostras de biofilme bacteriano provenientes de dentes hígidos (G1), com lesão de cárie de esmalte (G2) e dentina (G3) de 23 crianças entre 1 – 5 anos de idade. O DNA metagenômico foi extraído pelo o método de CTAB, a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose seguida de eletroforese, e a quantificação e pureza foi determinado espectrofotometricamente. Em seguida, a região V3 do gene rDNA 16S foi amplificada utilizando-se o DNA extraído e os iniciadores universais BA 338fGC e UN518r. A quantidade de amplicons foi analisada por PCR-DGGE utilizando gel de acrilamida:bisacrilamida seguida de eletroforese. A aquisição das imagens foi realizada com fotodocumentador. Foram obtidos 45 amplicons, nos quais foi observado que as estruturas de comunidades bacterianas dos grupos estudados apresentaram diferenças entre os pacientes e entre os grupos de dentes, onde houve um maior numero de amplicons nos

dentados do G2 e G3 quando comparados ao G1 ($p < 0,05$). Para a verificação da ação do gás ozônio e da associação de fluoreto de sódio (NaF) com clorexidina (CHX) contra *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis* foi utilizado a análise de recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em placas com ágar (TSA/SB) após o tratamento, e para os testes da associação do NaF e CHX foram verificadas por meio de análise da densidade ótica em placas de microtitulação de 96 poços. Os dados obtidos do tratamento com ozônio foram submetidos aos testes de Wilcoxon ($p < 0,05$), ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Para os dados de NaF-CHX foram aplicados os testes de ANOVA 2-way e Bonferroni ($p < 0,05$). A contagem de UFC/mL demonstrou morte $> 3\log_{10}$ (99,9%) para todas as bactérias em uma aplicação de ozônio $\geq 20\text{ppm}$ para *S. mutans* e $\geq 200\text{ppm}$ para *L. acidophilus* e *E. faecalis*, enquanto que a associação de NaF-CHX foi mais eficaz ($p < 0,001$) em todas as bactérias testadas quando comparado com as análises das substâncias isoladamente e ao grupo controle. Para este estudo *in vitro* pode-se concluir que a estrutura da comunidade bacteriana é mais complexa em dentes cariados, e o método de PCR-DGGE do gene rDNA 16S foi comprovado por ser uma ferramenta bastante valiosa para diferenciar a composição microbiana do biofilme dental. Todos os agentes antimicrobianos testados foram eficazes no controle do crescimento bacteriano de *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*.

PALAVRAS CHAVE: Biofilme bacteriano, rDNA 16S, PCR-DGGE, Cárie dentária, Clorexidina, Fluoreto, Dente decíduo, Ozônio.

XIMENES, M. **Early childhood caries: assessment of structure of bacterial community and profile of antimicrobial susceptibility**. 2013. 181 p. Thesis (PhD program in Dentistry – Area of Concentration Pediatric Dentistry) – Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the structure of bacterial community from biofilms of deciduous teeth in patients with early childhood caries through the analysis of PCR – DGGE; verify the action of antimicrobial agents on bacteria related. Biofilm samples were collected from intact teeth (G1) , with enamel caries (G2) and dentin caries (G3) of 23 children aged 1-5 years. The metagenomic DNA was extracted by the CTAB method, the quality of the DNA was checked by electrophoresis, while quantification and purity were determined spectrophotometrically. Then, the DNA extracted associated to universal primers (BA 338fGC UN518r) were used to amplify the V3 region of the gene 16S rDNA. The amount of fragments was analyzed by PCR- DGGE using gel Acrylamide : bisacrylamide followed by electrophoresis. A total of forty-five amplicons were obtained, it was observed that the structures of bacterial communities of both groups showed differences between patients and between groups of teeth , where there was a higher number of amplicons in the biofilm of G2 and G3 compared to G1 ($p < 0.05$). The method of analyzing recovery colony forming units (CFU / mL) on agar plates (TSA/SB) was used to test the action of

ozone gas and the association of sodium fluoride (NaF) with chlorhexidine (CHX) against *S. mutans*, *L. acidophilus* and *E. faecalis*. The data obtained from the ozone treatment were subjected to Wilcoxon ($p < 0.05$), ANOVA and Tukey test ($p < 0.05$). For data CHX - NaF -tests were applied to 2 -way ANOVA and Bonferroni ($p < 0.05$). The number of CFU/mL showed death $> 3\log_{10}$ (99.9 %) for all bacteria on an application of ozone ≥ 20 ppm for *S. mutans* and ≥ 200 ppm for *L. acidophilus* and *E. faecalis*, while the combination of CHX - NaF was effective ($p < 0.001$) in all the bacteria tested when compared to analysis of substance alone and the control group. For this *in vitro* study it can be concluded that the bacterial community structure is more complex in decayed teeth, and methods of PCR - DGGE of 16S rDNA gene was proven to be a very valuable tool for differentiating the microbial composition of the biofilm. All antimicrobial agents tested were effective in controlling bacterial growth of *S. mutans*, *L. acidophilus* and *E. faecalis*.

KEYWORDS: Biofilm, Caries, Deciduous, Chlorhexidine, Ozone, PCR-DGGE, Tooth.

LISTA DE FIGURAS

Apêndice A: Metodologia expandida

Figura 1 - Procedimentos de coleta do biofilme bacteriano	
A- Desinfecção com digluconato de clorexidina 1 %.....	131
B- Isolamento relativo com rolo de algodão estéril.	131
C- Coleta do biofilme bacteriano.....	131
D- Colocação do microaplicador em água Milli-Q.....	131
Figura 2 - Agitação no Vortex para melhor aquisição do material biológico coletado.	132
Figura 3 - Fricção dos microaplicadores no tubo de 1,5 mL.....	132
Figura 4 - Pélete no fundo do tubo de 1,5 mL.....	133
Figura 5 - Amostras incubadas a 65°C.....	134
Figura 6 - Tubos abertos para evaporação completa do álcool após a extração do DNA.	134
Figura 7 - Verificação da extração do DNA por eletroforese.	
A- Aplicação do produto da extração no gel de Agarose.	135
B- Equipamento de eletroforese à 60 V.....	135
C- Resultado da eletroforese.....	135
Figura 8 - Bactéria cultivada <i>overnight</i> em placa de Ágar.	136
Figura 9 - Gerador de ozônio HealOzone X4® e esquema de funcionamento.	137
Figura 10 - Gerador de ozônio OL80A.	138
Figura 11 - Gerador de ozônio OL80W.....	139
Figura 12 - Esquema de inoculação de bactérias na placa de 96 poços.	139

Figura 13 - Placa de Ágar inoculada com titulação das três bactérias testadas.	140
Figura 14 - Materiais utilizados.....	140
A- Clorexidina 0,12 %.	
B- Fluoreto de sódio 5%.	
Figura 15- Placa de 96 poços utilizada para a verificação da concentração inibitória mínima.....	141
Figura 16- Leitor de microplacas Vmax kineti/ SoftMaz Pro 3.1..	141

ARTIGO 1. (Avaliação da estrutura da comunidade bacteriana em diferentes estágios de desenvolvimento da cárie severa na infância)

Figura 1 – Gel do PCR-DGGE com os perfis de amplicons de amostras de biofilme bacteriano dos diferentes grupos de dentes estudados (H – Hígido; E – Esmalte; D – Dentina).....	72
Figura 2 – Análise de agrupamento hierárquico por estágio de desenvolvimento da cárie no biofilme bacteriano coletado.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 (artigo 1)- Número de amplicons (bandas) PCR-DGGE de amostras do biofilme bacteriano dos diferentes grupos de dentes estudados (H – hígido; E – esmalte; D – dentina).....	74
Gráfico 2 (artigo 1)- Análise de MDS para comparação entre a estrutura da comunidade bacteriana de amostras do biofilme bacteriano.....	75
Gráfico 1 (artigo 2)- Contagem de <i>S. mutans</i> (UFC/mL) dos grupos experimentais e controle após a aplicação de gás ozônio das variadas concentrações (ppm).	98
Gráfico 2 (artigo 2)- Contagem de <i>L. acidophilus</i> (UFC/mL) dos grupos experimentais e controle após a aplicação de gás ozônio das variadas concentrações (ppm).	98
Gráfico 3 (artigo 2)- Contagem de <i>E. faecalis</i> (UFC/mL) dos grupos experimentais e controle após a aplicação de gás ozônio das variadas concentrações (ppm).	99
Gráfico 4 (artigo 2)- Densidade ótica segundo o antimicrobiano utilizado e o tipo de bactéria.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1) – Resultado do teste de similaridade por <i>Pairwise</i> (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do rDNA 16S de Bactéria de amostras de biofilme bacteriano.....	76
Tabela 1 (Artigo 2) – Média e desvio padrão da densidade ótica (mO.D.) atingido após o tratamento com diferentes protocolos de gás ozônio em <i>S. mutans</i>	97
Tabela 2 (Artigo 2) – Efeito global dos antimicrobianos na densidade ótica dos grupos experimentais e controle.	99

SUMÁRIO

1 Introdução geral e contextualização	29
2 Justificativa	49
3 Hipótese	53
4 Artigo 1	57
5 Artigo 2	82
6 Conclusão geral	113
7 Apêndices	117
7.1 Lista de Figuras	131
8. Referências	144
9 Anexos	157
9.1 Anexo A – Parecer do comitê de ética em pesquisa UFSC	159
9.2 Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido	160
9.3 Anexo C – Ficha de coleta de dados dos pacientes	162
9.4 Anexo D–Normas para publicação periódico <i>Caries Research</i>	163
9.5 Anexo E – Produção científica durante Mestrado/Doutorado	171



1. Introdução geral e contextualização

1. INTRODUÇÃO GERAL E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Cárie Severa na Infância

A Academia Americana de Odontopediatria (AAPD) considera a Cárie Severa na Infância (CSI) ou *Early Childhood Caries* (E.C.C. – Língua Inglesa) como a presença de um ou mais dentes decíduos cariados (lesões cavitadas ou não), perdidos (devido à cárie) ou restaurados antes dos 71 meses de idade (AAPD, 2009). Também é considerada CSI se a criança apresentar mais de quatro, cinco ou seis superfícies afetadas em dentes decíduos anteriores aos 3, 4 e 5 anos, respectivamente (Losso et al. 2009). No Brasil, a CSI substituiu o termo anteriormente conhecido como “cárie de mamadeira”.

Apesar do declínio dramático na prevalência de cárie dentária em crianças de países do mundo ocidental, a cárie em crianças pré-escolares continua sendo um problema importante, pois afeta porcentagens significativas desta população, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento (Oliveira et al. 2008). A prevalência de CSI varia em diferentes países, o que pode depender de critérios de diagnóstico e da metodologia empregada para a identificação.

Estudos demonstram que a prevalência da CSI é maior em crianças provenientes de famílias com menor renda econômica, independentemente de raça, etnia ou cultura (Livny et al. 2007). Na

Inglaterra, a prevalência relatada varia de 6,8 – 12,0 %, nos EUA é maior, e fica na faixa de 11,0 - 53,1 % (Tyagi 2008). Na Ásia, na região do extremo oriente que parece ter uma maior prevalência e gravidade da doença, a prevalência em crianças com três anos de idade está na faixa de 36,0 – 85,0 % (Drury et al. 1999), enquanto que na Índia uma prevalência de 44 % tem sido relatada para a cárie em crianças de 8 a 48 meses de idade (Jose & King 2003). Estudos realizados no Brasil afirmam que a prevalência de CSI varia de 12,0 – 46,0 %, sendo que está mais prevalente na faixa etária de 1 a 3 anos de idade (Bönecker et al. 2002).

A cárie severa na infância não é fatal, mas pode contribuir para a saúde de qualidade inferior e déficit de crescimento (Oliveira et al. 2008). A gravidade da CSI pode levar a dores na dentição, assim, comprometendo o dia-a-dia das crianças e dos seus pais/cuidadores. Pesquisas têm mostrado que as sequelas mais comuns encontradas pelas crianças como resultado de má saúde bucal são a incapacidade de mastigar, dificuldade em ingerir bebidas quentes ou frias, dor, interferência no desempenho escolar, pouca socialização, irritação e a baixa autoestima (Oliveira et al. 2008; Abanto et al. 2011).

A CSI é uma forma de cárie dentária particularmente virulenta devido à presença de várias características únicas presentes na boca das crianças. Fatores como a microbiota bacteriana recém-formada, a imaturidade do sistema de defesa do hospedeiro, a baixa resistência da superfície do dente recém erupcionado, bem como a presença de substrato alimentar, podem

ser responsáveis por acelerar o processo biológico de desenvolvimento de cárie em dentes decíduos (Vadiakas 2008).

1.2. Microbiologia da cárie dental

Antonie van Leeuwenhoek, no século XVI, foi o primeiro pesquisador a observar ao microscópio a presença de bactérias no biofilme dental ao microscópio, sugerindo o possível envolvimento desses microrganismos com a doença cárie. Miller, em 1890, propôs que todas as bactérias presentes na cavidade bucal poderiam levar a doença a partir da formação de ácidos pela fermentação de carboidratos provenientes da dieta (Balakrishnan et al. 2000). A partir de então, outros pesquisadores sugeriram uma associação entre microrganismos e a presença da doença baseado no potencial de síntese de ácidos orgânicos, sendo que o primeiro relato de *Streptococcus* como agente etiológico só foi feito por Clark em 1924 (Clark 1924). O pesquisador isolou esse gênero bacteriano de lesões de cárie de pacientes e, percebendo suas características distintas, *Streptococcus mutans*.

Sabendo, desde as descobertas de Miller (1890), que a destruição dos tecidos dentários era causada pela ação dos ácidos produzidos pelas bactérias, diversos autores iniciaram estudos sobre a relação existente entre o pH do biofilme bacteriano e o desenvolvimento da doença cárie. Stralfors, 1948, realizou um estudo no qual comparou o potencial ácido do biofilme dental de pacientes com alta atividade de cárie, assim como aqueles com

atividade moderada e também os livres da doença. O autor demonstrou haver uma clara correlação entre o pH mínimo obtido para cada paciente e a contagem de *Lactobacillus spp.*, isto é, indivíduos cuja saliva apresentava maiores valores de pH possuíam também menos *Lactobacillus spp.* na saliva e menor atividade de cárie.

As evidências diretas do envolvimento de microrganismos específicos no desenvolvimento da doença cárie vieram com os estudos de Keyes (Keyes 1960) em hamsters infectados. O autor observou que um determinado grupo de animais só desenvolvia a doença quando convivia com outro grupo de animais “cárie-ativos” e que esse mesmo grupo poderia torna-se “cárie-inativo” quando tratado com antibióticos como a penicilina ou a eritromicina. O estudo permitiu concluir que os hamsters, mesmo possuindo complexa população bacteriana na cavidade bucal, não desenvolviam a doença se não estivessem contaminados com bactérias cariogênicas. Desta forma, passavam a desenvolvê-la quando entravam em contato com hamsters “cárie-ativos”.

A cárie dentária é causada por uma interação entre bactérias acidogênicas, um substrato, e a susceptibilidade do hospedeiro (van Houte 1994), além dos fatores sociais, culturais e ambientais (Watt 2005). *Streptococcus mutans* acidogênicos são conhecidos como ácido tolerante e também como o principal agente patogênico da CSI (Tanzer et al. 2001; Beighton 2005). Consideráveis evidências epidemiológicas apontam *S. mutans* à cárie, e inúmeras investigações laboratoriais demonstraram a capacidade de cepas

desta espécie em produzir o ácido láctico que provoca as lesões de cárie dentária (van Houte 1994). Várias espécies de *Lactobacillus spp.* também foram consistentemente associadas com cárie dental e são considerados importantes patógenos secundários da doença (Aas et al. 2008; Reyes & Dalmacio 2012). Outras bactérias têm sido investigadas como potenciais contribuintes para cárie, e vários pesquisadores têm sugerido que a diversidade bacteriana da cárie pode envolver comunidades bacterianas mais complexas do que se pensava anteriormente (Bradshaw & Marsh 1998; Aas et al. 2005).

A etiologia das doenças dentárias microbiana tem sido estudada extensivamente, contudo, a complexa composição dos biofilmes orais torna difícil identificar os microrganismos causadores. As primeiras teorias com foco na identificação de um único agente causador de doenças bucais, como no caso da cárie, atribuíram como principais agentes etiológicos bactérias como os *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus spp.* e *Actinomyces spp.* (van Houte 1994). Entretanto, já é aceito que as doenças bucais são na realidade resultado da ação de comunidades microbianas multiespécies (Do et al. 2013). Os métodos de cultivo bacteriano têm sido utilizados tradicionalmente para caracterizar a microbiota bucal, no entanto, grande parte dos microrganismos são não cultiváveis, levando a uma incompleta compreensão das comunidades microbianas (Hiyari & Bennett 2011). Alternativamente, o uso de ferramentas moleculares permite a avaliação, pois independe do cultivo para a caracterização dos

microrganismos da microbiota humana em geral, especialmente da cavidade bucal (Dewhirst et al. 2010).

1.3. Emprego de técnicas de biologia molecular

A detecção e identificação de microrganismos do biofilme são um passo importante para o entendimento da prevenção, desenvolvimento e tratamento da cárie dentária. Vários métodos têm sido propostos para identificar e diferenciar microrganismos orais: exames bioquímicos (Whiley & Beighton 1998), imunológicos (Conrads 2002), métodos microbiológicos (Sánchez-Pérez & Acosta-Gío 2001), assim como métodos moleculares (Yano et al. 2002; Sato et al. 2003; Hoshino et al. 2004). Dentre os métodos moleculares, destaca-se a reação da cadeia da polimerase (PCR) por ser uma técnica de rápida execução, sensível e mais específica, quando comparada com outros métodos microbiológicos (Igarashi et al. 1996).

Com o advento das técnicas de PCR (Saiki et al. 1988) e sequenciamento de DNA (Sanger et al. 1977), os métodos moleculares, especialmente aqueles baseados no estudo da sequência do rDNA 16S, têm sido muito úteis na descoberta de novos microrganismos. Estas técnicas baseiam-se na amplificação do rDNA 16S por PCR e posterior caracterização por clonagem e sequenciamento.

O estudo das sequências do gene rDNA 16S tornou-se padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da

diversidade em amostras ambientais, e ainda, na detecção e quantificação de populações específicas (Head et al. 1998; Kirk et al. 2004). A escolha da sequência de nucleotídeos do gene rDNA 16S decorre do fato de mesma agrupar um conjunto de características necessárias a um bom marcador molecular, a qual inclui a sua distribuição universal, estrutura e função conservada entre os táxons, ausência de transferência lateral e tamanho apropriado (~1500 nucleotídeos) para estudos de filogenia (Amann & Ludwig 2000). Sua estrutura primária possui uma alternância entre regiões mais ou menos conservadas, permitindo a investigação de um amplo espectro de distâncias filogenéticas, desde o nível de domínio até espécie (Ludwig & Schleifer 1994).

Dentro das técnicas moleculares, as de *fingerprinting* são utilizadas a fim de se obter uma ampla caracterização da estrutura da comunidade microbiana. Em estudos de ecologia microbiana essas técnicas vêm sendo muito utilizadas, devido à rapidez na obtenção de resultados que permitem avaliar muitas amostras de um ou mais ambientes simultaneamente (Malik et al. 2008).

Uma das técnicas de *fingerprinting* é a de DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), que consiste na amplificação de fragmentos do gene rDNA 16S a partir do DNA metagenômico e separação dos amplicons, baseado no conteúdo de GC, por eletroforese em gel com gradiente desnaturante, gerando um perfil de bandas que representa a estrutura da comunidade microbiana (Agnelli et al. 2004).

Como as sequências tem um comportamento de fusão diferente entre si, logo, acabam em diferentes posições no gel. Após a visualização do DNA no gel, é possível tirar conclusões sobre as diferenças na presença / ausência de bandas em amostras e as diferenças na complexidade das amostras. Como esta técnica é relativamente barata, de fácil execução e de confiança, ela é adequada para a pesquisa com cáries. Infelizmente, não é uma técnica quantitativa e em amostras complexas, não é possível relacionar as bandas específicas para uma determinada espécie, sendo também difícil comparar os diferentes géis, certamente quando se lida com amostras contendo muitas espécies. No entanto, é uma excelente técnica para a análise (inicial) de diversidade microbiana e complexidade microbiana na saliva ou amostras de biofilme bacteriano (Li et al. 2007; Jiang et al. 2011).

A abordagem aberta (ou seja, sem a seleção de espécies específicas) que tem sido mais utilizada para as comunidades microbianas bucais, é a biblioteca de clones do gene rDNA 16S. Nesta abordagem, o gene de rDNA 16S de bactérias presentes em determinado ambiente são amplificadas por PCR utilizando iniciadores universais. O gene de rDNA 16S é subsequentemente clonado em *Escherichia coli*, e em seguida, os clones são sequenciados (Paster et al. 2006). Atualmente, usando esta técnica, várias espécies bacterianas predominantes foram estimadas na cavidade oral (Dewhirst et al. 2010).

1.4. Tratamento da Cárie Severa na Infância

De acordo com literatura pesquisada, a cárie dentária é uma doença multifatorial com complexos processos biológicos incluindo uma vasta diversidade de microrganismos. A cariologia teve seu enfoque modificado ao longo dos anos, abandonando as antigas práticas curativo-restauradoras para adotar uma postura mais conservadora e preventiva, através de abordagens menos invasivas, que visam à preservação dos tecidos sadios, possibilitando a revitalização de estruturas dentárias acometidas pelo processo cariioso (Baysan et al. 2001).

A terapia restauradora em dentes decíduos expostos a CSI é essencial, mas nem sempre possível. Muitas crianças tem dificuldade de comportamento e colaboração diante ao tratamento. Aproximadamente 35 % das crianças com 5 anos de idade e 21 % com 12 anos de idade têm medo de ir ao dentista, sendo esta porcentagem maior quanto menor for a idade (Chadwick & Hosey 2007). A remoção parcial do tecido cariado, baseado na filosofia da mínima intervenção pode ser o tratamento de escolha em alguns casos, mas infelizmente, em algumas crianças, as lesões de cárie progridem a um ponto que o tratamento sob anestesia geral é necessário (Tinanoff & O'Sullivan 1997). Outro fator limitante é o tamanho e formato da lesão de CSI que, muitas vezes não permitem a adaptação de um material restaurador adequado. Logo, qualquer procedimento restaurador irá exigir um tempo maior de atendimento (Orhan et al. 2008). Há, portanto, a necessidade de

encontrar uma forma de tratamento imediato que seja capaz de inibir ou paralisar a lesão de cárie até que esses pacientes apresentem um comportamento adequado e a cooperação seja conquistada. Dentre os materiais disponíveis para essa finalidade tem-se o flúor, a clorexidina e mais recentemente relatado o gás ozônio.

1.4.1 Flúor

A utilização do flúor, em suas diversas formas, é um dos principais responsáveis pela queda da prevalência da cárie em nível mundial e também pela diminuição de sua severidade e progressão (Cury et al. 2004). A eficácia na prevenção de lesões de cárie tem sido comprovada (ten Cate 1997; Marinho et al. 2003; Cury et al. 2004).

A capacidade do flúor para prevenir e deter a cárie tem sido pesquisada extensivamente. Os três principais mecanismos de ação são: alteração do metabolismo bacteriano; a inibição da desmineralização; e a participação na remineralização (Featherstone 2006).

O mecanismo pelo qual a presença do flúor confere maior resistência ao esmalte dentário ocorre ao longo de toda a vida, mediante sucessivos episódios de desmineralização e remineralização superficial, desencadeados pela queda de pH decorrentes da produção de ácidos a partir de carboidratos. A presença contínua, ao longo de toda a vida do indivíduo, de

pequenas quantidades de íon flúor no meio bucal é, portanto, indispensável para que o efeito preventivo se manifeste, com a formação de fluoreto de cálcio (CaF_2) na etapa de remineralização. Admite-se que essa nova superfície, contendo flúor, é menos solúvel em ácidos que a superfície de esmalte original. Portanto, CaF_2 , formado a partir das aplicações tópicas de flúor, age como um reservatório de fluoretos na cavidade oral, aumentando a remineralização e retardando o processo de desmineralização (Featherstone 1999).

Algumas pesquisas têm estudado os possíveis efeitos do flúor em bactérias relacionadas à cárie dentária. A descoberta mais significativa é que a forma ionizada de flúor, ou fluoreto (F^-), não pode atravessar a parede da célula nem tampouco a membrana, mas pode se deslocar rapidamente para dentro das células de bactérias cariogênicas na forma inalterada como ácido fluorídrico (HF) (Van Loveren 1990; Featherstone 2000). Isso acontece porque quando o pH da placa diminui à medida que as bactérias produzem ácidos, uma parte do fluoreto presente no fluido da placa, combina-se com os íons de hidrogênio e formam HF que é capaz de difundir-se rapidamente para dentro da célula (Van Loveren 1990; Featherstone 1999; Featherstone 2000; Featherstone 2006). Uma vez dentro da célula, o HF dissocia-se, acidificando o interior da célula e liberando F^- que interferem com a atividade enzimática da bactéria. O fluoreto é capaz de inibir a enolase e ATPase, enzimas necessárias para metabolização dos carboidratos

e para a produção de energia intracelular, respectivamente (Featherstone 2000).

Publicações recentes têm destacado a necessidade de maior concentração de flúor na terapia para indivíduos de alto risco de cárie. Nordström & Birkhed 2010, demonstraram um efeito preventivo superior utilizando dentifrício de 5.000 ppm em comparação com um dentifrício 1.450 ppm de F⁻ em um ensaio clínico de dois anos com adolescentes. Ensaio clínico tem demonstrado a eficácia do verniz de fluoreto de alta concentração em indivíduos de alto risco de cárie, embora ainda haja algum debate sobre se este veículo é melhor para a prevenção ou para reparação de lesões não cavitadas (Du et al. 2012). Mesmo havendo estes sistemas de fluoreto de concentração mais elevados, há um longo caminho a ser estudado antes que os níveis de cárie sejam reduzidos drasticamente. A melhoria dos métodos de remineralização bem como melhores formas de utilização dos fluoretos tem sido relatadas como os pontos principais para o progresso do tratamento e prevenção da cárie dentária (Featherstone & Doméjean 2012).

1.4.2 Clorexidina

A clorexidina (CHX) tem sido estudada há mais de 30 anos como um agente antimicrobiano para o controle químico de formação de biofilme bacteriano e para a prevenção de cáries. Trata-se de uma base forte que atua bacteriostaticamente quando

administrada em baixas concentrações, e em concentrações mais elevadas, a mesma tem ação bactericida. O seu espectro antibacteriano abrange as bactérias gram-positivas e gram-negativas (menor extensão), fungos e leveduras. Em geral, a eficácia de CHX está relacionada com a sua concentração e a frequência de aplicação (Baca et al. 2002).

A base da sua eficácia clínica e seu mecanismo de ação sobre microrganismos é explicada pela ligação dicatiônica à carga negativa da parede bacteriana, desestabilizando o equilíbrio osmótico, provocando uma precipitação ou coagulação do conteúdo citoplasmático que lisa a célula (Jones 1997). As vantagens da utilização da clorexidina são: o amplo espectro antibacteriano e a substantividade que é a sua capacidade de se ligar aos grupos carboxila da mucina que cobre a mucosa bucal e ser constantemente liberada nessas áreas, de forma ativa. As desvantagens do uso da CHX são: o uso prolongado causar sabor desagradável alterando o paladar e em alguns casos levar ao manchamento dos dentes, quando utilizado na forma de bochechos (Greenstein et al. 1986; Fardal & Turnbull 1986; Puig Silla et al. 2008).

A clorexidina tem sido amplamente utilizada em odontologia, em diferentes concentrações e diferentes veículos: como verniz de clorexidina em concentrações de 1 %, 10 %, 20 %, 25 %, 33 % e 40 %, como o gel de concentração de 1 % (Emilson et al. 1999), e em colutórios, para uso diário, em concentrações de 0,12 % e 0,2 % (Hildebrandt & Sparks 2000).

A redução significativa dos níveis de bactérias na cavidade bucal por períodos mais longos podem reduzir drasticamente a incidência de cáries dentárias (Splieth et al. 2000). Esta redução pode ser observada nas superfícies proximais, oclusal (fossetas e fissuras) e bucal com dados estatisticamente significativos quando comparados com outros agentes químicos (Joharji & Adenubi 2001). A inibição de *S. mutans* depende da forma como a clorexidina é utilizada, o veículo utilizado e tipo de material a ser analisado (Madléna et al. 2000). Quando a administração desse agente for interrompida, os níveis bacterianos são restaurados, exigindo terapia adicional para mantê-los em nível baixo (Emilson et al. 1999). A grande variedade de veículos e as concentrações encontradas de clorexidina dá ao profissional uma grande flexibilidade na escolha do produto mais apropriado e conveniente para uso clínico ou de investigação.

Nos Estados Unidos, a clorexidina é comercializada como uma mistura 1:1 de verniz de clorexidina e 0,12 % de uma solução gluconato de clorexidina para bochecho. O FDA (*Food and Drug Administration*) não aprovou qualquer um destes fármacos para a prevenção de cáries. Na Europa, assim como no Brasil, vernizes de clorexidina de 10-40 % são comercializados com objetivo de prevenir e tratar a cárie dental (Rethman et al. 2011).

1.4.3 O uso do Ozônio na Odontologia

O ozônio (O_3) é uma molécula tri atômica, que consiste em três átomos de oxigênio, com um peso molecular de $47,98 \text{ g mol}^{-1}$. Trata-se de um composto termodinamicamente instável que, dependendo das condições do sistema, tais como a temperatura e a pressão, decompõe-se para oxigênio puro, com meia-vida curta (Lynch 2008). Ele está presente na atmosfera, onde é capaz de absorver luz ultravioleta solar, o que o torna um ‘escudo’ natural da Terra (camada de ozônio) para os seres humanos e a outras formas de vida, para o qual esses raios são nocivos. Por outro lado, o ozônio na troposfera é considerado tóxico para as vias pulmonares, trato nasorespiratório e olhos, o gás é produzido em uma complicada série de reações químicas envolvendo Óxido Nítrico (NO_2), a luz solar (especialmente nos meses quentes de verão), e o oxigênio (O_2) (Solomon 1999).

O ozônio, em fase aquosa ou gasosa, mostrou ser um potente agente antimicrobiano contra bactérias, fungos, protozoários e vírus (Seidler et al. 2008). O efeito é geralmente atribuído ao forte potencial oxidante do ozônio que é capaz de iniciar a destruição das paredes celulares e membranas citoplasmáticas de bactérias e fungos (Baysan et al. 2001; Nagayoshi et al. 2004). Durante este processo, o ozônio reage com glicoproteínas, glicolípidos, e alguns aminoácidos, resultando na inibição dos sistemas de controle enzimático celular. Esta inibição resulta em um colapso da função da barreira de permeabilidade da membrana, permitindo a difusão

imediate do ozônio e de outras moléculas tóxicas para dentro da célula, levando a morte celular (Nagayoshi et al. 2004). O ozônio pode oxidar diversas biomoléculas, especialmente a cisteína, metionina, os quais são aminoácidos constituintes de proteínas. Através desse mecanismo, ele é capaz de oxidar biomoléculas associadas a microrganismos associados a etiologia da cárie dentária (Nagayoshi, Fukuizumi, et al. 2004).

Os primeiros relatos do uso clínico do ozônio datam da I Guerra Mundial, onde úlceras gangrenosas foram tratadas através da insuflagem direta do gás sobre os tecidos (Bocci 2004). Contudo o grande marco na ozônioterapia na Odontologia se deu através do cirurgião dentista Dr. E. A. Fisch que foi o primeiro a utilizar água ozonizada em sua prática clínica, e apresentou ao, também dentista, Dr. E. Payr, que em 1935 publicou o primeiro tratado sobre as aplicações do ozônio, intitulado “O Tratamento com ozônio na Cirurgia”, neste trabalho a água ozonizada foi usada para promover hemostasia, aumentar a oferta de oxigênio local, e inibir a proliferação bacteriana (Baysan et al. 2001). Teoricamente, o ozônio pode reduzir a contagem bacteriana em lesões de cárie ativa e, portanto, pode temporariamente deter a progressão da cárie, resultando na prevenção ou retardar a necessidade de restaurações dentárias (Rickard et al. 2004).

O ozônio é mais frequentemente utilizado em odontologia restauradora e endodontia. A administração tópica na forma gasosa pode ser através de um sistema aberto ou através de um sistema de sucção de vedação como pré-requisito para evitar a inalação e

efeitos adversos. Tem sido sugerida a aplicação de ozônio em lesões de cárie cavitadas e não cavitadas (Azarpazhooh & Limeback 2008). Pela oxidação de biomoléculas presentes em doenças bucais, o ozônio tem um efeito extremamente perturbador sobre as bactérias cariogênicas, resultando na eliminação de bactérias acidogênicas (Azarpazhooh & Limeback 2008). O ácido mais forte e comumente produzido por bactérias cariogênicas é o ácido pirúvico, o ozônio tem a capacidade descarboxilar esse ácido em ácido acético. A literatura mostra que a remineralização de lesões de cárie incipientes podem ser estimuladas quando há a presença de ácido acético, ou outros ácidos com pKa elevado (Margolis et al. 1985).

Diversos estudos têm buscado comprovar a eficácia do gás ozônio no controle da progressão da cárie, bem como encontrar um protocolo para a utilização da substância. Polydorou et al., 2006, realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de comparar o efeito do gás ozônio com dois sistemas adesivos no controle da proliferação de *S. mutans*. Os autores encontraram que a aplicação do ozônio por 80 segundos e os dois sistemas adesivos tiveram desempenho semelhante no controle da proliferação de *S. mutans*.

A capacidade do gás ozônio em matar *S. mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii* (principais bactérias acidogênicas presentes na placa dental) foi comprovada com um estudo *in vitro*. Neste estudo, as bactérias produzidas em laboratório foram misturadas com saliva natural coletadas de pacientes adultos. O gás demonstrou uma limitação em matar os

microrganismos na presença da saliva, mas esta limitação foi suprimida quando o tempo de 60 segundos foi atingido (Johansson et al. 2009).

Em contraste, algumas publicações relatam resultados negativos, tanto em ensaios realizados *in vitro* (Rickard et al. 2004; Azarpazhooh & Limeback 2008; Polydorou et al. 2012), e em testes clínicos (Yip et al. 2007). Duas revisões sistemáticas (Marthaler et al. 1996; Nagayoshi, et al. 2004), concordam em afirmar que dado o alto risco de viés nos estudos disponíveis e falta de coerência entre resultado, não há evidência de que a aplicação de gás de ozônio na superfície dos dentes cariados paralisa e/ou reverte o processo da cárie dentária.

Portanto, existe a necessidade básica de mais evidências científicas através de ensaios com maior rigor e qualidade antes de o uso de ozônio ser aceito para integrar tratamento odontológico básico ou ser considerado um método alternativo viável no tratamento da cárie dentária.



2 Justificativa

Devido a grande prevalência de cárie severa na infância na população mundial, e a dificuldade que há na colaboração de muitos pacientes frente ao tratamento restaurador imediato, existe a necessidade de encontrar uma opção de tratamento que seja eficaz no controle da progressão da lesão cáriosa nos dentes decíduos afetados. A utilização de fluoreto e da clorexidina já é comprovada na literatura, mas a utilização das duas substâncias em conjunto ainda é controversa. O gás ozônio já é utilizado em alguns países no controle da progressão da cárie em dentes permanentes, mas não há relatos relacionados à cárie em dentes decíduos. Para uma análise fidedigna dessas opções de tratamento, faz-se necessário a compreensão da complexa microbiota envolvida nesse processo. Portanto, este trabalho fica justificado na tentativa de identificar, através de técnicas de biologia molecular, as principais bactérias envolvidas no processo de cárie, e avaliar *in vitro* a ação dos agentes microbiológicos supracitados.



3 Hipótese

Os três grupos de dentes (hígido, cárie de esmalte e cárie de dentina) apresentarão diferenças em relação a diversidade bacteriana. A utilização de fluoreto em conjunto com a clorexidina será mais eficaz que estas substâncias testadas isoladamente, assim como o ozônio terá efeito antibacteriano satisfatório nas bactérias testadas.



ARTIGO 1. *O artigo a seguir encontra-se formatado nas normas do Periódico **Caries Research**.*

**Avaliação da estrutura da comunidade bacteriana em diferentes
estágios de desenvolvimento da cárie severa na infância**

Marcos Ximenes Ponte Filho ⁽¹⁾

Thaís Cezária Triches ⁽²⁾

Mariane Cardoso ⁽³⁾

Ricardo de Sousa Vieira ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Mestre em Odontopediatria pela Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil.
(marcosximenes@outlook.com)

⁽²⁾ Doutora. Professora do Departamento de Odontologia da Universidade Paranaense – UNIPAR - Umuarama – Paraná – Brasil.
(ttriches@gmail.com)

⁽³⁾ Doutora. Professora do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC - Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (mariane_cardoso@hotmail.com)

⁽⁴⁾ Doutor. Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC - Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (rvieira@ccs.ufsc.br)

Endereço para correspondência:

Marcos Ximenes Ponte Filho

Rua: Manoel Severino de Oliveira, 185, Apt. 106

Florianópolis – Santa Catarina – Brasil

Cep: 88062-120 / Lagoa da Conceição

E-mail: marcosximenes@outlook.com

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi verificar a estrutura da comunidade bacteriana do biofilme bacteriano em dentes deciduos de pacientes com cárie severa na infância através da análise de PCR-DGGE. Foram coletadas amostras de biofilme bacteriano de 23 crianças de um a cinco anos de idade provenientes de dentes hígidos (G1), com lesão de cárie em esmalte (G2) e dentina (G3). O DNA metagenômico foi extraído pelo o método CTAB, a qualidade do DNA verificada em gel de agarose, e a quantificação e pureza foi determinado espectrofotometricamente. Em seguida, a região V3 do gene rDNA 16S foi amplificada utilizando-se o DNA extraído e os iniciadores universais para bactérias BA 338fGC e UN518r. A estrutura da comunidade bacteriana foi analisada por PCR-DGGE. A aquisição das imagens foi realizada com fotodocumentador. Foram obtidos 45 amplicons, nos quais foi observado que as estruturas de comunidades bacterianas dos grupos estudados apresentaram diferenças entre os pacientes e entre os grupos de dentes, onde houve um maior numero de amplicons nas bactérias provenientes dos grupos G2 e G3 quando comparados ao G1 ($p < 0,05$). Conclui-se que a estrutura da comunidade bacteriana é mais complexa em dentes cariados quando comparadas a dentes hígidos, sendo que dentes com lesões de cárie em esmalte e em dentina apresentam comunidades semelhantes.

Palavras chave: Dente decíduo, Cárie, Microrganismos, PCR-DGGE, rDNA 16S

INTRODUÇÃO

A cárie severa na infância (CSI) é uma forma de cárie dentária extremamente severa e destrutiva, envolve vários dentes decíduos, principalmente os dentes anteriores e superiores antes dos 71 meses de idade (Vadiakas 2008). Anteriormente, a CSI estava associada ao uso prolongado da mamadeira de forma irrestrita (Hayes et al. 1983). Entretanto, o fator dieta já não pode isoladamente explicar a natureza tão grave dessa doença. Fatores como a microbiota bacteriana recém-criada, a imaturidade do sistema de defesa do hospedeiro, a baixa resistência da superfície do dente recém erupcionado, bem como a presença de substrato alimentar inadequado podem ser responsáveis por acelerar o processo biológico de desenvolvimento deste tipo de lesão em crianças (Vadiakas 2008).

A etiologia das doenças dentárias microbianas tem sido extensivamente estudada, contudo, a complexa composição dos biofilmes orais torna difícil identificar os microrganismos causadores (van Houte 1994; Bradshaw & Marsh 1998). Atualmente, já é aceito que as doenças bucais são o resultado da ação de comunidades microbianas multiespécies (Do et al. 2013). Os métodos de cultura convencionais têm sido utilizados tradicionalmente para caracterizar a microbiota bucal, no entanto, uma grande parte dos microrganismos permanece como não cultivável, e isso leva a uma compreensão incompleta das comunidades microbianas (Hiyari & Bennett 2011). O uso de

ferramentas moleculares permite a caracterização da microbiota humana geral, em especial da cavidade oral de forma mais completa, tendo em vista que independe de cultivo (Dewhirst et al. 2010).

A detecção e identificação de microrganismos do biofilme são um passo importante para o entendimento da prevenção, desenvolvimento e tratamento da cárie dentária. Dentre os métodos moleculares, destaca-se a reação da cadeia da polimerase (PCR) por ser uma técnica de rápida execução, sensível e mais específica, quando comparada com outros métodos microbiológicos (Igarashi et al. 1996).

Com o advento das técnicas de PCR (Saiki et al. 1988) e sequenciamento de DNA (Sanger et al. 1977), os métodos moleculares, especialmente aqueles baseados no estudo da sequência do rDNA 16S, têm sido muito úteis na descoberta de novos microrganismos. Estas técnicas baseiam-se na amplificação do rDNA 16S por PCR e posterior caracterização por clonagem e sequenciamento.

A técnica de DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante) consiste na amplificação de fragmentos do gene rDNA 16S a partir do DNA metagenômico e separação dos amplicons, baseado no conteúdo de GC, por eletroforese em gel com gradiente desnaturante, gerando um perfil de bandas que representa a estrutura da comunidade microbiana (Agnelli et al. 2004).

Pela técnica de DGGE pode-se avaliar a estrutura da microbiota baseado nas diferenças de mobilidade dos fragmentos do gene rDNA 16S amplificados por PCR, através de uma eletroforese realizada em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante constituído de formamida e uréia (Muyzer et al. 1993). Os diferentes rDNA 16S amplificados, baseado no seu conteúdo de GC, tem comportamento distintos de migração no gel, a qual é interrompida quando o fragmento amplificado é desnaturado a um nível onde não migra pelas malhas do gel de poliacrilamida, conferindo diferentes posições no gel a sequências distintas do gene rDNA 16S. Pela visualização dos géis de DGGE, a partir da posição das bandas ao longo dos géis de poliacrilamida, é possível avaliar as diferenças na estrutura da comunidade bacteriana das amostras analisadas. Como esta técnica é relativamente barata, de fácil execução e de confiança, ela é adequada para a pesquisa com cáries. É uma excelente técnica para a análise de estrutura de comunidades microbianas, permitindo avaliar a complexidade microbiana na saliva ou amostras de biofilme bacteriano (Li et al. 2007; Jiang et al. 2011).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a estrutura da comunidade bacteriana no biofilme dental de crianças com CSI, diferenciando as comunidades presentes nos dentes hígidos, dentes com lesão de cárie em esmalte, e dentes com lesão de cárie em dentina.

METODOLOGIA

Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob o Nº 2386/2011.

Seleção dos sujeitos e coleta da amostra

Para participar da pesquisa, os pais ou responsáveis dos pacientes foram devidamente informados sobre o estudo e concordaram com o tratamento, por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com a resolução 196/96.

Foram selecionadas 23 crianças por amostra de conveniência, na faixa etária de 1-5 anos, saudáveis e portadores de CSI. Foram excluídos da amostra pacientes com histórico de uso de antibiótico nos últimos 3 meses antes da consulta, pacientes em tratamento odontológico e aqueles que estavam fazendo uso de algum antimicrobiano tópico oral. Os critérios de inclusão foram crianças com incisivos e caninos superiores hígidos, com lesão de cárie em esmalte e/ou em dentina, todos os dentes apresentavam polpa saudável. O diagnóstico de CSI foi dado através dos achados clínicos (mais de um dente decíduo anterior cariado), juntamente com as informações da anamnese em relação a hábitos alimentares e de higiene.

As amostras de biofilme bacteriano foram coletadas por um dos pesquisadores (MXPf), totalizando 45 dentes, sendo 10 dentes

hígidos (G1), 15 com lesões de esmalte (G2), e 15 com lesões de dentina (G3).

Primeiramente, foi aplicada com o auxílio de Cotonetes® (Johnson & Johnson, Brasil) uma camada de Diguconato de Clorexidina a 1% (Vita Farma, Florianópolis, SC, Brasil) por 1 minuto para desinfecção da região circundante aos dentes selecionados (Ruvierre et al.2007), em seguida, foi realizado o isolamento relativo da área selecionada com rolo de algodão estéril (Johnson & Johnson, Brasil). Com o auxílio de microaplicadores Cavibrush® esterilizados (três para cada dente) foram coletadas amostras de biofilme bacteriano presentes nas lesões de cárie (G2 e G3) e na superfície do dente hígido (G1) (técnica do *Swab*). Em seguida, a ponta dos microaplicadores foi cortada com tesoura estéril e transferida individualmente para microtubos de 1,5 mL contendo 1.0 mL de água Milli-Q estéril. O material foi transportado sob refrigeração para o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da UFSC no prazo máximo de 2 horas, onde os procedimentos de extração de DNA metagenômico foram realizados imediatamente.

Extração do DNA metagenômico

O material coletado foi submetido à agitação em vortex por 1 minuto, em seguida as pontas do microaplicador presentes no interior do microtubo foram friccionadas na parede do mesmo para que houvesse uma maior transferência do material biológico

coletado para o meio. Os microaplicadores foram removidos e o material centrifugado a 13.000 g por 12 minutos. Após esse procedimento, foi possível observar a formação do pélete (material biológico no interior do tubo). Em seguida, foram transferidos 450 μL de sobrenadante, com cuidado, para manter o pélete de cada tubo. Após isso, foram realizadas movimentações com as pontas de micropipeta para resuspender o pélete com os 50 μL restantes. Foram então transferidos e ressuspensos os líquidos provenientes dos 3 tubos de coleta de cada dente para um novo tubo, formando assim uma amostra composta, e novamente foram submetidos a centrifugação de 13.000 g por 12 minutos.

Após esses procedimentos iniciais foi adicionado 600 μL de solução tampão de CTAB (NaCl 0,7 M, CTAB 1 %, Tris pH 8,0 50 mM, EDTA 10 mM) + β -betamercaptoetanol a 0,2 %. Os tubos foram agitados levemente em vortex, em seguida as amostras foram incubadas a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 60 min, agitando-se os tubos a cada 10 minutos. Seguindo os procedimentos de incubação, foram adicionados 600 μL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1). O material foi então centrifugado a 13.000 g por 10 min e depois foram removidos 500 μL de sobrenadante.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 500 μL de etanol 100 %. Esse material foi incubado a -20 $^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos para precipitação do DNA. Após esse período o material foi centrifugado novamente a 13.000 g por 12 min, e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 μL de etanol 90 % ao pélete e após 5 minutos as amostras foram

centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto emborcado em toalha de papel para a completa evaporação do álcool. Foi adicionado 50 µL de água milli-Q estéril e armazenado em freezer a -20°C (Boyce et al. 1989)

A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel com 1 % de agarose, corado com SYBR Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), utilizando-se o tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), e submetido à eletroforese horizontal por uma hora a 60 V. A quantificação e a pureza do DNA foi avaliada em espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

Análise da estrutura das comunidades bacterianas por PCR-DGGE

A análise da estrutura das comunidades bacterianas das amostras do biofilme bacteriano foram feitas por PCR-DGGE. A região V3 do gene rDNA 16S de bactéria foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (Ovreås et al. 1997). A amplificação do gene rDNA 16S foi feita em solução tampão para Taq DNA polimerase, contendo 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 nG do DNA

metagenômico. As condições de amplificação da PCR foram 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. O DNA foi examinado e quantificado conforme descrito anteriormente.

Quantidades iguais de amplicons (300 nG) foram analisadas por PCR-DGGE utilizando 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m), contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (Ovreås et al. 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V e 60° C constantes, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão TAE 1X. O DNA foi corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System (Carestream Health, New York, USA).

Análise estatística

A estrutura das comunidades das amostras do biofilme bacteriano foram analisadas com o programa *Gel Compar II* (BioSystematica, Wales, UK), a partir da análise de agrupamento hierárquico, utilizando coeficiente de *Jaccard*, e o modelo de agrupamento por UPGMA.

Os perfis de amplicons também foram comparados em um espaço de ordenação em escala multidimensional (MDS), através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray Curtis para avaliar a distância entre as amostras, comparando as distâncias com as respectivas (di)similaridades. A relação entre estas duas medidas foi avaliada por regressão linear, sendo a confiabilidade da regressão representada pelo “stress”. Para discriminar os grupos foram testadas as diferenças entre o valor médio de similaridade entre as amostras (rank) dentro dos grupos e entre os grupos, a partir da análise de similaridade (ANOSIM), a qual calcula um valor R com base na comparação dos grupos, sendo o R recalculado com base em permutações, permitindo determinar diferenças estatísticas entre os perfis de bandas da PCR-DGGE.

O número de amplicons dos grupos estudados foi submetido à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa Assistat versão 7.6 Beta (Assis 2013) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A comparação entre as estruturas das comunidades bacterianas de amostras de biofilme bacteriano dos grupos de dentes estudados apresentou perfis de amplicons distintos entre todas as amostras analisadas, não havendo amostras totalmente similares entre os pacientes estudados, nem mesmo entre os grupos de dentes avaliados (Figuras 1 e 2).

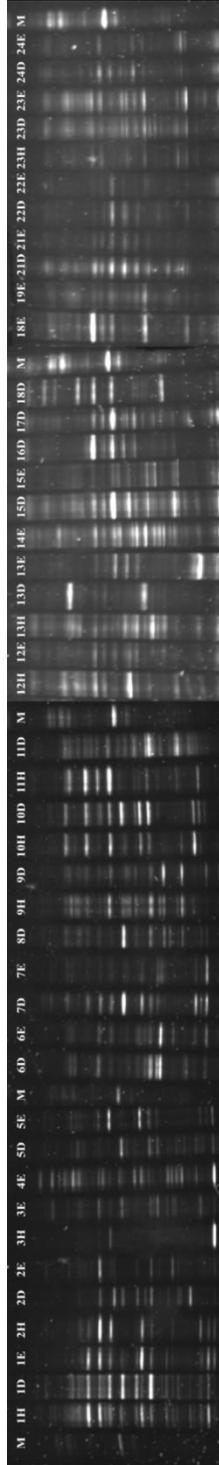


Figura 1 – Gel da PCR-DGGE com os perfis de amplicons de amostras de biofilme bacteriano dos diferentes grupos de dentes estudados (H – Hígido; E – Esmalte; D – Dentina).

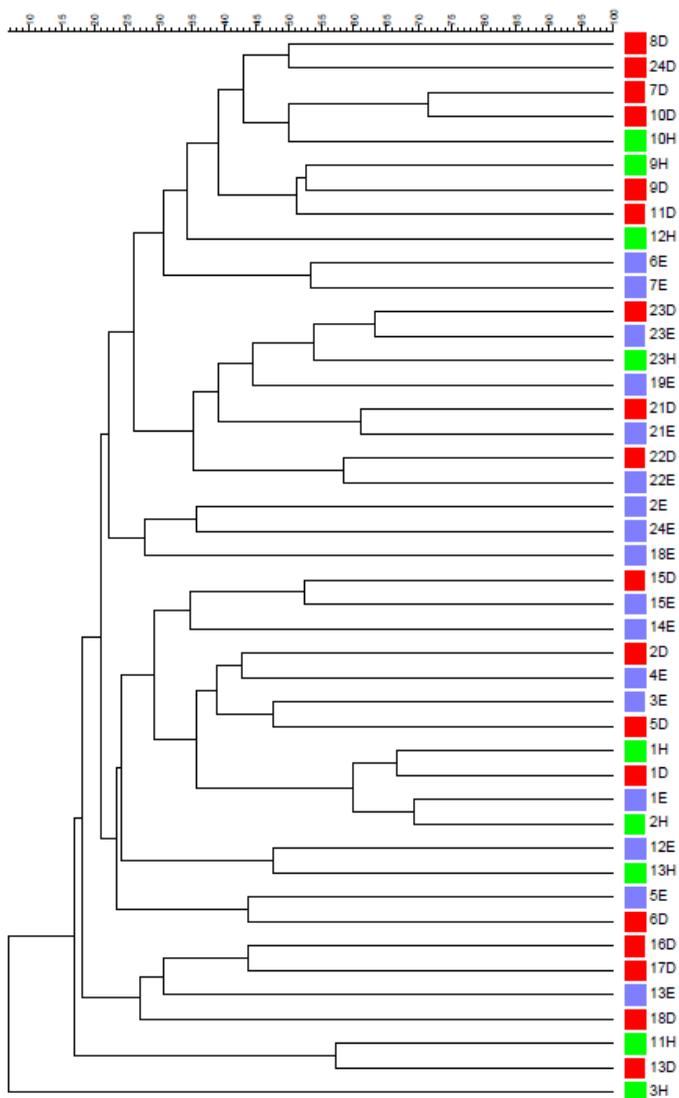


Figura 2 – Análise de agrupamento hierárquico por estágio de desenvolvimento da cárie. De amostras provenientes de biofilme bacteriano.

No entanto, apesar dos perfis de amplicons apresentarem-se distintos entre todas as amostras analisadas, pode-se observar uma tendência de maior número de amplicons nas amostras de dente dos grupos G2 e G3, quando comparado ao G1, o qual foi confirmado estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (Gráfico 1). Estes resultados demonstram uma tendência de maior diversidade de bactérias nos grupos de dentes com desenvolvimento de cárie, no entanto não permite concluir que as bactérias presentes nos grupos 2 e 3 sejam as mesmas.

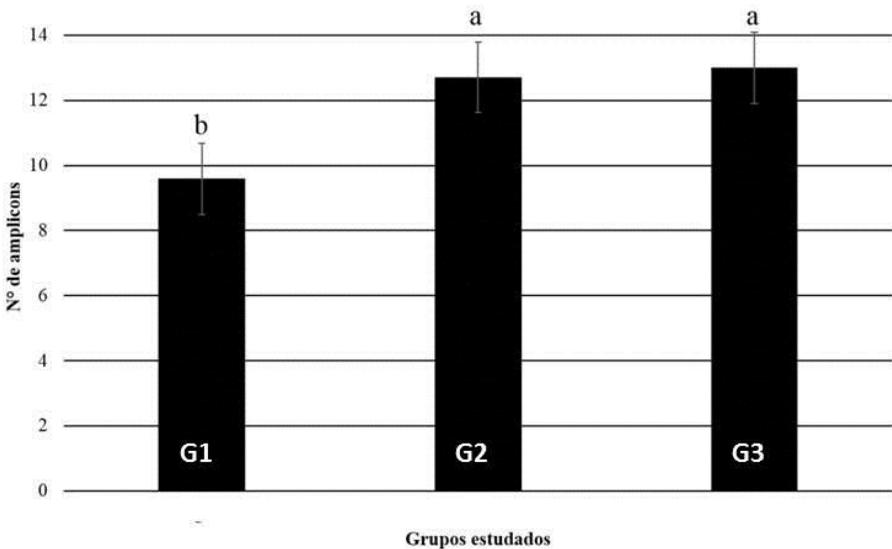


Gráfico 1- Número de amplicons obtidos por PCR-DGGE de amostras do biofilme bacteriano dos diferentes grupos estudados ($p < 0,05$).

Pela análise qualitativa realizada, com o intuito de avaliar se as estruturas das comunidades bacterianas dos grupos estudados eram relacionadas filogeneticamente, pode observar, a partir da escala multidimensional (MDS) que as amostras se dispersam em um espaço de ordenação multidimensional, não sendo possível evidenciar padrões de associação entre as amostras analisadas (Gráfico 2). No entanto, quando estas distâncias foram avaliadas do ponto de vista de significância estatística, a partir do programa ANOSIM, é possível evidenciar padrões características (Tabela 1), os quais corroboram com dados quantitativos obtidos pelas contagem do número de amplicons, sendo que o grupo 1 difere estatisticamente do grupo 2 e 3, os quais não diferiram entre si.

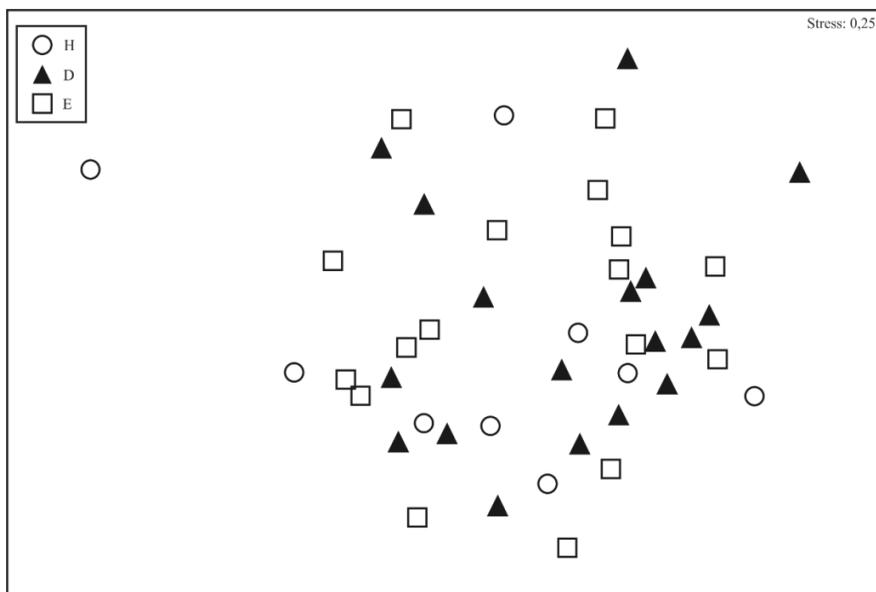


Gráfico 2 – Análise de MDS para comparação entre a estrutura da comunidade bacteriana de amostras do biofilme bacteriano dos grupos estudados.

Tabela 1 – Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do rDNA 16S de bactéria de amostras do biofilme bacteriano coletado

Comparações entre horizontes	Teste de similaridade por <i>Pairwise</i>
Hígido, Dentina	0,050
Hígido, Esmalte	0,059
Dentina, Esmalte	0,000

Nível de significância para R global – 0,022; as médias seguidas por letras diferentes (a, b) diferem estatisticamente entre si ($p < 0,2$).

DISCUSSÃO

A investigação detalhada da composição do ecossistema microbiano oral é essencial para compreender a etiologia e alcançar a prevenção e o tratamento adequado da cárie severa na infância. O estudo apresentou, pela primeira vez na literatura, a análise comparativa da estrutura da comunidade bacteriana de dentes hígidos e com lesão de cárie em crianças menores de 5 anos com dentição exclusivamente decídua. Embora existam vários estudos anteriores que pesquisaram sobre a microbiota da cárie em crianças através de cultivos de bactérias ou ainda utilizando diferentes técnicas de biologia molecular, ainda não foi possível demonstrar a estrutura geral e composição da microbiota desse determinado tipo de lesão de forma abrangente (Becker et al. 2002; Li et al. 2007; Aas et al. 2008; Ling et al. 2010). O PCR-DGGE é um dos métodos moleculares de *fingerprinting* capazes de segmentar diretamente as regiões da molécula do gene rDNA 16S,

tornando viável realizar um levantamento de comunidades bacterianas sem a necessidade de cultivo (Muyzer et al. 1993).

Através da análise das 45 bandas (amplicons) obtidas, foi possível identificar uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras do biofilme bacteriano dos dentes hígidos em relação aos dentes com lesão de cárie (esmalte e dentina). Isso sugere que há uma menor diversidade bacteriana nos dentes saudáveis. Esses dados corroboram com estudo anterior também realizado em crianças (Ling et al. 2010). Entretanto, outros estudos relataram que dentes hígidos em pacientes livres de cárie apresentavam uma maior diversidade bacteriana (Li et al. 2007; Reyes & Dalmacio 2012). A diferença entre os resultados pode ser justificada pelos diferentes iniciadores utilizados durante os procedimentos de PCR. Nesta pesquisa foram utilizado os iniciadores universais para bactéria BA338fGC e UN518r. O estudo de Ling et al., 2010, utilizou os primers universais para bactéria BA341fGC–UN518r, enquanto que os outros estudos que relatam maior diversidade bacteriana em pacientes livres de cárie utilizaram iniciadores que conferem à amplificação de fragmentos de DNA maiores, no entanto, não considerado ideal para análise por PCR-DGGE, pois limitam a avaliação da estrutura das comunidades, como por exemplo o universal 8f e 1492r (Li et al. 2007; Reyes & Dalmacio 2012).

A escolha do iniciador é de extrema importância, pois irá selecionar as diferentes regiões hipervariáveis do gene rDNA 16S. A escolha da região hipervariável pode influenciar bastante os

perfis de PCR-DGGE, assim como os índices de diversidade produzidos a partir de amostras de DNA da comunidade, e até mesmo diferenças sutis em sequências de iniciadores pode resultar em, substancialmente, diferentes perfis e avaliação da diversidade microbiana (Yu & Morrison 2004). Neste estudo foi utilizada a região V3 do gene, esta região já foi relatada por outros autores como a melhor região para a análise do perfil bacteriano (Yu & Morrison 2004; Li et al. 2007).

Outra possível explicação é que na presente investigação as amostras do biofilme bacteriano dos dentes hígidos foram coletadas do mesmo paciente que apresentava lesão de cárie (esmalte/dentina), ou seja, nenhum sujeito do estudo era livre de cárie. Portanto, é possível que esses dentes saudáveis apresentassem as mesmas espécies de bactéria que os dentes com lesão, entretanto em menor quantidade que não foi detectada pela DGGE. E ainda, como nos dentes cariados existia a perda de estrutura dentária e conseqüentemente, a formação de nichos, isso favoreceu o acúmulo do biofilme bacteriano e, portanto um maior volume de bactéria foi adquirido no momento da coleta.

Teoricamente, apenas as espécies representativas de mais de 1% do total da comunidade são consideradas visíveis nos perfis de DGGE da comunidade microbiana (Muyzer et al. 1993), isto significa que o número de bandas de DGGE está relacionado com as bactérias predominantes. Apesar de o estudo ter detectado 45 amplicons de PCR no gel de DGGE, não podemos afirmar que havia 45 espécies bacterianas presentes nas placas bacterianas

avaliadas isso por que: 1- duas ou mais bactérias com características filogenéticas semelhantes podem ter bandas sobrepostas no gel de DGGE (Hayes et al. 1999); 2- diferentes espécies de bactérias podem apresentar distâncias idênticas de migração no gel (Muyzer 1999); 3- os níveis de microrganismos coletados foram abaixo do detectável (Paster et al. 2001); 4- apesar de cerca de 500 espécies de bactérias terem sido identificadas na cavidade oral (Paster et al. 2001), nem todas estão presentes da boca de um único indivíduo.

Foi possível observar que há uma relação filogenética entre as lesões de cárie de esmalte e dentina, sendo que ambas apresentam diferenças significantes dos dentes hígidos. Isso sugere que há similaridades das comunidades bacterianas em diferentes tipos de lesão de cárie em dentes decíduos. A partir dos perfis de DGGE obtido neste estudo não foi possível encontrar uma banda que seja especificamente associada com cárie dental. Entretanto, autores que conduziram estudos semelhantes em dentes decíduos, mas que em um segundo momento realizaram sequenciamento do DNA das amostras tem relatado que existem mais de 200 gêneros de bactérias na microbiota oral de crianças, sendo que as comunidades cariogênicas possuem principalmente os gêneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Leptotrichia*, e *Thiomonas* (Li et al. 2007; Ling et al. 2010; Jiang et al. 2011)

CONCLUSÃO

Conclui-se que a estrutura da comunidade bacteriana é mais complexa em dentes cariados quando comparadas a dentes hígidos, sendo que dentes com lesões de cárie em esmalte e em dentina apresentam comunidades semelhantes.



5. Artigo 2

ARTIGO 2

*O artigo a seguir encontra-se formatado nas normas do Periódico **Caries Research**.*

Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana do ozônio, e da associação de clorexidina e flúor sobre bactérias da cárie severa na infância

Marcos Ximenes Ponte Filho ⁽¹⁾

Mariane Cardoso ⁽²⁾

Fernando Astorga ⁽³⁾

Roland Arnold ⁽⁴⁾

Luiz André Pimenta ⁽⁵⁾

Ricardo de Sousa Vieira ⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Mestre em Odontopediatria pela Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC - Florianópolis - Santa Catarina - Brasil. (marcosximenes@outlook.com)

⁽²⁾ Doutora. Professora do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC - Florianópolis - Santa Catarina - Brasil. (mariane_cardoso@hotmail.com)

⁽³⁾ Mestre. Professor da Escola de Odontologia da Universidade do Colorado-Denver - Colorado- EUA. (fernando.astorgagarcia@ucdenver.edu)

⁽⁴⁾ Doutor. Professor da Escola de Odontologia- Departamento de Ciências do Diagnóstico e Odontologia da Universidade da Carolina do Norte - UNC - Chapel Hill - Carolina do Norte - EUA. (arnoldr@dentistry.unc.edu)

⁽⁵⁾ Doutor. Professor da Escola de Odontologia - Departamento de Ecologia Dental e Diretor do Centro de Deformidades Craniofaciais da Universidade da Carolina do Norte - UNC - Chapel Hill - Carolina do Norte - EUA. (pimental@dentistry.unc.edu)

⁽⁶⁾ Doutor. Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC - Florianópolis - Santa Catarina - Brasil. (rvieira@ccs.ufsc.br)

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi verificar a ação de agentes antimicrobianos para serem utilizados em lesões de cárie severa da infância. Foi verificada a ação do gás ozônio e da associação de fluoreto de sódio (NaF) com clorexidina (CHX) contra *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*. Para a verificação da redução da atividade bacteriana no teste com ozônio foi utilizada a análise de recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) em meio TSA após o tratamento, e para os testes da associação do NaF e CHX foram verificadas por meio de análise da densidade ótica em placas de microtitulação de 96 poços. Os dados obtidos do tratamento com ozônio foram submetidos aos testes de Wilcoxon ($p < 0,05$), ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Para os dados de NaF-CHX foram aplicados os testes de ANOVA 2-way e Bonferroni ($p < 0,05$). A contagem de UFC/mL demonstrou morte $> 3\log_{10}$ (99,9 %) para todas as bactérias em uma aplicação de ozônio ≥ 20 ppm para *S. mutans* e ≥ 200 ppm para *L. acidophilus* e *E. faecalis*, enquanto que a associação de NaF-CHX foi mais eficaz ($p < 0,001$) em todas as bactérias testadas quando comparado com as análises das substância isoladamente e ao grupo controle. Para este estudo *in vitro* pode-se concluir que todos os agentes testados foram eficazes no controle do crescimento bacteriano de *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*.

Palavras chave: Clorexidina, Cárie dentária, Fluoreto de Sódio, Dente decíduo, Ozônio.

INTRODUÇÃO

A Academia Americana de Odontopediatria (AAPD) considera como Cárie Severa na Infância (CSI) ou *Early Childhood Caries* (E.C.C. – Língua Inglesa) como a presença de um ou mais dentes decíduos cariados (lesões cavitadas ou não), perdidos (devido à cárie) ou restaurados antes dos 71 meses de idade (AAPD, 2009).

Estudos apontam grandes quantidades de *S. mutans* e *Lactobacillus* em cárie dental de dentes decíduos (Li et al. 2007; Aas et al. 2008). Investigações laboratoriais demonstraram a capacidade de cepas dessas espécies em produzir o ácido lático que pela a desmineralização está associada ao desenvolvimento da cárie dentária (van Houte 1994).

A terapia restauradora em dentes decíduos expostos a CSI é essencial, mas nem sempre possível. Muitas crianças tem dificuldade de comportamento e colaboração diante ao tratamento. Aproximadamente 35% das crianças com 5 anos têm medo de ir ao dentista, sendo esta porcentagem maior quanto menor for a idade (Chadwick & Hosey 2007). A remoção parcial do tecido cariado, baseado na filosofia da mínima intervenção pode ser o tratamento de escolha em alguns casos, mas infelizmente, em algumas crianças, as lesões de cárie progridem a um ponto que o tratamento sob anestesia geral é necessário se não há colaboração da criança (Tinanoff & O’Sullivan 1997). Outro fator limitante é o tamanho e formato da lesão de CSI que, muitas vezes não permitem a adaptação de um material restaurador adequado. Logo, qualquer

procedimento restaurador irá exigir um tempo maior de atendimento (Orhan et al. 2008). Há, portanto, a necessidade de encontrar uma forma de tratamento imediato que seja capaz de inibir ou paralisar a lesão de cárie nesses pacientes até que o comportamento adequado e a cooperação sejam conquistados. Dentre os materiais disponíveis para essa finalidade tem-se o flúor, a clorexidina e mais recentemente relatado o uso do gás ozônio.

A utilização do flúor em suas diversas formas é um dos principais responsáveis pela queda da prevalência da cárie em nível mundial e também pela diminuição da severidade e progressão das lesões (Cury et al. 2004). A eficácia na prevenção de lesões de cárie tem sido comprovada em alguns estudos (ten Cate 1997; Marinho et al. 2003; Cury et al. 2004). A capacidade de flúor para prevenir e deter a cárie tem sido pesquisada extensivamente. O flúor tem três mecanismos principais de ação: alteração do metabolismo bacteriano após difundir-se para o interior das bactérias na forma de ácido fluorídrico (HF); inibição da desmineralização; e o auxílio na remineralização (Featherstone 2006).

A clorexidina (CHX) tem sido estudada há mais de 30 anos como um agente antimicrobiano para o controle químico de formação de biofilme bacteriano e para a prevenção de cáries. Trata-se de uma base forte que atua bacteriostaticamente quando administrada em baixas concentrações, e em concentrações mais elevadas, a mesma tem ação bactericida (Marsh 2010). O seu espectro antibacteriano abrange as bactérias gram-positivas e

gram-negativas, fungos e leveduras. Em geral, a eficácia de CHX está relacionada com a sua concentração e a frequência de aplicação (Baca et al. 2002). As vantagens da utilização da clorexidina são: o amplo espectro antibacteriano e a substantividade que é a capacidade de se ligar aos grupos carboxila da mucina que cobre a mucosa bucal e ser constantemente liberada nessas áreas, de forma ativa (Greenstein et al. 1986; Fardal & Turnbull 1986; Puig Silla et al. 2008).

O ozônio é mais frequentemente utilizado em odontologia restauradora e endodontia. A administração tópica na forma gasosa pode ser através de um sistema aberto ou através de um sistema de sucção de vedação como pré-requisito para evitar a inalação e efeitos adversos. Tem sido sugerido que a aplicação de ozônio em lesões de cárie cavitadas e não cavitadas (Azarpazhooh & Limeback 2008). O sucesso da utilização do ozônio como agente antibacteriano tem sido demonstrado na literatura em *S. mutans* (Baysan & Lynch 2004; Castillo et al. 2008; Johansson et al. 2009), em *Lactobacillus* (Johansson et al. 2009; Slot et al. 2011), e *E.faecalis* (Hems et al. 2005; Fagrell et al. 2008). Entretanto, devido às diferentes técnicas e equipamentos utilizados nesses estudos, e ainda a várias publicações de estudos *in vitro* (Rickard et al. 2004; Azarpazhooh & Limeback 2008; Polydorou et al. 2012) e *in vivo* (Marthaler et al. 1996; Nagayoshi, Fukuizumi, et al. 2004; Yip et al. 2007), contraindicando o uso do gás na odontologia, faz-se necessário a busca de respostas mais pertinentes em relação a técnica.

Portanto, devido a grande prevalência de cárie severa na infância na população mundial, e a dificuldade que há na colaboração de muitos pacientes frente ao tratamento restaurador imediato, existe a necessidade de encontrar uma opção de tratamento que seja eficaz no controle da progressão da lesão cáriosa nos dentes decíduos afetados. Esse estudo teve por objetivo verificar a ação do gás ozônio e da associação NaF-CHX em bactérias *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*.

METODOLOGIA

Cultivo das bactérias

Foram cultivadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 10449, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Enterococcus faecalis* V583. As culturas de estoque estavam armazenadas em alíquotas em leite desnatado a -80 °C. Os inóculos a partir dessas culturas foram cultivados em caldo TSB (Tryptic soy broth, Difco® Laboratories), em uma atmosfera de 5 % CO₂/10 % H₂/85 % N₂ (câmara de anaerobiose Coy, Coy Laboratory Products Inc , Ann Arbor, MI, EUA).

Para a verificação da pureza das bactérias, uma alíquota de cada bactéria foi submetida à coloração pela a técnica de Gram seguida de análise em microscópio (100x). As bactérias também foram cultivadas *overnight* em placas de ágar de sangue de ovelha (Trypticase™ Soy Agar 5% Sheep Blood) para a análise da morfologia de colônias. Ambos os testes serviram para confirmar a pureza dos microrganismos.

Inoculações de *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis* foram transferidas para 10 mL de caldo nutritivo TSB e incubadas a 37°C sob condições anaeróbicas. Durante os experimentos as suspensões bacterianas foram preparadas utilizando o padrão de MacFarland 0,5 (aproximadamente 10⁸ UFC/mL).

Ozônio (O₃)

Geradores de ozônio

Foram utilizados três geradores de ozônio conforme descritos na Tabela abaixo:

Gerador de O₃	Concentração de O₃ produzida	Fabricante/ País
HealOzoneX4®	2100 ppm	Kavo/Alemanha
OL80A	2 e 20 ppm	Yanco/EUA
OL80W	200 e 2000 ppm	Yanco/EUA

A ação do HealOzone X4® em S. mutans

A eficácia do HealOzone X4® foi testada em bactérias suspensas em líquido, e foi testada apenas em *S. mutans*. Uma placa de microtitulação de 96 poços foi utilizada para receber 10µL de 10⁶ UFC / mL de *S. mutans* a serem tratados com O₃ utilizando a capacidade máxima de produção de O₃ do equipamento (aproximadamente 2100 ppm). Os controles negativos consistiram de dois grupos de 200 µL de meio TSB sem bactérias, sendo que um grupo foi tratado durante 1 min, e o outro foi deixado sem tratamento. O controle positivo foi de 10µL da cultura de bactéria sem tratamento. Cada grupo foi formado por 4 poços. Sendo que os grupos experimentais receberam o tratamento de O₃ em 1, 2, 3 e 4 minutos.

Após o tratamento, os 10 µL de bactérias foram novamente re-suspensas em 200 µL de TSB e incubadas em uma câmara

anaeróbica a 37 °C. As densidades ópticas ($\lambda 610$ nm) das amostras em quaduplicata foram determinados após 18 horas, utilizando um leitor de microplacas Vmax kinetic /SoftMaz Pro 3.1 (Sunnyvale, Califórnia, Estado Unidos). Os dados foram expressos como mOD (Mean Optical Density) e as médias e desvios padrão foram determinados em poços replicados. Cada experimento foi repetido de forma independente, pelo menos, três vezes.

A ação do gás ozônio, OL80W e OL80A, em S. mutans, L. acidophilus e E. faecalis

Para determinar se as bactérias *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis* são susceptíveis a ação do gás ozônio foram utilizados os geradores de ozônio OL80W e OL80A (Ozone Services, Yanco Indústrias, Burton, Estados Unidos). Nestes equipamentos o gás é produzido dentro de câmaras, onde é capaz de produzir concentrações de 2-20 ppm e 200-2000 ppm, respectivamente. O tempo de exposição neste experimento foi de 4 minutos, essa escolha foi baseada nos testes realizados com o HealOzone X4® (2100 ppm), e em outro estudo que comprovou a sensibilidade de bactérias a um tempo de exposição de 4 minutos (Hems et al. 2005)

Foi realizada cultura *overnight* (início da fase exponencial) das três bactérias. Após o início da fase exponencial, as mesmas foram ajustadas em suspensão de 10^8 UFC/mL (Padrão 0,5 de MacFarland). Em seguida, foram realizadas diluições logarítmicas das bactérias variando as concentrações de 10^8 - 10^0 UFC/mL.

Para aperfeiçoar a aplicação do gás, 10 μ L de cada concentração das bactérias foi aplicado na forma de gotas sobre a superfície de placas de ágar de sangue de ovelha (Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood). Foram preparadas seis placas:

- 1- Placa controle negativo, sem inóculos e sem tratamento.
- 2- Placa controle positivo, inoculada sem exposição ao gás ozônio.
- 3- Placa inoculada e exposta a 2 ppm de gás ozônio por 4 minutos. OL80W
- 4- Placa inoculada e exposta a 20 ppm de gás ozônio por 4 minutos. OL80W
- 5- Placa inoculada e exposta a 200 ppm de gás ozônio por 4 minutos. OL80A
- 6- Placa inoculada e exposta a 2000 ppm de gás ozônio por 4 minutos. OL80A

Após os tratamentos, as placas foram incubadas em câmara anaeróbica (10% de H₂ - 5% de CO₂ - 85% de N₂) a 37 °C durante 18 horas. Após este período, o número de colônias de cada bactéria nas diferentes concentrações testadas foi calculado utilizando a placa controle positivo (sem tratamento) como padrão. O experimento foi repetido em duas ocasiões independentes.

Fluoreto de sódio e clorexidina

Preparo das soluções

As substâncias testadas foram clorexidina 0,12 % (Peridex®, 3M,WA, Estados Unidos) e o fluoreto de sódio 5 % (J.T Baker, Center Valley, PA, Estados Unidos). No estudo piloto foi observado que as concentrações das substâncias citadas acima foram capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano sob as condições testadas. Portanto, optou-se por diluir essas concentrações até um nível que não houvesse inibição do crescimento bacteriano quando essas substâncias fossem testadas separadamente. Logo, as seguintes concentrações (%) de cada substâncias foi preparada:

- **Fluoreto de Sódio (NaF):** 5 / 2,5 / 1,25 / 0,625 / 0,31 / 0,15 / 0,07 / 0,03
- **Clorexidina (CHX):** 0,0004 / 0,0002 / 0,0001 / 0,00005 / 0,000025 / 0,000012 / 0,00006

Todas essas concentrações de substâncias foram testadas separadamente e em conjunto através do método de mistura conhecido como *Checkboard*.

Preparação das microplacas

As placas esterilizadas com 96 poços foram preparadas de forma que cada poço continha um volume final de 220 µL. Na placa, as colunas foram distribuídas em números de 1 a 8

(concentração de NaF) e as linhas em letras “A” até “G” (concentração de CHX). Sendo que a composição dos poços foram:

- Poços experimentais: 150 μL TSB, 20 μL de cada bactéria 10^6UFC/mL , 25 μL CHX e 25 μL NaF.
- Poços controle bactéria: 150 μL TSB, 20 μL de cada bactéria 10^6UFC/mL , 50 μL água destilada esterilizada.
- Poços controle meio TSB: 150 μL TSB + 70 μL água destilada esterilizada.

Após o preparo das microplacas, a densidade ótica ($\lambda 610$ nM) das amostras foi verificada ($T=0$ horas), utilizando o leitor de microplacas Vmax kinetic /SoftMaz Pro 3.1 (Sunnyvale, Califórnia, Estado Unidos). Em seguida as amostras foram incubadas em estufa a 37°C .

As demais análises de densidade ótica foram realizadas nos tempos: 12 horas, 14 horas, 16 horas e 18 horas. Após cada aferição as placas foram colocadas de volta na estufa a 37°C , até o final do experimento. Esse estudo foi realizado em triplicata por um único operador.

Análise estatística

Para o teste da ação do ozônio em meio líquido foi aplicado o teste de Wilcoxon. Para a análise da ação do ozônio no ágar (TSB), a média e o desvio padrão dos dados obtidos foram calculados e em seguida foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA), como havia diferença estatística entre as médias, aplicou-se o Teste de Tukey para cada um dos critérios e suas interações.

Para os experimentos realizados verificando a ação do NaF e CHX foi utilizada a análise de variância de dois fatores (*ANOVA two-way*), para medidas sem replicação, utilizando a soma dos quadrados do tipo III, ou parcial. Em seguida, foi feita correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Em ambos os testes, as análises estatísticas foram cegas para o tipo de bactéria. Todos os testes foram considerados estatisticamente significantes com valores de $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados com auxílio do software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 20.0, EUA).

RESULTADOS

A ação do ozônio (Healozone X4®) em S. mutans

Os resultados estão dispostos na Tabela 1. Os resultados apontaram que o equipamento foi ineficiente na inibição do crescimento de *S. mutans* a uma concentração de 2100 ppm sob as condições testadas, com tempos de aplicação de 1, 2, 3, e 4 minutos

Tabela1. Média e desvio padrão (dp) da densidade ótica do crescimento bacteriano (mO.D. λ 610 nM) atingido após incubação de 37°C por 18 hr após diferente protocolos de tratamento utilizando o gerador de ozônio HealOzone X4® em 10 μ l de 10⁶ UFC/mL de *S. mutans*

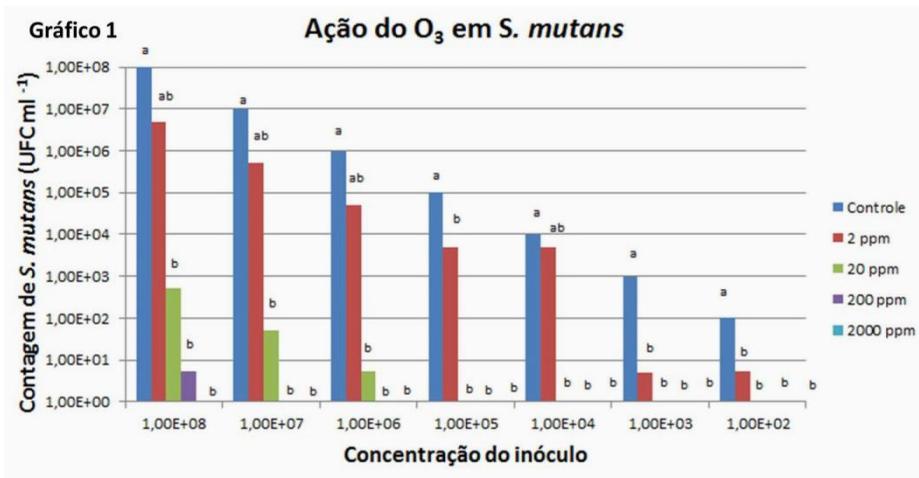
		10 ⁶ UFC/mL	10 ⁶ UFC/mL 1 min	10 ⁶ UFC/mL 2 min	10 ⁶ UFC/mL 3 min	10 ⁶ UFC/mL 4 min
2100 ppm	média	268	256	233	257	266
	dp	14	2	7	15	4

(Wilcoxon rank sum test, p=0.53)

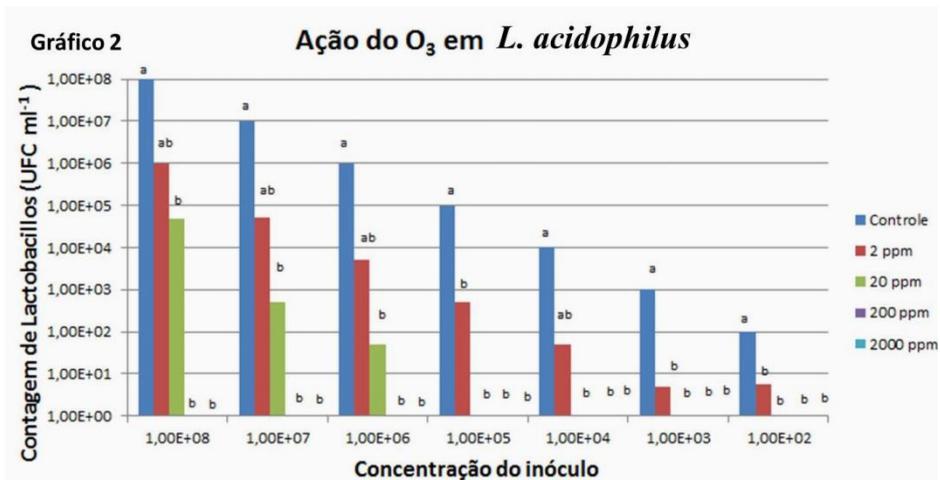
A ação do ozônio (OL80A e OL80W) em S. mutans, L. acidophilus e E. faecalis

Os dados foram expressos nos gráficos 1, 2 e 3, as médias seguidas pela mesma letra (a, b, c) não diferem estatisticamente entre si.

Os gráficos 1, 2, e 3 apresentam um padrão de inibição semelhante para as três bactérias testadas. É possível observar que em concentrações ≥ 20 ppm a inibição foi maior que 3log₁₀ (99,9 % de morte) ($p < 0,01$) para os três microrganismos testados.



*Gráfico 1. Inibição de crescimento bacteriano em escala logarítmica log₁₀ após o tratamento nas diferentes concentrações de O₃ em *S. mutans* e o grupo controle*



*Gráfico 2. Inibição de crescimento bacteriano em escala logarítmica log₁₀ após o tratamento nas diferentes concentrações de O₃ em *L. acidophilus* e o grupo controle*

Gráfico 3

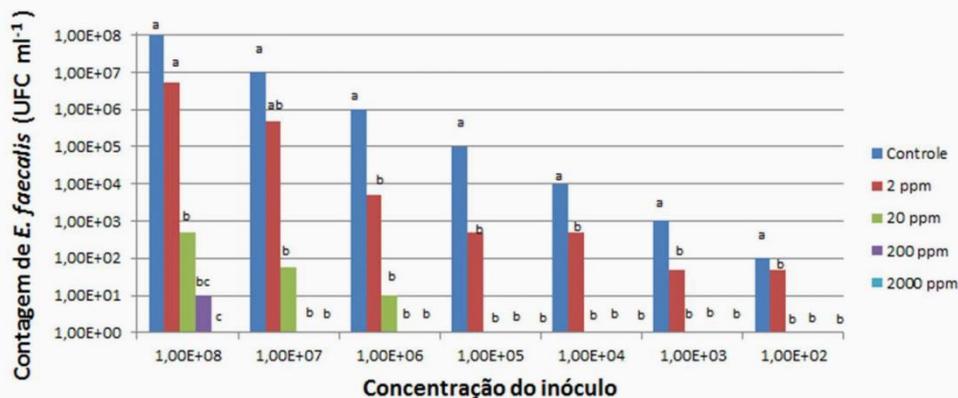
Ação do O₃ em *E. faecalis*

Gráfico 3. Inibição de crescimento bacteriano em escala logarítmica \log_{10} após o tratamento nas diferentes concentrações de O₃ em *E. faecalis* e o grupo controle

A ação da associação de CHX e NaF em *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*

A tabela 2 demonstra os efeitos globais dos antimicrobianos independente do tipo de bactéria. Houve diferença estatisticamente significativa para todos os grupos testados.

Tabela 2. Efeito global dos antimicrobianos na densidade ótica, comparados entre si e comparados ao grupo controle

Antimicrobianos comparados	Diferença média ^a	Erro Padrão	IC 95%	Valor p ^b	
Controle	CHX	0.062	0.014	0.024 – 0.099	<0.001
	NaF	0.127	0.014	0.091 – 0.163	<0.001
	CHX + NaF	0.167	0.011	0.139 – 0.195	<0.001
CHX + NaF	CHX	-0.105	0.011	-0.133 – 0.077	<0.001
	NaF	-0.040	0.010	-0.066 – -0.013	0.001
CHX	NaF	0.065	0.014	0.029 – 0.102	<0.001

IC: Intervalo de confiança; CHX: Clorexidina; NaF: Fluoreto de sódio

^a Média marginal estimada; ^b com ajuste de Bonferroni para múltiplas comparações

O gráfico 4 demonstra que as duas substâncias testadas foram eficazes no controle do crescimento bacteriano nas três bactérias do experimento quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,001$).

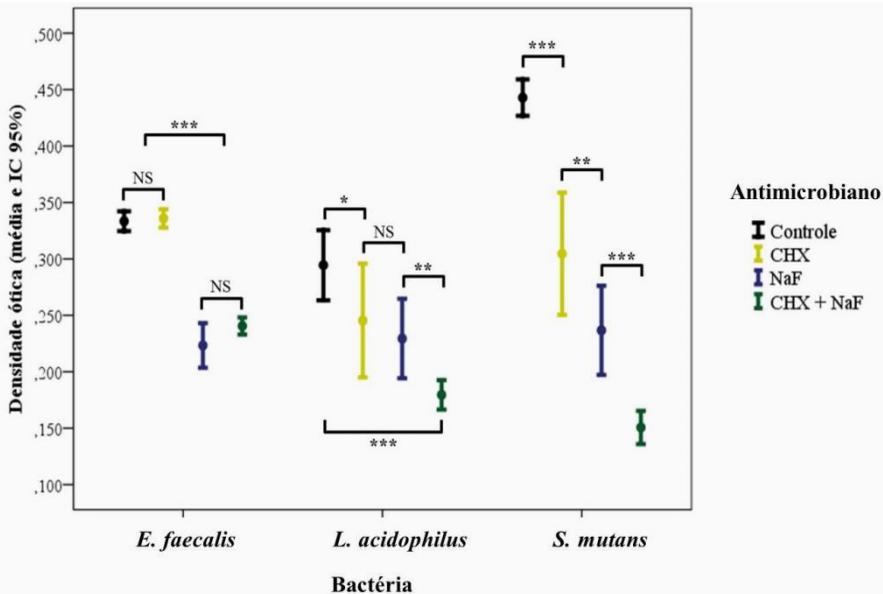


Gráfico 4. Densidade Óptica segundo o antimicrobiano utilizado e o tipo de bactéria. IC: Intervalo de confiança; NS: Não significante; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

A associação NaF-CHX proporcionou melhor efeito na inibição do crescimento das três bactérias ($p < 0,001$). Sendo o efeito superior a qualquer outra solução testada isoladamente.

Nas concentrações testadas isoladamente, o NaF foi superior a CHX em *S. mutans* ($p < 0,01$) e *E. faecalis* ($p < 0,001$). Em *L. acidophilus* não houve diferença estatisticamente

significativa entre as substâncias testadas. O *E. faecalis* mostrou-se mais resistente aos efeitos da CHX, visto que nas concentrações testadas isoladamente não houve efeito significativa da CHX em relação ao grupo controle, e ainda, não houve diferença entre o NaF-CHX e o NaF isoladamente.

DISCUSSÃO

Ação do ozônio

O único aparelho de ozônio comercialmente vendido para a odontologia testado nesse estudo, o HealOzone X4®, não apresentou qualquer efeito antimicrobiano em *S. mutans* nos tempos aferidos de 1-4 minutos.

Há inúmeras publicações que relatam o efeito antibacteriano do ozônio *in vivo* (Holmes 2003; Baysan & Lynch 2004) e *in vitro* (Baysan & Lynch 2004; Baysan & Lynch 2007; Lynch 2008; Seidler et al. 2008). Mas outros estudos relataram a incapacidade do gás ozônio em reduzir o número de bactérias (Rickard et al. 2004; Yip et al. 2007; Polydorou et al. 2012) que estão em conformidade com os resultados desta pesquisa quando foi utilizado o HealOzoneX4® em *S. mutans*. Além da ineficiência apresentada, durante a utilização do equipamento verificou-se que a pressão necessária para manter a vedação do bico de silicone à superfície a ser tratada era pequena tornando o procedimento difícil de ser realizado em condições laboratoriais controladas. O que nos leva a concluir que do ponto de vista clínico, a dificuldade na

obtenção de uma boa vedação em dentes decíduos cariados também prejudicaria na eficácia do gás de ozônio.

Por outro lado, quando foram utilizados os geradores de O₃ OL80A e OL80W, os resultados comprovam a sensibilidade do *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis* ao gás. Isto está em conformidade com outros estudos em *S. mutans* (Baysan & Lynch 2004; Castillo et al. 2008; Johansson et al. 2009), em *L. casei* (Johansson et al. 2009; Slot et al. 2011), e em *E. faecalis* (Hems et al. 2005; Fagrell et al. 2008). É pertinente ressaltar que ambos os geradores, OL80A e OL80W, produzem o gás dentro de câmaras, sendo que para atingir a concentração final desejada levaram cerca de 20 min (aproximadamente) somando mais 4 minutos em concentração alvo.

Para que o método que avalia morte bacteriana seja considerado eficiente, espera-se a redução de no mínimo 3 log₁₀ (99,9%) no número de bactérias detectadas (Thanomsub et al. 2002). Utilizando este parâmetro e padronizando a concentração inicial das três bactérias, foi observado mortes logarítmicas ≥ 3 log₁₀ em todas as condições testadas ocorreram, exceto em *L. acidophilus* e *E. faecalis* quando submetidas a aplicação de 2 ppm de ozônio. Isso sugere uma discreta resistência desses microrganismos ao gás, mas isso não altera os resultados, visto que os equipamentos disponíveis no mercado e os métodos que tem sido empregado e comprovado na literatura utilizam concentração de aproximadamente 2000 ppm de ozônio (Hems et al. 2005;

Polydorou et al. 2006; Johansson et al. 2009; Polydorou et al. 2012).

Quando o ozônio foi utilizado com concentração ≥ 20 ppm, os resultados apareceram promissores para os *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*, concordando com Johanson et al. (2009) que encontram resultados favoráveis tanto para *S. mutans* quanto para *L. acidophilus* após aplicação de O₃ por 60 segundos. Por outro lado, Polydorou et al., 2012, relataram resultados negativos para a aplicação do ozônio em *Lactobacillus* quando testado um gerador de ozônio comercialmente utilizado (2130C HealOzone-Kavo), os autores, testando aplicação de 2100 ppm por 60 segundos relataram sucesso para a inibição de crescimento de *S. mutans* por até 8 semanas, enquanto que *L. casei* apresentaram-se resistentes.

Neste estudo, o ozônio também apresentou efeito antibacteriano nos *E. faecalis*. Isso está de acordo com outro estudo que encontrou resultados semelhantes (Hems et al. 2005) ao testar o ozônio em forma líquida (bolhas de ozônio) o qual demonstrou que a solução teve efeito bactericida tanto para as *E. faecalis* planctônicas em superfície quanto suspensas em líquido. Nagayoshi et al. 2004, também demonstram sensibilidade dos *E. faecalis* ao ozônio, os autores examinaram *ex vivo*, o efeito da água ozonizada contra *E. faecalis* e *S. mutans* inoculadas em dentes bovinos, e ainda, verificaram a citotoxicidade em fibroblastos de ratos. Concluíram que a água ozonizada teve o efeito favorável e que apresenta baixa citotoxicidade.

Muller et al., 2007, publicaram um estudo onde relataram a ação do gás ozônio em um biofilme em dentes bovino formado por *A. naeslundii*, *V. dispar*, *F. nucleatum*, *S. sobrinus*, *S. oralis* e *C. albicans*. Foi utilizado o dispositivo gerador HealOzone 2130C. Eles relataram que a redução foi menor que $1 \log_{10}$ demonstrando a incapacidade nesta técnica em biofilmes. Iman et al. (2008) testaram o efeito da água ozonizada sobre biofilme formado por *E. faecalis* e *C. albicans*. Os autores relatam que o efeito da água ozonizada foi classificado como ineficiente. Estrela et al. (2007) relataram um estudo sobre o efeito da água ozonizada e o ozônio gasoso (PXZ3507; Eaglesat Tecnologia em Sistemas Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) em *E. faecalis* inoculadas em raízes de dentes humanos. Os autores concluíram que: "A irrigação com água ozonizada e a aplicação de ozônio gasoso por 20 minutos de canais radiculares infectados não foi suficiente para inativar as bactérias". Um fator diferencial destes estudos que relatam o insucesso quando comparado com a presente pesquisa, é principalmente o gerador de ozônio utilizado e a aplicação em biofilme.

É importante ressaltar que na presente investigação todas as bactérias foram testadas isoladamente (sem a formação de biofilme). A maioria dos microrganismos que crescem na natureza são encontrados unidos a alguma superfície, onde eles crescem e formam biofilmes (Marsh & Bradshaw 1995). Os biofilmes são matrizes de populações microbianas encaixadas umas as outras, aderidas entre elas e às superfícies, isso acontece especialmente na

cavidade oral onde existe umidade permanente (Bocci 2004; Wang et al. 2013). Uma propriedade do biofilme é a proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, isso é feito através da produção de polímeros extracelulares que forma uma matriz (Marsh & Bradshaw 1995). Trata-se de um fator fundamental para compreender o efeito de agentes antimicrobianos utilizados na cavidade oral, eles tem que ser capazes de alcançar as bactérias através do biofilme. Há evidência que as bactérias que vivem em biofilmes como placa dentária nas superfícies dos dentes são geralmente mais resistentes a agentes antimicrobianos que as bactérias em cultura normalmente utilizadas em estudos *in vitro* (César et al. 2012). A cultura de bactérias utilizadas neste estudo foi cultivada em meio isento de sacarose e, portanto as bactérias não podem secretar uma camada de glucano que permita a criação de uma biosfera protetora.

Além dos testes realizados com as três bactérias na superfície do ágar TSA, foi feito um experimento apenas com o *S. mutans* suspenso em líquido. Neste caso, 10 µL de 10⁶ *S. mutans* suspenso em caldo nutritivo foram inseridos em uma placa de petri vazia. Após a exposição da placa a 2000 ppm de ozônio o conteúdo restante foi suspenso em 10 µL de caldo nutritivo, em seguida foi incubado em câmara anaeróbica *overnight*. Após análise em densidade ótica observou-se 99,9% de morte (redução > 3log₁₀). Isto indica que o gás é capaz de matar bactérias quando se tem acesso ao microrganismo, resta testar em maiores volumes de líquido. Estes resultados podem explicar porque o HealOzone X4

não pode matar as bactérias, o ozônio gerado pelo aparelho não foi capaz de deslocar o ar de forma adequada nas placas de microtitulação para alcançar as concentrações bactericidas de ozônio na suspensão bacteriana alvo.

Os dados provenientes desta investigação, juntamente com outros estudos *in vitro* aqui citados, indicam que a utilização do gás ozônio pode ser uma alternativa em infecções causadas por *S. mutans*, *L. casei* e *E. faecalis*. Entretanto, existe a necessidade de desenvolver melhores geradores de ozônio apropriados para o uso odontológico clínico, realização de outros testes em biofilmes bacterianos e estudos clínicos com controles apropriados e adequado número amostral para a validação desta técnica.

Ação do NaF e CHX

Os resultados deste estudo mostram maior efeito antimicrobiano quando houve associação NaF-CHX tanto para *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*. O efeito foi melhor quando comparado as substância utilizadas isoladamente e também em relação ao grupo controle.

A clorexidina (CHX) é um dos agentes antimicrobianos orais mais utilizados para o qual estão disponíveis diferentes formulações (De Siena et al. 2012). A substância é conhecida por apresentar boa substantividade e, em concentrações elevadas (0,2% ou mais), é bactericida, provocando um dano letal para a membrana bacteriana, sendo ativa para ambas as bactérias gram-negativas e gram-positivas (Marsh 2010). A CHX como agente

antiplaca e anti-gengivite permanece como padrão ouro (Jones 1997), mas a sua utilização como um agente anticárie em especial em lesões já estabelecidas tem sido considerada como controversa, levando em consideração os achados clínicos inconclusivos (Schaeken et al. 1991; Lobo et al. 2008; Huang et al. 2013). Neste estudo, mesmo quando verificada isoladamente a CHX apresentou bons resultados no controle do crescimento bacteriano, comprovando, assim como outros autores, sua efetividade em reduzir o número de *S.mutans* (Emilson 1994; Emilson et al. 1999; Lobo et al. 2008), em *L. acidophilus* (Madléna et al. 2000) *E. Faecalis* (Wang et al. 2007).

O fluoreto (F^-) tem sido utilizado como um agente anticárie eficaz por muitas décadas. Além disso, há relatos de atividade antibacteriana direta contra bactérias cariogênicas (Baysan et al. 2001). Na presença de baixos pHs extracelulares, o F^- é transportado como ácido fluorídrico (HF) para o interior da célula bacteriana, onde, em seguida, dissocia-se em H^+ e F^- (Li & Bowden 1994). O excesso de acidificação do citoplasma também pode inibir o mecanismo de transporte da glicose para dentro da célula. Embora estes mecanismos tenham sido comprovados em cultura de células, ainda não há prova de que este efeito antimicrobiano do flúor contribui para a prevenção da cárie, nem tampouco em lesões já estabelecidas (ten Cate 1997; Buzalaf et al. 2011). Alguns autores são categóricos em afirmar que: "o fluoreto, geralmente não é bactericida" (Marquis et al. 2003). Neste estudo o flúor foi utilizado na forma de fluoreto de sódio (NaF). Nas condições

testadas, o NaF teve efeito antibacteriano satisfatório em todas as bactérias verificas.

Não há provas "conclusivas" para a eficácia do tratamento com fluoreto aplicado profissionalmente para reduzir velocidade de progressão ou reverter lesões cavitadas e não cavitadas. Da mesma forma, a evidência para a utilização de géis e vernizes de clorexidina ou a terapia de combinação foi classificado como "sugestivo mas incompleta" (Caufield et al. 2001).

Os dados obtidos nesse estudo sugerem que há um efeito aditivo quando existe a associação de NaF e CHX. Isso é claramente demonstrado pelo fato que sob as condições do estudo, ambas as substâncias apresentaram efeitos antimicrobianos isoladamente, mas demonstraram melhores resultados quando utilizadas em associação, em todas as bactérias testadas. Este dado corrobora com os achados relatados por (Pinar Erdem et al. 2012), que ao testaram *in vitro* o efeito da associação de Naf-CHX em *S. mutans* e *S. sobrinus*, encontram aumento significativo no efeito antimicrobiano das soluções. O benefício da associação é atribuído ao baixo peso molecular do fluoreto, que permite íon chegue a nichos de difícil acesso para a CHX, como no caso de cárie incipientes. Os autores relatam ainda, que o pH baixo presente nesses nichos pode ser alterado pela presença do F⁻, e portanto levar a um preventivo prolongado (McDermid et al. 1985). Além disso, concentrações extremamente elevadas de CHX não parecem ser necessárias para obter um efeito antimicrobiano duradouro sobre a colonização bacteriana em superfícies radiculares

(Ekenbäck et al. 2000). Portanto “com a exceção de um número limitado de agentes patogênicos, como por exemplo *S. mutans*, *L. casei* e *E. faecalis*, a maioria dos microrganismos orais indígenas são benignos ou benéficos, portanto a utilização de altas concentrações de qualquer substância antibacteriana pode se tornar prejudicial ao hospedeiro” (Marsh & Bradshaw 1995; He et al. 2009).

O efeito bactericida da associação NaF-CHX em *L. acidophilus* e *E. faecalis* demonstrado nesse estudo reforça a vantagem da associação das duas substâncias para o controle da progressão da cárie. Visto que outros estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram limitações a atividade antibacteriana do NaF em *L. acidophilus in vivo* (Kaneko et al. 2006; Peros et al. 2012) e da CHX em *E. faecalis in vitro* (Nair et al. 2005; Estrela et al. 2007).

Alguns autores relataram dificuldade em encontrar efeitos benéficos na associação dos dois fármacos devido à reduzida concentração dos agentes, o que levaria a uma dificuldade na ação antimicrobiana (Melo et al. 1999). Foi relatado ainda que a redução do volume e da concentração da CHX nas misturas leva a perda de substantividade da solução, o que poderia comprometer os potenciais locais de reservas do fármaco, tais como a língua, mucosa, amígdalas e na saliva, e isso levaria a um favorecimento da recolonização das lesões cariosas (de Freitas et al. 2003).

Os dados obtidos nessa pesquisa foram provenientes da análise da concentração inibitória mínima (CIM), este teste é usado para determinar a concentração mínima ou máxima necessária para

que uma substância seja capaz de exercer atividade bactericida ou bacteriostática. Portanto, as substâncias testadas foram diluídas até a concentração que não apresentassem atividade antimicrobiana, as concentrações escolhidas para serem testadas foram obtidas no estudo piloto dessa pesquisa. Ainda que ambas as substância apresentassem atividade antibacteriana isoladamente em todos os microrganismos testado, é inviável comparar os efeito do NaF *versus* CHX.

De forma geral a ideia de associar a NaF a CHX é usar uma medicação com alvo na membrana celular e um outro antimicrobiano, com um alvo intracelular. Portanto, esse estudo demonstrou que a combinação de antimicrobianos com diferentes mecanismos antibacterianos permite uma estratégia de tratamento mais eficaz contra agentes patogênicos relacionados à cárie severa da infância.

Limitações do estudo

Uma limitação do estudo é o método de ensaio testado e a utilização de bactérias planctônicas, que são mais vulneráveis do que as bactérias presentes em lesões de cárie onde são organizadas em biofilmes. O teste realizado com gás ozônio utilizou bactérias inoculadas em placa de petri enquanto que nos testes realizados com NaF e CHX foi realizado em placas de 96 poços de microtitulação. Os resultados deste ensaio podem ser sobrestimados considerando a vulnerabilidade das cepas testadas. No entanto, todos os materiais testados podem apresentar efeitos

antibacterianos, *in vivo*, o que pode ajudar no controle da progressão da cárie severa da infância.

CONCLUSÃO

As substâncias antibacterianas testadas foram capazes de inibir *S. mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*. A técnica da utilização de gás ozônio parece uma boa alternativa de controle de progressão de lesões cariosas em crianças, resta a elaboração de um gerador de ozônio adequado para ser utilizado clinicamente. A associação do NaF-CHX demonstrou ser um bom antibacteriano de fácil aplicação, formulação e aplicabilidade clínica mais rápida. Outras investigações devem ser efetuadas para confirmar estes resultados e desenvolver protocolos para a utilização de tais produtos para prevenir a progressão da cárie severa da infância.



6. Conclusão

6. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos dados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- 1- Há uma variação significativa no perfil da estrutura de comunidade bacteriana entre os dentes com lesão de cárie e os dentes hígidos.
- 2- A estrutura da comunidade bacteriana foi mais complexa em dentes cariados quando comparado com dentes hígidos.
- 3- Todas as substâncias antibacterianas testadas foram capazes de inibir *S.mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*.
- 4- A utilização de gás ozônio parece uma boa alternativa de controle de progressão de lesões cariosas em crianças, resta a elaboração de um gerador de ozônio adequado para ser utilizado clinicamente.
- 5- A associação do NaF-CHX demonstrou ser um bom antibacteriano de fácil aplicação, formulação e aplicabilidade clínica mais rápida.



7. Apêndice

APENDICE A – Metodologia expandida

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob o N° 2386/2011 (Anexo A).

Esta pesquisa foi dividida em duas fases:

- - 1° Fase (Clínica/Laboratorial): procedimentos realizados na Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brasil.
- - 2° Fase (Laboratorial): procedimentos realizados na Universidade da Carolina do Norte (UNC), NC, EUA.

1° FASE DA PESQUISA

Procedimentos clínicos e laboratoriais realizados na UFSC sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira

Seleção dos sujeitos

Foram coletadas amostras de 23 pacientes, de ambos os sexos, com idades entre 1 e 5 anos de idade, com lesões de cárie características de CSI. Os pacientes foram triados na clínica de odontopediatria do curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A seleção dos pacientes seguiram os seguintes critérios estabelecidos para a pesquisa:

Crêterios de inclusão

Para participar da pesquisa, os pais ou responsáveis dos pacientes foram devidamente informados sobre o estudo e concordaram com o atendimento, por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B), de acordo com a resolu o 196/96.

Os pacientes selecionados estavam saudáveis e sem a utiliza o de antibióticos nos últimos 3 meses antes da coleta do biofilme. Das crianças selecionadas, foram escolhidos aleatoriamente dentes decíduos incisivos e caninos superiores hígidos, com lesão de cárie em esmalte ou em dentina. O diagnóstico de CSI foi dado através dos achados clínicos (lesão de cárie em mais de um dente superior e anterior) juntamente com as informa es da anamnese em rela o a hábitos alimentares e de higiene. Todos os dados do paciente e da coleta foram anotados em uma ficha clínica elaborada exclusivamente com essa finalidade e foram mantidos em sigilo absoluto (Anexo C).

Os participantes do estudo além de receberem os procedimentos realizados em fun o do estudo, foram encaminhados para o tratamento complementar na clínica de odontopediatria do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Crêterios de exclusão

Foram excluídos da amostra pacientes com histórico de uso de antibiótico nos últimos 3 meses antes da consulta, pacientes em tratamento odontológico e aqueles que estavam fazendo uso de algum antimicrobiano t pico oral.

Coleta de amostra

Foram coletadas amostras de biofilme bacteriano de um total de 45 dentes, sendo 10 dentes hígidos (G1), 15 com lesões de esmalte (G2), e 15 com lesões de dentina (G3).

Primeiramente foi realizada a desinfecção da gengiva em torno dos dentes selecionados através da aplicação de uma camada de digluconato de clorexidina a 1% (Vita Farma, Florianópolis, SC, Brasil) por 1 minuto (Ruvière et al. 2007) (Figura 1A). Em seguida, foi feito o isolamento relativo da área selecionada com rolo de algodão estéril (Johnson & Johnson, Brasil) (Figura 1B). Com auxílio de microaplicadores Cavibrush® esterilizados (três para cada dente) foram coletadas amostras do biofilme bacteriano presentes nas lesões de cárie e na superfície do dente hígido (técnica do *Swab*) (Figura 1C). Depois, a ponta dos microaplicadores foi cortada com tesoura estéril e transferida individualmente para tubos de 1,5 mL contendo 1,0 mL de água Milli-Q® estéril (Figura 1D). O material foi transportado sob refrigeração para o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da UFSC no prazo máximo de 2 horas, onde os procedimentos de extração de DNA metagenômico foram realizados imediatamente.

Extração do DNA metagenômico

O material coletado foi submetido à agitação em vortex por 1 minuto (Figura 2), em seguida as pontas do microaplicador presentes no interior do microtubo foram friccionadas na parede do mesmo para que houvesse uma maior transferência do material biológico

coletado para o meio (Figura 3). Os microaplicadores foram removidos e o material centrifugado a 13.000 g por 12 minutos (Figura 4), após esse procedimento foi possível observar a formação do pélete (material biológico no interior do tubo) (Figura 4B). Em seguida, foram removidos 450 μL de sobrenadante observando com cuidado para manter o pélete de cada tubo, após isso, foram realizadas movimentações com as pontas de micropipeta para resuspende o pélete com os 50 μL restantes. Foram então transferidos e ressuspensos os líquidos provenientes dos 3 tubos de coleta de cada dente para um novo tubo, formando assim uma amostra composta, e novamente foram submetidos a centrifugação de 13.000 g por 12 minutos.

Após esses procedimentos iniciais foi adicionado 600 μL de solução tampão de CTAB (NaCl 0,7 M, CTAB 1 %, Tris pH 8,0 50 mM, EDTA 10 mM) + β -betamercaptoetanol a 0,2 %, os tubos foram agitados levemente em vortex , em seguida as amostras foram incubadas a 65 °C por 60 min (Figuras 5), agitando-se os tubos a cada 10 minutos. Seguindo os procedimentos de incubação, foram adicionados 600 μL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1). O material foi então centrifugado a 13.000 g por 10 min e depois foram removidos 500 μL de sobrenadante.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 500 μL de etanol 100 %. Esse material foi incubado a -20 °C por 60 minutos para precipitação do DNA. Após esse período o material foi centrifugado novamente a 13.000 g por 12 min, e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500 μL de etanol 90 % ao pélete e após 5 min as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto emborcado em toalha de papel para a completa

evaporação do álcool (Figura 6). Foram adicionados 50 µL de água milli-Q estéril e armazenado em freezer a -20°C (Boyce et al. 1989).

A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel com 1 % de agarose, corado com SYBR Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil), utilizando-se o tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), e submetido à eletroforese horizontal por uma hora a 60 V (Figuras 7 A, B e C). A quantificação e a pureza do DNA foi avaliada em espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

Eletroforese em gel com gradiente desnaturante- DGGE

A análise da estrutura das comunidades bacterianas das amostras de biofilme bacteriana foi feita por PCR-DGGE. A região V3 do gene rDNA 16S de bactéria foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (Ovreås et al. 1997). A amplificação do gene rDNA 16S foi feita em solução tampão para Taq DNA polimerase, contendo 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 nG do DNA metagenômico. As condições de amplificação da PCR foram 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C e extensão final por 10 min a 72 °C. O DNA foi examinado e quantificado conforme descrito anteriormente.

Quantidades iguais de amplicons (300 nG) foram analisadas por PCR-DGGE utilizando 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida

(37,5:1, m:m), contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (Ovreås et al. 1997). A eletroforese foi realizada a 200 V e 60°C constantes, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão TAE 1X. O DNA foi corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos géis foi feita em fotodocumentador Gel Logic 200 Imaging System (Carestream Health, New York, USA).

Comparação da estrutura das comunidades bacterianas

A estrutura das comunidades das amostras de biofilme bacteriano foram analisados com o programa *Gel Compar II* (BioSystematica, Wales, UK), a partir da análise agrupamento hierárquico, utilizando coeficiente de *Jaccard*, e o modelo de agrupamento por UPGMA.

Os perfis de amplicons também foram comparados em um espaço de ordenação em escala multidimensional (MDS), através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray Curtis para avaliar a distância entre as amostras, comparando as distâncias com as respectivas (di)similaridades. A relação entre estas duas medidas foi avaliada por regressão linear, sendo a confiabilidade da regressão representada pelo “stress”. Para discriminar os grupos foram testadas as diferenças entre o valor médio de similaridade entre as amostras (rank) dentro dos grupos e entre os grupos, a partir da análise de similaridade (ANOSIM), a qual calcula um valor R com base na comparação dos grupos, sendo o R recalculado com base em permutações, permitindo determinar diferenças estatísticas entre os perfis de bandas da PCR-DGGE.

2º FASE DA PESQUISA

Procedimentos laboratoriais realizados na UNC

A segunda parte da pesquisa foi realizada em parceria com a Universidade da Carolina do Norte (UNC) sob a co-orientação do Prof. Dr. Luiz André Pimenta e do Prof. Dr. Roland Arnold.

Cultivo das bactérias testadas

Foram cultivadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 10449, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Enterococos faecalis* V583. As culturas de estoque foram armazenadas em alíquotas em leite desnatado a -80°C. Os inóculos a partir dessas culturas foram cultivados em caldo TSB (Tryptic soy broth, Difco® Laboratories), em uma atmosfera de 5% CO₂/10% H₂/85% N₂ (câmara de anaerobiose Coy, Coy Laboratory Products Inc , Ann Arbor, MI, EUA).

Para a verificação da pureza das bactérias, uma alíquota de cada bactéria foi submetida à coloração pela a técnica de Gram e em seguida foram analisadas em microscópio (100x). As bactérias também foram cultivadas *overnight* em placas de ágar de sangue de ovelha TSA/SB (Trypticase™ Soy Agar with 5% Sheep Blood) para a análise da morfologia de colônias, esse teste serviu também para confirmar a pureza dos microrganismos (Figura 8).

Inóculos de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococos faecallis* foram transferidos para 10 mL de caldo nutritivo TSB e incubou-se a 37°C sob condições anaeróbicas. Ao

longo dos experimentos as suspensões bacterianas foram preparadas utilizando o 0,5 padrão de MacFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL).

Geradores ozônio

O gerador de ozônio utilizado para este estudo foi o Healozone X4 ® (Kavo, Biberach / Riss, Alemanha) (Figura 9). O dispositivo foi projetado para gerar o gás ozônio usando o oxigênio atmosférico ou com oxigênio suplementar utilizando um tanque de oxigênio conectado ao aparelho para produzir maior concentração de ozônio. De acordo com o fabricante, a concentração de ozônio gerado é de 2100 ppm, de $\pm 10\%$, gerando $65\mu\text{mL}$ de gás/min. O tempo de exposição pode ser definido de 5 a 60 seg. O ozônio é entregue através de uma peça de mão equipada com pontas de silicone descartáveis de tamanhos variáveis. Para que haja a produção do gás, a ponta de silicone deve selar completamente a superfície, caso contrário, o dispositivo deixa de funcionar. Após o tempo de exposição, há um vácuo / ciclo de lavagem de dois segundos para eliminar qualquer ozônio restante no sistema, evitando assim a fuga de ozônio para a atmosfera como demonstrado no esquema (Figura 9).

O gerador de ozônio OL80A (Ozone Services, Yanco Indústrias, Burton, Estados Unidos) (Figura 10) foi utilizado para expor as bactérias a concentração de ozônio de 2 e 20 ppm; e o gerador OL80W (Ozone Services, Yanco Indústrias, Burton, Estados Unidos) (Figura 11) foi utilizado para expor as bactérias a concentrações de ozônio de 200 e 2000 ppm, ambos equipamentos são provenientes do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Escola de Saúde Pública- Universidade da Carolina do Norte (UNC).

A ação do Healozone X4® em *S. Mutans*

A eficácia do HealOzone X4® foi testada em bactérias suspensas em líquido, e foi testada apenas em *S. mutans*. Uma placa de microtitulação de 96 poços foi utilizada para receber 10µL de 10⁶ UFC / mL de *S. mutans* a serem tratados com O₃ utilizando a capacidade máxima de produção de O₃ do equipamento (aproximadamente 2100 ppm). Os controles negativos consistiram de dois grupos de 200 µL de meio TSB sem bactérias, um grupo foi tratado durante 1 min, e o outro foi deixado sem tratamento. O controle positivo foi de 10µL da cultura de bactéria sem tratamento. Cada grupo foi formado por 4 poços (Figura 12). Sendo que os grupos experimentais receberam o tratamento de O₃ em 1, 2, 3 e 4 minutos.

Após o tratamento, os 10 µL de bactérias foram novamente re-suspensas em 200 µL de TSB e incubados numa câmara anaeróbica a 37 °C. As densidades ópticas (λ610 nM) das amostras em quadriplicata foram determinados após 18 horas, utilizando um leitor de microplacas Vmax kinetic /SoftMaz Pro 3.1 (Sunnyvale, Califórnia, Estado Unidos). Os dados foram expressos como mOD (Mean Optical Density) e as médias e desvios padrão foram determinados em poços replicados. Cada experimento foi repetido de forma independente, pelo menos, três vezes.

O efeito do ozônio em *S. Mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*

Baseado nos dados obtidos nos estudos iniciais onde os resultados apontaram que o HealOzone X4® foi ineficiente na inibição do crescimento de *S. mutans* a uma concentração de 2100 ppm sob as condições testadas, com tempos de aplicação de 1-4 minutos, optou-se por determinar se as bactérias *S. Mutans*, *L. acidophilus*, *E. faecalis* são, na verdade, susceptível a ação do gás ozônio utilizando outra equipamento como fonte de gás ozônio. Para este experimento foram utilizados os geradores de ozônio OL80W e OL80A (Ozone Services, Yanco Indústrias, Burton, Estados Unidos).

Para determinar a atividade bactericida de ozônio, foi realizada a cultura *overnight* (início da fase exponencial) de *S. Mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*. Após o início da fase exponencial, as mesmas foram ajustadas em suspensão de 10^8 UFC / mL (Padrão 0,5 de MacFarland). Em seguida foram realizadas diluições logarítmicas das bactérias variando a concentrações de 10^8 - 10^0 UFC/mL, confeccionando assim uma titulação das bactérias.

Para aperfeiçoar a aplicação do gás, 10 μ L de cada concentração das bactérias foram colocados na forma de gotas sobre a superfície de placas de ágar TSA/SB. Foram preparadas 5 placas sendo elas:

- Placa controle, sem aplicação de nenhum microrganismo.
- Placa inoculada sem exposição ao gás ozônio.
- Placa inoculada exposta a 2 ppm de gás ozônio por 4 minutos.
- Placa inoculada exposta a 20 ppm de gás ozônio por 4 minutos.
- Placa inoculada exposta a 200 ppm de gás ozônio por 4 minutos.

- Placa inoculada exposta a 2000 ppm de gás ozônio por 4 minutos.

Após os tratamentos as placas foram incubadas numa câmara anaeróbica (10% de H₂ - 5% de CO₂ - 85% de N₂) a 37 °C durante 18 horas para permitir o desenvolvimento da UFC (unidade formadora de colônia). Após este período, o número de colônia de cada bactéria nas diferentes concentrações testadas foi calculado utilizando a placa controle (sem tratamento) como padrão através da titulação das concentrações das bactérias (10⁸-10⁰) (Figura 13). O experimento foi repetido em duas ocasiões independentes.

O efeito da associação de clorexidina com flúor em *S. Mutans*, *L. acidophilus* e *E. faecalis*

Para este experimento a metodologia empregada foi a da concentração inibitória mínima (CIM), que pode ser definida como a menor concentração em que uma substância irá inibir o crescimento de um organismo após incubação (Andrews 2001).

As substâncias testadas foram clorexidina 0,12% (Peridex®, 3M,WA, Estados Unidos) e o fluoreto de sódio 5% (J.T Baker, Center Valley, PA, Estados Unidos) (Figura 14 A, B). Em estudo piloto foi observado que tais concentrações das substâncias foram capazes de inibir completamente o crescimento bacteriano sob as condições testadas, portanto optou-se por diluir essas concentrações até um nível que não houvesse inibição do crescimento bacteriano quando essas substâncias fossem testadas separadamente. Portanto as seguintes concentrações (%) de cada substâncias foi preparada:

- - **Clorexidina (CHX)**: 0,0004/ 0,0002 / 0,0001 /0,00005 / 0,000025 / 0,000012 / 0,00006
- - **Fluoreto de Sódio (NaF)**: 5 / 2,5 /1,25/ 0,625/ 0,31/ 0,15/ 0,07/ 0,03

Todas essas concentrações de substâncias foram testadas separadamente e em conjunto através do método de mistura conhecido como *Checkboard*.

Cepas bacterianas e meios de crescimento

Para este estudo, foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 10449, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, e *Enterococcus faecalis* V583. As cepas foram cultivadas em TSB (Tryptic soy broth, Difco® Laboratories). O método utilizado para o preparo da concentração do inóculo foi através da comparação com o padrão 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/ml).

Preparação das microplacas de cultura

Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo com vidrarias, ponteiras e meios de cultura previamente esterilizados em autoclave. As placas esterilizadas com 96 poços foram preparadas de forma que cada poço continha um volume final de 220 μ L. Na placa, as colunas foram distribuídas em números de 1 a 12 (concentração de NaF) e as linhas em letras “A” até “H” (concentração de CHX) (Figura 15).

Composição dos poços:

- - Poços experimentais: 150 μL TSB, 20 μL de cada bactéria 10^6UFC/ml , 25 μL CHX e 25 μL NaF.
- - Poços controle bactéria: 150 μL TSB, 20 μL de cada bactéria 10^6UFC/ml , 50 μL água destilada esterilizada.
- - Poços controle meio TSB: 150 μL TSB + 70 μL água destilada esterilizada.

Após o preparo das microplacas, a densidade ótica ($\lambda 610\text{ nm}$) das amostras foi verificada (T=0 horas), utilizando o leitor de microplacas Vmax kinetic /SoftMaz Pro 3.1 (Sunnyvale, Califórnia, Estado Unidos) (Figura 16). Em seguida as amostras foram incubadas em estufa a 37°C .

Análise da densidade ótica das placas

Foi verificada a densidade ótica de cada placa nos tempos: 12 horas, 14 horas, 16 horas e 18 horas. Após cada aferição as placas foram colocadas de volta na estufa a 37°C , até o final do experimento. Esse estudo foi realizado em triplicata por um único operador.

7.1- LISTA DE FIGURAS

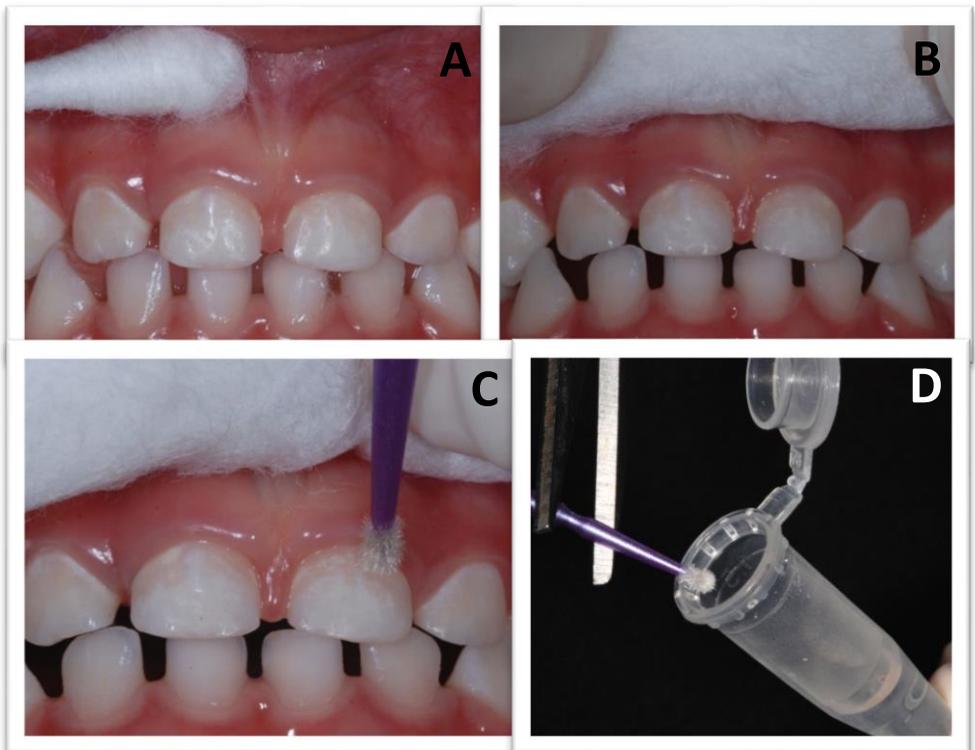


Figura 1: Coleta das amostras de biofilme bacteriano

A- Desinfecção com digluconato de clorexidina 1%

B- Isolamento relativo

C- Coleta do biofilme bacteriano

D- Corte dos microaplicadores e inserção em tubos de 1,5 mL



Figura 2. Agitação no vortex por 1 minuto



Figura 3. Fricção da ponta dos microaplicadores na parede do tubo



Figura 4. Formação do pélete no fundo do tubo de 1,5 mL

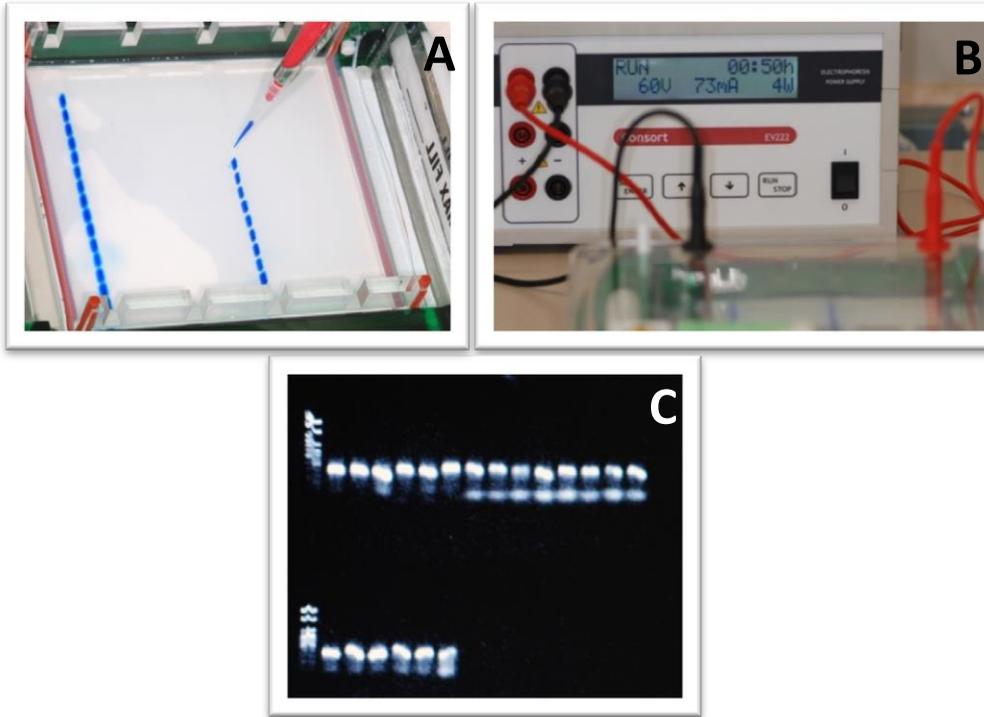


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência da amplificação do gene rDNA 16S

A: Aplicação do DNA no gel de agarose

B: Equipamento de Eletroforese à 60 V

C: Resultado da eletroforese no fotodocumentador



Figura 8 – Bactéria cultivada *overnight* em placa de ágar sangue

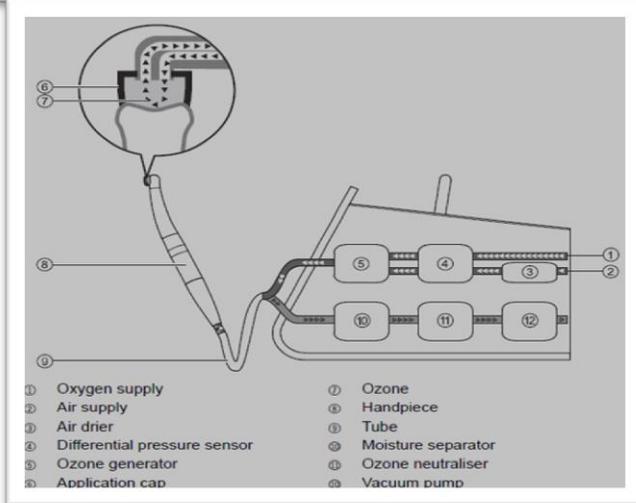


Figura 9- Gerador de ozônio Healozone X4 ® e esquema de funcionamento



Figura 10- Gerador de ozônio OL80 A

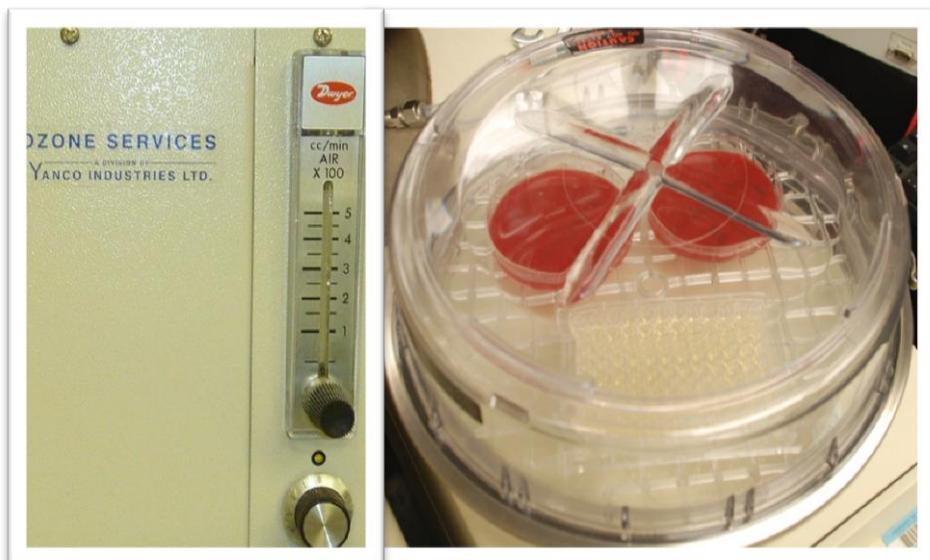


Figura 11- Gerador de ozônio OL80 W

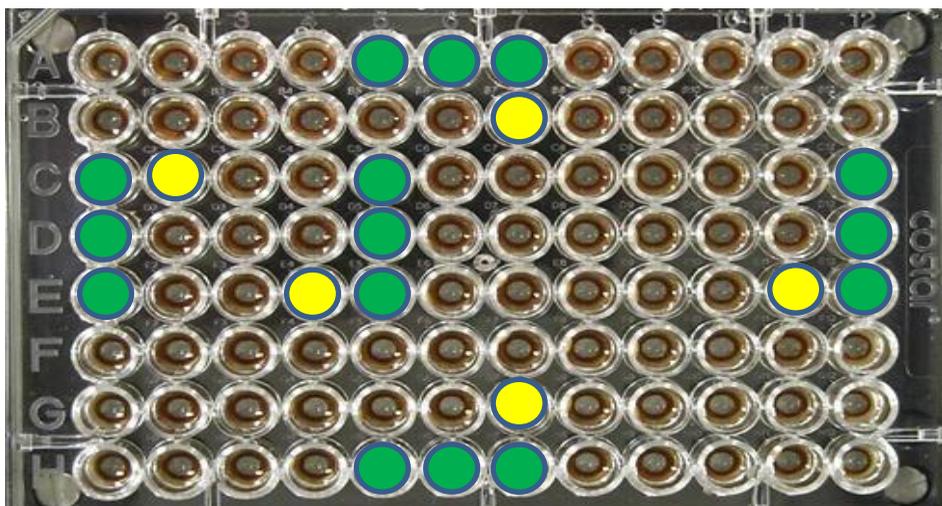


Figura 12- Esquema de inoculação de bactérias na placa de 96 poços



Figura 13- Placa de Ágar inoculada com titulação das três bactérias testadas

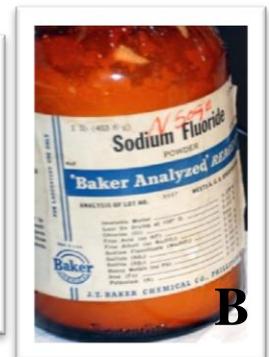
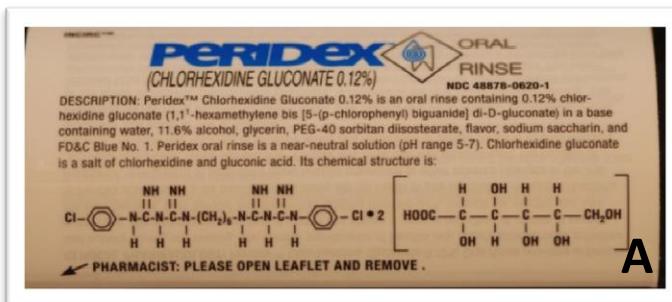


Figura 14-A: Clorexidina 0,12%

B: Fluoreto de sódio 5%

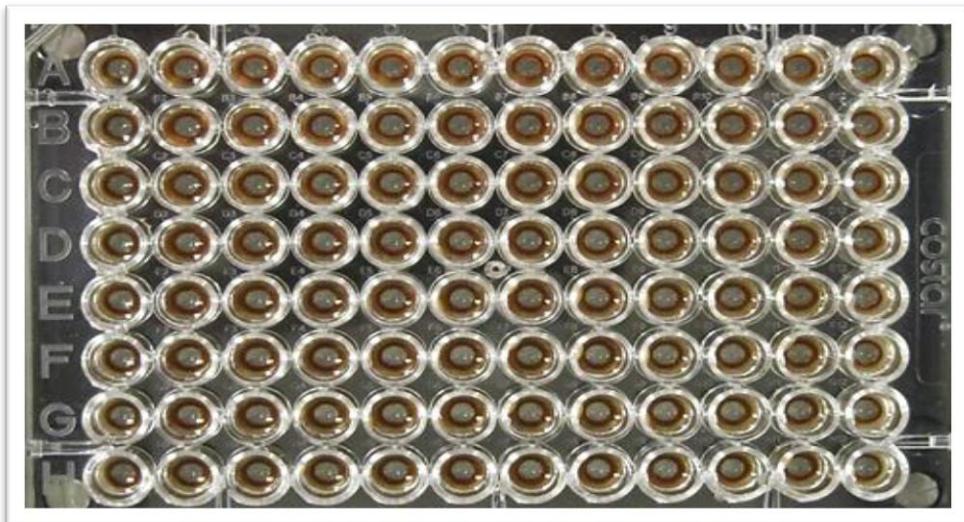


Figura 15- Placa de 96 poços utilizada para verificação da concentração inibitória mínima



Figura 16- Leitor de microplacas Vmax kinetic /SoftMaz Pro 3.1



REFERÊNCIAS

- Aas, J. a et al., 2008. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), pp.1407–17.
- Aas, J.A. et al., 2005. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. , 43(11), pp.5721–5732.
- Abanto, J. et al., 2011. Impact of oral diseases and disorders on oral health-related quality of life of preschool children. *Community dentistry and oral epidemiology*, 39(2), pp.105–14.
- Agnelli, A. et al., 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(5), pp.859–868.
- Amann, R. & Ludwig, W., 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS microbiology reviews*, 24(5), pp.555–65.
- American Academy on Pediatric Dentistry, 2009. Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. *Pediatric dentistry*, 30(7 Suppl), pp.40–3.
- Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48 Suppl 1, pp.5–16.
- Assis, F., 2013. ASSISTAT 7.6.
- Azarpazhooh, A. & Limeback, H., 2008. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *Journal of dentistry*, 36(2), pp.104–16.
- Baca, P. et al., 2002. Effectiveness of chlorhexidine-thymol varnish for caries reduction in permanent first molars of 6-7-year-old children: 24-month clinical trial. *Community dentistry and oral epidemiology*, 30(5), pp.363–8.
- Balakrishnan, M., Simmonds, R.S. & Tagg, J.R., 2000. Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian dental journal*, 45(4), pp.235–45.
- Baysan, A. et al., 2001. Reversal of primary root caries using dentifrices containing 5,000 and 1,100 ppm fluoride. *Caries research*, 35(1), pp.41–6.

- Baysan, A. & Lynch, E., 2007. Clinical reversal of root caries using ozone: 6-month results. *American journal of dentistry*, 20(4), pp.203–8.
- Baysan, A. & Lynch, E., 2004. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *American journal of dentistry*, 17(1), pp.56–60.
- Becker, M.R. et al., 2002. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. , 40(3), pp.1001–1009.
- Beighton, D., 2005. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community dentistry and oral epidemiology*, 33(4), pp.248–55.
- Bocci, V., 2004. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of inflammation*, 13(1), pp.3–11.
- Bönecker, M., Marcenes, W. & Sheiham, A., 2002. Caries reductions between 1995, 1997 and 1999 in preschool children in Diadema, Brazil. *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children*, 12(3), pp.183–8.
- Boyce, T.M., Zwick, M.E. & Aquadro, C.F., 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. *Genetics*, 123(4), pp.825–36.
- Bradshaw, D.J. & Marsh, P.D., 1998. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. *Caries research*, 32(6), pp.456–62.
- Buzalaf, M.A.R. et al., 2011. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monographs in oral science*, 22, pp.97–114.
- Castillo, A. et al., 2008. In vitro reduction of mutans streptococci by means of ozone gas application. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, 39(10), pp.827–31.
- Ten Cate, J.M., 1997. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *European journal of oral sciences*, 105(5 Pt 2), pp.461–5.
- Caufield, P.W., Dasanayake, a P. & Li, Y., 2001. The antimicrobial approach to caries management. *Journal of dental education*, 65(10), pp.1091–5.

- César, J. et al., 2012. Antimicrobial effects of ozonated water on the sanitization of dental instruments contaminated with *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, or the spores of *B. atrophaeus*. *Journal of infection and public health*, 5(4), pp.269–74.
- Chadwick, B. & Hosey, M., 2007. *Child taming. How to manage children in dental practice*, London: Quintessence.
- Clark, J., 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Brit J Exp Pathol*, 5(1), pp.141–7.
- Conrads, G., 2002. DNA probes and primers in dental practice. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 35(Suppl 1), pp.S72–7.
- Cury, J.A. et al., 2004. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Brazilian dental journal*, 15(3), pp.167–74.
- Dewhirst, F.E. et al., 2010. The human oral microbiome. *Journal of bacteriology*, 192(19), pp.5002–17.
- Do, T., Devine, D. & Marsh, P.D., 2013. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, cosmetic and investigational dentistry*, 5, pp.11–9.
- Drury, T.F. et al., 1999. Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. A report of a workshop sponsored by the National Institute of Dental and Craniofacial Research, the Health Resources and Services Administration, and the Health Care Financing Administ. *Journal of public health dentistry*, 59(3), pp.192–7.
- Du, M. et al., 2012. Randomized controlled trial on fluoride varnish application for treatment of white spot lesion after fixed orthodontic treatment. *Clinical oral investigations*, 16(2), pp.463–8.
- Ekenbäck, S.B., Linder, L.E. & Lönnies, H., 2000. Effect of four dental varnishes on the colonization of cariogenic bacteria on exposed sound root surfaces. *Caries research*, 34(1), pp.70–4.
- Emilson, C.G., 1994. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *Journal of dental research*, 73(3), pp.682–91.

- Emilson, C.G., Gisselsson, H. & Birkhed, D., 1999. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *European journal of oral sciences*, 107(3), pp.170–5.
- Estrela, C. et al., 2007. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *International endodontic journal*, 40(2), pp.85–93.
- Fagrell, T.G. et al., 2008. Effect of ozone treatment on different cariogenic microorganisms in vitro. *Swedish dental journal*, 32(3), pp.139–47.
- Fardal, O. & Turnbull, R.S., 1986. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 112(6), pp.863–9.
- Featherstone, J.D., 1999. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community dentistry and oral epidemiology*, 27(1), pp.31–40.
- Featherstone, J.D., 2000. The science and practice of caries prevention. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 131(7), pp.887–99.
- Featherstone, J.D. & Doméjean, S., 2012. The role of remineralizing and anticaries agents in caries management. *Advances in dental research*, 24(2), pp.28–31.
- Featherstone, J.D.B., 2006. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMC oral health*, 6 Suppl 1, p.S8.
- Ferreira, J.M.S. et al., Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions: a randomized clinical trial. *Brazilian oral research*, 23(4), pp.446–51.
- De Freitas, C.S. et al., 2003. Evaluation of the substantivity of chlorhexidine in association with sodium fluoride in vitro. *Pesquisa odontológica brasileira = Brazilian oral research*, 17(1), pp.78–81.
- Greenstein, G., Berman, C. & Jaffin, R., 1986. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*, 57(6), pp.370–7.
- Hayes, M.L., Carter, E.C. & Griffiths, S.J., 1983. The acidogenic microbial composition of dental plaque from caries-free and caries-prone people. *Archives of oral biology*, 28(5), pp.381–6.

- Hayes, V.M. et al., 1999. Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, 27(20), p.e29.
- He, X. et al., 2009. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. *Advances in dental research*, 21(1), pp.53–6.
- Head, I., Saunders, J. & Pickup, R., 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbial ecology*, 35(1), pp.1–21.
- Hems, R.S. et al., 2005. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal*, 38(1), pp.22–9.
- Hildebrandt, G.H. & Sparks, B.S., 2000. Maintaining mutans streptococci suppression with xylitol chewing gum. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 131(7), pp.909–16.
- Hiyari, S. & Bennett, K.M., 2011. Dental diagnostics: molecular analysis of oral biofilms. *Journal of dental hygiene : JDH / American Dental Hygienists' Association*, 85(4), pp.256–63.
- Holmes, J., 2003. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology*, 20(2), pp.106–14.
- Hoshino, T. et al., 2004. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using gtf genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 48(3), pp.195–9.
- Van Houte, J., 1994. Role of micro-organisms in caries etiology. *Journal of dental research*, 73(3), pp.672–81.
- Huang, G.J. et al., 2013. Effectiveness of MI Paste Plus and PreviDent fluoride varnish for treatment of white spot lesions: a randomized controlled trial. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*, 143(1), pp.31–41.
- Igarashi, T., Yamamoto, A. & Goto, N., 1996. Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase

- chain reaction. *Oral microbiology and immunology*, 11(5), pp.294–8.
- Jiang, W. et al., 2011. Investigation of supragingival plaque microbiota in different caries status of Chinese preschool children by denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbial ecology*, 61(2), pp.342–52.
- Johansson, E., Claesson, R. & van Dijken, J.W. V, 2009. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *Journal of dentistry*, 37(6), pp.449–53.
- Joharji, R.M. & Adenubi, J.O., 2001. Prevention of pit and fissure caries using an antimicrobial varnish: 9 month clinical evaluation. *Journal of dentistry*, 29(4), pp.247–54.
- Jones, C.G., 1997. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology 2000*, 15, pp.55–62.
- Jose, B. & King, N.M., 2003. Early childhood caries lesions in preschool children in Kerala, India. *Pediatric dentistry*, 25(6), pp.594–600.
- Kaneko, N. et al., 2006. Influence of a fluoride mouthrinse on mutans streptococci in schoolchildren. *Caries research*, 40(6), pp.501–7.
- Keyes, P.H., 1960. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Archives of oral biology*, 1, pp.304–20.
- Kirk, J.L. et al., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods*, 58(2), pp.169–88.
- Li, Y. et al., 2007. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *Journal of clinical microbiology*, 45(1), pp.81–7.
- Li, Y.H. & Bowden, G.H., 1994. The effect of environmental pH and fluoride from the substratum on the development of biofilms of selected oral bacteria. *Journal of dental research*, 73(10), pp.1615–26.
- Ling, Z. et al., 2010. Analysis of oral microbiota in children with dental caries by PCR-DGGE and barcoded pyrosequencing. *Microbial ecology*, 60(3), pp.677–90.
- Livny, A., Assali, R. & Sgan-Cohen, H.D., 2007. Early Childhood Caries among a Bedouin community residing in the eastern outskirts of Jerusalem. *BMC public health*, 7, p.167.

- Lobo, P.L.D. et al., 2008. Sodium fluoride and chlorhexidine effect in the inhibition of mutans streptococci in children with dental caries: a randomized, double-blind clinical trial. *Oral microbiology and immunology*, 23(6), pp.486–91.
- Losso, E.M. et al., 2009. Severe early childhood caries: an integral approach. *Jornal de Pediatria*, 85(4), pp.295–300.
- Van Loveren, C., 1990. The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition. *Journal of dental research*, 69 Spec No, pp.676–81; discussion 682–3.
- Ludwig, W. & Schleifer, K.H., 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS microbiology reviews*, 15(2-3), pp.155–73.
- Lynch, E., 2008. Evidence-based caries reversal using ozone. *Journal of esthetic and restorative dentistry : official publication of the American Academy of Esthetic Dentistry ... [et al.]*, 20(4), pp.218–22.
- Madléna, M. et al., 2000. Effect of chlorhexidine varnish on bacterial levels in plaque and saliva during orthodontic treatment. *The Journal of clinical dentistry*, 11(2), pp.42–6.
- Malik, S. et al., 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment international*, 34(2), pp.265–76.
- Margolis, H.C., Moreno, E.C. & Murphy, B.J., 1985. Importance of high pKA acids in cariogenic potential of plaque. *Journal of dental research*, 64(5), pp.786–92.
- Marinho, V.C.C. et al., 2003. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, (4), p.CD002782.
- Marquis, R.E., Clock, S.A. & Mota-Meira, M., 2003. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS microbiology reviews*, 26(5), pp.493–510.
- Marsh, P.D., 2010. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of dentistry*, 38 Suppl 1, pp.S11–5.
- Marsh, P.D. & Bradshaw, D.J., 1995. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*, 15(3), pp.169–75.
- Marthaler, T.M., O'Mullane, D.M. & Vrbic, V., 1996. The prevalence of dental caries in Europe 1990-1995. ORCA

- Saturday afternoon symposium 1995. *Caries research*, 30(4), pp.237–55.
- McDermid, A.S. et al., 1985. Additive inhibitory effects of combinations of fluoride and chlorhexidine on acid production by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Caries research*, 19(1), pp.64–71.
- Melo, G. et al., 1999. Potencial de eficácia da associação de clorexidina com flúor. *Revista do CROMG*, 5, pp.43–6.
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 2(3), pp.317–22.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), pp.695–700.
- Nagayoshi, M., Kitamura, C., et al., 2004. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of endodontics*, 30(11), pp.778–81.
- Nagayoshi, M., Fukuizumi, T., et al., 2004. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral microbiology and immunology*, 19(4), pp.240–6.
- Nair, P.N.R. et al., 2005. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 99(2), pp.231–52.
- Oliveira, L.B., Sheiham, A. & Bönecker, M., 2008. Exploring the association of dental caries with social factors and nutritional status in Brazilian preschool children. *European journal of oral sciences*, 116(1), pp.37–43.
- Orhan, A.I. et al., 2008. A clinical and microbiological comparative study of deep carious lesion treatment in deciduous and young permanent molars. *Clinical oral investigations*, 12(4), pp.369–78.
- Ovreås, L. et al., 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments

- coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 63(9), pp.3367–73.
- Paster, B.J. et al., 2001. Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque. , 183(12), pp.3770–3783.
- Paster, B.J. et al., 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42, pp.80–7.
- Peros, K. et al., 2012. Antimicrobial effect of different brushing frequencies with fluoride toothpaste on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in children with fixed orthodontic appliances. *Korean journal of orthodontics*, 42(5), pp.263–9.
- Pinar Erdem, A. et al., 2012. Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation in vitro. *International journal of medical sciences*, 9(2), pp.129–36.
- Polydorou, O. et al., 2012. The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of in vitro evaluation. *Clinical oral investigations*, 16(2), pp.545–50.
- Polydorou, O., Pelz, K. & Hahn, P., 2006. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *European journal of oral sciences*, 114(4), pp.349–53.
- Puig Silla, M., Montiel Company, J.M. & Almerich Silla, J.M., 2008. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 13(4), pp.E257–60.
- Rethman, M.P. et al., 2011. Nonfluoride caries-preventive agents: executive summary of evidence-based clinical recommendations. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 142(9), pp.1065–1071.
- Reyes, C.P.A. & Dalmacio, L.M.M., 2012. Bacterial Diversity in the Saliva and Plaque of Caries-free and Caries-active Filipino Adults. , 141(December), pp.217–227.
- Rickard, G.D. et al., 2004. Ozone therapy for the treatment of dental caries. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*, (3), p.CD004153.
- Ruvière, D.B. et al., 2007. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA

- hybridization. *Journal of dentistry for children (Chicago, Ill.)*, 74(2), pp.118–23.
- Saiki, R.K. et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), pp.487–91.
- Sánchez-Pérez, L. & Acosta-Gío, A.E., 2001. Caries risk assessment from dental plaque and salivary *Streptococcus mutans* counts on two culture media. *Archives of oral biology*, 46(1), pp.49–55.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), pp.5463–7.
- Sato, T. et al., 2003. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. *Letters in applied microbiology*, 37(1), pp.66–9.
- Schaeken, M.J., Keltjens, H.M. & Van Der Hoeven, J.S., 1991. Effects of fluoride and chlorhexidine on the microflora of dental root surfaces and progression of root-surface caries. *Journal of dental research*, 70(2), pp.150–3.
- Seidler, V. et al., 2008. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. *Prague medical report*, 109(1), pp.5–13.
- De Siena, F. et al., 2012. Evaluation of chlorhexidine 0.05% with the adjunct of fluoride 0.05% in the inhibition of plaque formation: a double blind, crossover, plaque regrowth study. *International journal of dental hygiene*, pp.1–5.
- Slot, D.E. et al., 2011. The effect of chlorhexidine varnish on root caries: a systematic review. *Caries research*, 45(2), pp.162–73.
- Solomon, S., 1999. Stratospheric ozone depletion: a review of concepts and history. *Reviews of Geophysics*, 37, pp.275–316.
- Splieth, C. et al., 2000. Caries prevention with chlorhexidine-thymol varnish in high risk schoolchildren. *Community dentistry and oral epidemiology*, 28(6), pp.419–23.
- Stralfors, A., 1948. Studies of the microbiology of caries; the acid fermentation in the dental plaques in situ compared with

- lactobacillus count. *Journal of dental research*, 27(5), pp.576–86.
- Tanzer, J.M., Livingston, J. & Thompson, A.M., 2001. The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of dental education*, 65(10), pp.1028–37.
- Thanomsub, B. et al., 2002. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, 48(4), pp.193–9.
- Tinanoff, N. & O'Sullivan, D.M., 1997. Early childhood caries: overview and recent findings. *Pediatric dentistry*, 19(1), pp.12–6.
- Tyagi, R., 2008. The prevalence of nursing caries in Davangere preschool children and its relationship with feeding practices and socioeconomic status of the family. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 26(4), pp.153–7.
- Vadiakas, G., 2008. Case definition, aetiology and risk assessment of early childhood caries (ECC): a revisited review. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, 9(3), pp.114–25.
- Wang, C.S. et al., 2007. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *Journal of endodontics*, 33(11), pp.1283–9.
- Wang, D., Li, S. & Zhou, X., 2013. Control-Oriented Modeling and Real-Time Control for the Ozone Dosing Process of Drinking Water Treatment. *Environmental science & technology*.
- Watt, R.G., 2005. Strategies and approaches in oral disease prevention and health promotion. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(9), pp.711–8.
- Whiley, R.A. & Beighton, D., 1998. Current classification of the oral streptococci. *Oral microbiology and immunology*, 13(4), pp.195–216.
- Yano, A. et al., 2002. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS microbiology letters*, 217(1), pp.23–30.
- Yip, H.K., Guo, J.H. & Wong, W.H.S., 2007. Incipient caries lesions on cementum by mono- and co-culture oral bacteria. *Journal of dentistry*, 35(5), pp.377–82.

Yu, Z. & Morrison, M., 2004. Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), pp.4800–6.



ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2386

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584 GR-99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2386

FR: 482553

TÍTULO: Diversidade bacteriana e o efeito da Clorexidina a 40% e do Gás Ozônio sobre a microbiota de lesões de cárie de cárie severa na infância

AUTOR: Ricardo de Sousa Vieira, MARCOS XIMENES PONTE FILHO, MARIANE CARDOSO

FLORIANÓPOLIS, 03 de Fevereiro de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, **Marcos Ximenes Filho**, aluno do curso de doutorado em Odontopediatria da UFSC, juntamente com as **Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira**, estamos realizando um estudo para verificar os tipos de bactérias presentes nas lesões de cárie dental em crianças. Este estudo também realizará testes laboratoriais da eficácia da utilização do Gás Ozônio e da Clorexidina e do Fluoreto de Sódio no controle das bactérias relacionadas à cárie dental. Gostaríamos de convidar o (a) seu (sua) filho (a) para colaborar com a nossa pesquisa.

Para isso, gostaríamos da sua permissão para realizar o atendimento do seu filho. Serão coletadas amostras do tecido cariado e esse material será submetido a um estudo do DNA da bactéria. Após o tratamento inicial o seu filho (a) será encaminhado para o atendimento na Clínica de Odontopediatria da UFSC.

Ocasionalmente poderão ser utilizadas fotografias e radiografias para ilustrar o trabalho, porém os dados pessoais do (a) seu (sua) filho (a) não serão

revelados à ninguém. As fotografias serão editadas com tarjas pretas de forma que não será possível a identificação de nenhum participante do estudo.

Não haverá nenhum custo da sua parte e você terá total liberdade para desistir em qualquer momento da pesquisa.

Esta pesquisa trará um benefício ao (à) seu (sua) filho (a), e também às outras crianças que vierem a ser atendidas no serviço público de saúde, pois com esta análise iremos aprimorar o protocolo de tratamento da cárie dental.

Qualquer dúvida com relação à pesquisa você poderá entrar em contato com os pesquisadores: (48) 3721-9920.

Eu, _____ com RG
_____, sendo responsável pelo menor

, declaro que entendi o que me foi explicado, compreendi a necessidade desta pesquisa e concordo que o(a) meu(minha) filho(a) participe desta pesquisa.

Florianópolis, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador principal

Assinatura do pesquisador responsável

ANEXO C – Ficha de coleta de dados dos pacientes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ODONTOPEDIATRIA

“A diversidade bacteriana e a ação da clorexidina, do fluoreto de Sódio e do ozônio sobre a microbiota de lesões de cárie severa na infância “

Dados Gerais:

Nome: _____ Nº _____ Prontuário: _____

D.N: __/__/____ IDADE: _____ SEXO: () M () F DATA: __/__/____

Nome Responsável: _____ Telefone _____ Endereço:

Anamnese:

Com quem a criança convive? _____

Irmão (s)? () S () N Quantos ? _____ Idade : _____

Possui algum problema de saúde ? () Sim () Não Qual (is)

Alergias ? () Sim () Não

Está sob acompanhamento médico ? () Sim () Não

Está tomando algum medicamento ? () Sim () Não Qual (is)

Já fez uso de algum medicamento ? () Sim () Não Qual (is)

Doenças da infância (rubéola, sarampo)? () Sim () Não

Problemas após o parto? _____

Hábitos Alimentares

Amamentação ? () Sim () Não Tipo: () Peito () Mamadeira

Até que idade? _____ Ainda mama? ____ Horários: _____

Hábitos de Higiene

Escova os dentes: () Sim () Não Horários: _____ Quem Escova?: _____

Coleta das Amostras

Dente Coletado:

Faces Envolvidas:

Tipo de lesão:

ANEXO D – Normas de publicação periódico *Caries Research* para publicação dos artigos



Guidelines

Guidelines for Authors

www.karger.com/cre_guidelines

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal. The journal reviews papers dealing with natural products and other bacterial inhibitors against specific criteria, details of which are available from the Editor.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted online:

Should you experience problems with your submission, please contact:

Prof. David Beighton

(Editor-in-Chief, Caries Research)

Department of Microbiology

The Henry Wellcome Laboratories for Microbiology and Salivary Research

KCL Dental Institute, Floor 17, Guys Tower

London Bridge SE1 9RT (UK)

Tel. +44 2071887465

Fax +44 2071887466
david.beighton@kcl.ac.uk

During the online submission you will be asked to list complete mailing addresses, including e-mail addresses of three potential reviewers for your manuscript. Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.

If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of Caries Research and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications. Authors of papers describing research on human subjects are required to state that they have adhered to the Declaration of Helsinki.

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations.

The text file should contain the following sequence of sections: Title page;

Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results;

Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section

should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to

Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must

be numbered consecutively from the title page until the last page. Submissions

which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly.

Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the

study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript.

Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at clinicaltrials.gov or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the first patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial

registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number].

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation). Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surface-softened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof. To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC,

FF, EE).

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.

- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 800.00 per page.

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper. References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional information which is directly

pertinent to the content and conclusion of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The editors reserve the right to reject or limit the scope and length of supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. Acceptable file formats are word or pdf, excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a pdf file), video files (.mov, .avi, .mpeg), and audio files (.wav), either free standing or incorporated into html or ppt files in each case to illustrate the sound.

Accepted supplementary material will be published as submitted and no proofs will be provided to the authors.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Author's Choice[™]

Karger's Author's Choice[™] service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits your manuscript on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publication. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium Author's Choice[™] service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's Author's Choice[™] feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted seven printed pages. The allotted size of a

paper is equal to approximately 21 typescript pages (including tables, illustrations and references).

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.

ANEXO E- PRODUÇÃO CIENTÍFICA MESTRADO/DOCTORADO
(2008/2013)

1. Artigos completos publicados

- 1) XIMENES FILHO M, TRICHES TC, BELTRAME APSCA, HILGERT LA, CARDOSO M. Effect of endodontic irrigation with 1% sodium hypochlorite and 17% EDTA on primary teeth: a scanning electron microscopy analysis. **General Dentistry**. v.61, p.24-27, 2013.
- 2) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CARDOSO M, BOLAN M, VIEIRA RS. Reconstrução de dentes decíduos. **Revista Brasileira de Dicas em Odontologia**. v.5, p.44-47, 2013.
- 3) XIMENES FILHO M, TRICHES TC, PEREIRA-NETO ARL, PINAL M, MAGINI RS, CARDOSO M. Blanqueamiento de un diente temporal traumatizado: A propósito de un caso. **Odontología Pediátrica**. v.20, p.145-150, 2012.
- 4) FILHO XIMENES M, CARDOSO M. Asssssment of difusion of hydroxyl and calcium ions of root canal filling materials in primary teeth. **Pediatric Dentistry**, v34, p 32-36, 2012
- 5) TRICHES TC, DE PAULA LK, XIMENES FILHO M, BOLAN M. Apical fenestration and ectopic eruption – Effects from trauma to primary tooth: a clinical case report. **Dental Traumatology**. v.27, p.74-76, 2011.
- 6) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CORDEIRO MMR. Influência de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento da cavidade bucal – Relato de caso de gêmeos bivitelinos. **Revista Full Dentistry in Science**. v.2, p.186-192, 2010.
- 7) MALTA D, PEREIRA NETO ARL, FILHO XIMENES M, MATTEVI GS, BOSCO VL, RATH IBS. Uso do termo de consentimento livre e esclarecido e o respeito à dignidade humana. **Revista Ciências da Saúde (UFSC)**, v.227, p. 7-12, 2008.

Artigos aceitos para publicação

- 1) XIMENES FILHO M, TRICHES TC, CARDOSO M, BOLAN M. Pyogenic granuloma on the tongue: Case report of a pediatric patient. **General Dentistry**. 2013.

Textos em jornais de notícias / revistas

- 1) XIMENES M. Dente de leite vai cair mesmo, para que cuidar? **Revista Educar**. Estado de Santa Catarina, p.07, maio 2010.
- 2) XIMENES M. Trauma dental. **Revista Educar**. Estado de Santa Catarina, p.16, março 2010.
- 3) XIMENES M. Doença periodontal em crianças. **Revista Educar**. Santa Catarina, p. 03, setembro 2009.

2. Produção de Anais

- 1) TRICHES TC, BRANCHER GP, XIMENES FILHO M, AREAL R, ALMEIDA ICS. Prevalence of sucking habits and related malocclusion in children. In: 91st General Session and Exhibition of the IADR, Seattle. 2013. Journal of Dental Research, v.92A.
- 2) TRICHES TC, BELTRAME APSCA, XIMENES FILHO M, CALVO MC, ALMEIDA ICS. Atendimento odontológico na Clínica de Bebês da Universidade Federal de Santa Catarina. In: Anais Eletrônicos do 43^o Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, Campos do Jordão. 2012. v.43, p.54.
- 3) PAES P, CARDOSO M, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BOLAN M. Prevalence and etiologic factors associated with bruxism in children. In: 90th General Session and Exhibition of the IADR – Latin American Regional Meeting, Foz do Iguaçu. 2012. Journal of Dental Research, v.91B.
- 4) TAGUCHI CMC, XIMENES FILHO M, TRICHES TC, SARTORI N, CARDOSO M, BOLAN M. Diffusion of calcium and hydroxyl through dentin of primary teeth. In: 90th General Session and Exhibition of the IADR – Latin

- American Regional Meeting, Foz do Iguaçu. 2012. Journal of Dental Research, v.91B.
- 5) HANAUER D, CARDOSO M, SOARES FC, BOLAN M, BELTRAME APSCA, XIMENES FILHO M, TRICHES TC. School and Family in children's oral health promotion. In: 90th General Session and Exhibition of the IADR – Latin American Regional Meeting, Foz do Iguaçu. 2012. Journal of Dental Research, v.91B.
 - 6) SCHMITT TF, BLASI HF, FERRARI EP, CANTO GL, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BOLAN M. Alterações fonoaudiológicas na Displasia Ectodérmica – Relato de caso. In: Anais do V Encontro Brasileiro de Motricidade Orofacial, Curitiba. 2012. p.14.
 - 7) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, SOUZA JGO, PEREIRA-NETO ARL, CARDOSO AC, BOLAN M. Implantes e próteses em criança com Displasia Ectodérmica. In: Anais do 8^o Encontro Nacional de Odontologia para Bebês e 8^o Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2011. p.45.
 - 8) CHAGAS JL, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CORDEIRO MMR. Conhecimento de acadêmicos de Odontologia em relação às células-tronco e a sua atitude frente ao tema na prática odontológica. In: 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia. 2011. Brazilian Oral Research, v.25, p.113.
 - 9) XIMENES FILHO M, BERDNADON J, MALTA D, TRICHES TC, ROMANINI JC, CARDOSO M. Trauma dental em bebê: tratamento e acompanhamento de 10 anos – Relato de caso. In: Anais do 8^o Encontro Nacional de Odontologia para Bebês e 8^o Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2011. p.62.
 - 10) CHAGAS JL, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CORDEIRO MMR. Conhecimento de acadêmicos de Odontologia em relação às células-tronco e a sua atitude frente ao tema na prática odontológica. In: Anais do 21^o Seminário de Iniciação Científica – SIC-UFSC, Florianópolis. 2011. p.186.
 - 11) TAGUCHI CMC, XIMENES FILHO M, TRICHES TC, CARDOSO M. Eficácia do EDTA 17% na difusão de cálcio através da dentina radicular e cimento de dentes decíduos –

- Análise *in vitro*. In: Anais do 21º Seminário de Iniciação Científica – SIC-UFSC, Florianópolis. 2011. p.270.
- 12) XIMENES M, CUNHA FS, BOLAN M, CARODOS M. Perfil dos tratamentos em dentes decíduos traumatizados na UFSC. IN: 28º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011.
 - 13) FILHO XIMENES M, CARDOSO M. Evaluation of the diffusion of calcium hydroxide in primary teeth. In: International Association For Dental Research, 2010, Barcelona.
 - 14) FILHO XIMENES M, CARDOSO M. Avaliação in vitro da difusão de Ca²⁺ através da dentina radicular e cimento de dentes decíduos. In: 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010.
 - 15) FILHO XIMENES M, CARDOSO M. Sepultamento de Incisivo Central Decíduo Após Traumatismo: Relato de Caso. In: XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, 2009, Jaraguá do Sul- SC. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, 2009. p. 1-132.
 - 16) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CARDOSO M, BOLAN M. Granuloma Piogênico: Relato de caso em paciente odontopediátrico. In: Anais do X Congresso Internacional de Odontologia do Paraná – CIOPAR, Curitiba. 2009. p.295.
 - 17) DE PAULA LK, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BOLAN M. Tratamento de alveólise e erupção ectópica: Exodontia e expansor de maxila – Relato de caso. In: Anais do X Congresso Internacional de Odontologia do Paraná – CIOPAR, Curitiba. 2009. p.135.
 - 18) VIEIRA DP, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BELTRAME APSCA, GARCIA LP, VIEIRA RS, CORDEIRO MMR. Estão os alunos de Odontologia preparados para o futuro? Qual a sua atitude em relação ao Projeto Genoma Humano? In: Anais do 19º Seminário de Iniciação Científica, Florianópolis. 2009.
 - 19) SANTOS GL, BELTRAME APSCA, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BOLAN M, SILVA DB, VIEIRA RS. Análise da Microinfiltração de Materiais Restauradores

- Provisórios em Dentes Decíduos. In: Anais do 19º Seminário de Iniciação Científica, Florianópolis. 2009.
- 20) VIEIRA DP, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BELTRAME APSCA, GARCIA LP, VIEIRA RS, CORDEIRO MMR. Estão os alunos de Odontologia preparados para o futuro? Qual a sua atitude em relação ao Projeto Genoma Humano? In: Anais da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia. 2009. p.88.
 - 21) SANTOS GL, BELTRAME APSCA, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BOLAN M, SILVA DB, VIEIRA RS. Análise da Microinfiltração de Materiais Restauradores Provisórios em Dentes Decíduos. In: Anais da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia. 2009. p.42.
 - 22) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BELTRAME APSCA, HILGERT LA, CARDOSO M, VIEIRA RS. Efeito da irrigação endodôntica com hipoclorito de sódio 1% e EDTA 17% em dentes decíduos: análise em microscopia eletrônica de varredura. In: Anais da 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia. 2009. p.196.
 - 23) XIMENES FILHO M, TRICHES TC, BELTRAME APSCA, CARDOSO M. Avaliação da irrigação endodôntica final com EDTA 17% em dentes decíduos: análise em MEV. In: Anais do 40º Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, São Pedro. 2009.
 - 24) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, DE PAULA LK, BOLAN M, VIEIRA RS. Alveólise e Erupção ectópica – Sequelas de infecção em dentes decíduos: Relato de caso. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2009. p.18.
 - 25) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CORDEIRO MMR. Influência de fatores genéticos e ambientais no padrão de desenvolvimento em gêmeos bivitelinos – Relato de caso. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2009. p.84.
 - 26) XIMENES FILHO M, TRICHES TC, SILVA E, VIEIRA RS. Remoção cirúrgica de Mesiodens sob Sedação consciente

- com Óxido Nitroso: Relato de dois casos clínicos. In: Anais do XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2009. p.93.
- 27) BELTRAME APSCA, VIEIRA RS, OLIVEIRA J, ALMEIDA ICS, CARDOSO M, BOLAN M, CORDEIRO MMR, AREAL R, TRICHES TC, XIMENES FILHO M. Cuidados com a Saúde Bucal: educação e motivação na sala de espera. In: 7º Anais da SEPEX – Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Florianópolis: UFSC, 2008. v.7.
- 28) BOLAN M, FILHO XIMENES, M, CORREA M. Aplicabilidade Clínica da Tomografia Computadorizada Cone Beam em Odontopediatria. In: 39º Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, 2008, Curitiba - Paraná. Anais do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria - versão eletrônica, 2008. v. 39.

3. Apresentação de trabalhos

- 1) TRICHES TC, BRANCHER GP, XIMENES FILHO M, AREAL R, ALMEIDA ICS. Prevalence of sucking habits and related malocclusion in children. In: 91st General Session and Exhibition of the IADR, Seattle. 2013.
- 2) PAES P, CARDOSO M, TRICHES TC*, XIMENES FILHO M, BOLAN M. Prevalence and etiologic factors associated with bruxism in children. In: 90th General Session and Exhibition of the IADR – Latin American Regional Meeting, Foz do Iguaçu. 2012.
- 3) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, SOUZA JGO, PEREIRA-NETO ARL, CARDOSO AC, BOLAN M. (Painel) Implantes e próteses em criança com Displasia Ectodérmica. In: 8º Encontro Nacional de Odontologia para Bebês e 8º Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2011.
- 4) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CARDOSO M, BOLAN M. (Painel) Granuloma Piogênico: Relato de caso em paciente odontopediátrico. X Congresso Internacional de Odontologia do Paraná – CIOPAR, Curitiba. 2009.

- 5) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CORDEIRO MMR. (Painel) Fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento de gêmeos bivitelinos – Relato de caso. IV Congresso Internacional de Odontologia de Santa Catarina – CIOSC, Florianópolis. 2009.
- 6) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BELTRAME APSCA, HILGERT LA, CARDOSO M, VIEIRA RS. (Painel) Efeito da irrigação endodôntica com hipoclorito de sódio 1% e EDTA 17% em dentes decíduos: análise em microscopia eletrônica de varredura. 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia. 2009.
- 7) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, DE PAULA LK, BOLAN M, VIEIRA RS. (Painel) Alveólise e Erupção ectópica – Sequelas de infecção em dentes decíduos: Relato de caso. XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2009.
- 8) TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CORDEIRO MMR. (Oral) Influência de fatores genéticos e ambientais no padrão de desenvolvimento em gêmeos bivitelinos – Relato de caso. XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul. 2009.

4. Prêmios

- 1) **1º lugar na categoria Painel no 37º Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.**
TAGUCHI CMC, XIMENES FILHO M, TRICHES TC, CARDOSO M.
Eficácia do EDTA 17% na difusão de cálcio através da dentina radicular e cimento de dentes decíduos – Análise *in vitro*.
- 2) **Menção Honrosa – Prêmio Myaki Issao de Iniciação Científica – Sessão B – Área 4, Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, 2011.**
CHAGAS JL, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, CORDEIRO MMR.

Conhecimento de acadêmicos de Odontologia em relação às células-tronco e a sua atitude frente ao tema na prática odontológica.

- 3) **2º Lugar na categoria Tema Livre Oral no XXXII Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica da Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.**

VIEIRA DP, TRICHES TC, XIMENES FILHO M, BELTRAME APSCA, CORDEIRO MMR

Qual a atitude dos estudantes de Odontologia em relação ao Projeto Genoma Humano? Qual a sua importância na prática Odontológica?

5. Participação em eventos

- 1) 91st General Session and Exhibition of the IADR, Seattle - USA. 2013.
- 2) 90th General Session and Exhibition of the IADR – Latin American Meeting, Foz do Iguaçu – PR, 2012.
- 3) 37^o Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica – UFSC, Florianópolis – SC, 2012.
- 4) V Encontro Brasileiro de Motricidade Orofacial, Curitiba – PR, 2012.
- 5) 89th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research – IADR, San Diego – USA. 2011.
- 6) 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia – SP, 2011.
- 7) 8^o Encontro Nacional de Odontologia para Bebês e 8^o Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul – SC, 2011.
- 8) 21^o Seminário de Iniciação Científica – SIC/UFSC, Florianópolis – SC, 2011.
- 9) 6^a Semana da Ortodontia – UFSC, Florianópolis – SC, 2011.
- 10) XXXVI Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica – UFSC, Florianópolis – SC, 2011.
- 11) XXXV Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica – UFSC, Florianópolis – SC, 2011.
- 12) I Semana de Saúde Bucal da UFSC, Florianópolis - SC. 2011.

- 13) XXXIV Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica – UFSC, Florianópolis – SC, 2010.
- 14) 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research – IADR, Barcelona – ES, 2010.
- 15) 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO , Águas de Lindóia – SP, 2010.
- 16) 5^a Semana da Ortodontia – UFSC, Florianópolis – SC, 2010.
- 17) VI Conclave Maringaense de Odontologia e III Encontro de Pós-Graduação em Odontologia, Maringá – PR, 2010.
- 18)
- 19) 40^o Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, São Pedro – SP, 2009.
- 20) 19^o Seminário de Iniciação Científica – UFSC, Florianópolis – SC, 2009.
- 21) X Congresso Internacional de Odontologia do Paraná – CIOPAR, Curitiba – PR, 2009.
- 22) IV Congresso Internacional de Odontologia de Santa Catarina – CIOSC, Florianópolis – SC, 2009.
- 23) 4^a Semana de Ortodontia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.
- 24) 26^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia – SP, 2009.
- 25) XXXII Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.
- 26) XXII Congresso Brasileiro de Odontopediatria e VII Encontro Sul-Brasileiro de Odontopediatria, Jaraguá do Sul – SC, 2009.
- 27) XXXI Encontro Acadêmico de Atualização Odontológica da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.
- 28) 27^o Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo – CIOSP, São Paulo – SP, 2009.
- 29) 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia – SP, 2008.
- 30) 39^o Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, Curitiba – PR, 2008.
- 31) 7^a Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão – SEPEX - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2008.

6. Participação em banca de Trabalho de Conclusão de Curso

- 1) TAGUCHI, C. M. C.; CARDOSO, M; XIMENES M. Participação em banca de Carolina Mayumi Cavalcanti Taguchi. Eficácia do EDTA 17% na difusão de cálcio através da dentina radicular de dentes decíduos Análise *in vitro*. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Santa Catarina.

7. Orientações concluídas

- 1) Juliana Luz das Chagas. Conhecimento de graduandos em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina sobre as células-tronco e suas aplicações. Início: 2010, Término: 2012. Iniciação científica e Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Co-orientador.
- 2) Carolina Mayumi Cavalcanti Taguchi. Eficácia do EDTA 17% na difusão de cálcio através da dentina radicular e cimento de dentes decíduos – Análise *in vitro*. Início: 2010, Término: 2012. Iniciação científica e Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Co-orientador.
- 3) Rebeca D'Aquino. Cúspide em Garra: Relato de dois casos clínicos. Início: 2010, Término: 2010. Universidade Federal de Santa Catarina.
- 4) Geórgia Linhares dos Santos. Análise de materiais restauradores provisórios quanto a microinfiltração em dentes decíduos. Início: 2008, Término: 2010. Iniciação científica (Graduando em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Co-orientador.
- 5) Daniela Peressoní Vieira. Estão os alunos de Odontologia preparados para o futuro? Qual a sua atitude em relação ao

- Projeto Genoma Humano? Início: 2008, Término: 2010. Iniciação científica (Graduando em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina. Co-orientador.
- 6) Leonardo Koerich de Paula. Fenestração apical e erupção ectópica – Efeito de trauma em dentes decíduos: Relato de caso clínico. Início: 2009, Término: 2010, Universidade Federal de Santa Catarina.
 - 7) Leonardo Koerich de Paula. Alveólise e Erupção ectópica – Sequelas de infecção em dentes decíduos: Relato de caso. Início: 2009, Término: 2009. Universidade Federal de Santa Catarina.
 - 8) Leonardo Koerich de Paula. Tratamento de Alveólise e Erupção Ectópica: Exodontia e Expansor da Maxila – Relato de caso. Início: 2009, Término: 2009. Universidade Federal de Santa Catarina.
 - 9) Emanuely da Silva. Remoção cirúrgica de Mesiodens sob Sedação consciente com Óxido Nitroso: Relato de dois casos clínicos. Início: 2009, Término: 2009. Universidade Federal de Santa Catarina.
 - 10) Daniela Peressoni Vieira. Qual a atitude dos estudantes de Odontologia em relação ao Projeto Genoma Humano? Qual a sua importância na prática Odontológica? Início: 2009, Término: 2009. Universidade Federal de Santa Catarina. Co-orientador.
 - 11) Geórgia Linhares dos Santos. Análise da microinfiltração de materiais restauradores provisórios em dentes decíduos. Início: 2009, Término: 2009. Universidade Federal de Santa Catarina. Co-orientador.
 - 12) Renata Fagundes e Renata Carvalho. Tratamento de erupção ectópica de um incisivo central superior permanente – Relato de caso clínico. Início: 2009, Término: 2009. Universidade Federal de Santa Catarina.

