



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

PETTELY THAÍSE DE SOUZA SANTOS PALMEIRA

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM RESINAS
COMPOSTAS BULK FILL COM USO DE FITOTERÁPICO *Zingiber officinale*
PELO SISTEMA DE TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA**

CAMPINA GRANDE – PB

2019

PETTELY THAÍSE DE SOUZA SANTOS PALMEIRA

**AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM RESINAS
COMPOSTAS BULK FILL COM USO DE FITOTERÁPICO *Zingiber officinale*
PELO SISTEMA DE TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, da Universidade
Estadual da Paraíba, como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Odontologia.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota

CAMPINA GRANDE - PB

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

P172a Palmeira, Pettely Thaíse de Souza Santos.
Avaliação da inibição de micro-organismos em resinas compostas Bulk Fill com uso de fitoterápico *Zingiber officinale* pelo sistema de tomografia por coerência óptica [manuscrito] / Pettely Thaíse de Souza Santos Palmeira. - 2019.
87 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, Departamento de Odontologia - CCBS."
"Coorientação: Profa. Dra. Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota, ASCES-UNITA - Centro Universitário Tabosa de Almeida"
1. Tomografia de Coerência Óptica. 2. Resina composta.
3. Ação antibacteriana. 4. Biofilme. I. Título
21. ed. CDD 617.695

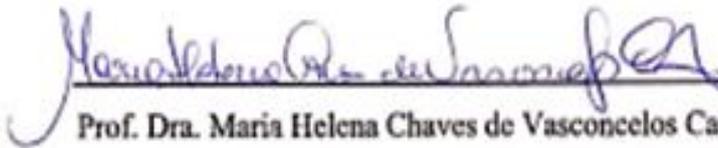
PETTELY THAÍSE DE SOUZA SANTOS PALMEIRA

INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM RESINAS COMPOSTAS BULK
FILL COM USO DE FITOTERÁPICO *Zingiber officinale* PELO SISTEMA DE
TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

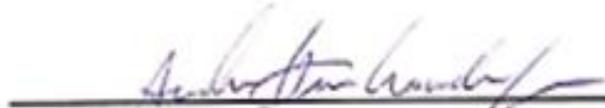
APROVADO EM 26/11/2019

BANCA EXAMINADORA



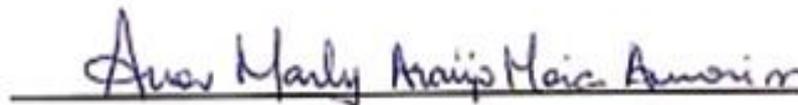
Prof. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão / UEPB

Membro Titular (Orientadora)



Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes / UFPE

Titular Externo



Profa. Dra. Ana Marly Araújo Maia Amorim / UEPB

Titular Interno

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone de Beauvoir

DEDICATÓRIA

À **Deus**, fonte de toda minha força e fé, que sempre esteve me abençoando e guiando, em todos os momentos, por mais difíceis que se mostrassem.

À minha mãe, **Maria da Conceição de Souza Santos Palmeira**, por todo o apoio incondicional para que pudesse estudar em outra cidade e ficar tranquila que minhas filhas estivessem bem cuidadas e amparadas, sob sua supervisão. Agradeço por toda dedicação nesses dois anos, sei o quanto foi difícil e desgastante. Obrigada por todo seu amor, doação e incentivo, que permitiram que eu continuasse firme.

Ao meu pai, **Hamilton José Palmeira**, pela inspiração de luta, de ser exemplo de batalha em busca dos sonhos, de ter me ensinado a cair e se levantar quantas vezes forem necessárias, até conseguir o êxito, e nunca desistir.

Ao meu esposo, **Marconi Eduardo Sousa Maciel Santos**, cujo apoio foi desde a fase preparatória para seleção. Quantas noites em claro passamos, tanto estudando, como ninando bebê. Sou muito orgulhosa do pai que você se tornou, participativo em todas as fases da criação de nossas filhas, que foi fundamental para suprir as necessidades delas, na minha ausência. Tenho consciência do quão difícil foi essa fase para todos, tendo que nos multiplicar em várias funções ao mesmo tempo para lidar com os afazeres e desafios diários, como também da abdicção que fizemos em tantas áreas, reconheço o quanto você precisou trabalhar para manter as finanças, durante minha ausência nesses dois anos de mestrado. Obrigada por tudo, em especial pela compreensão, companheirismo, torcida e amor irrestrito que nos manteve firme frente aos obstáculos.

Às minhas filhas, **Giovanna Pétala Palmeira Maciel** e **Giulia Pérola Palmeira Maciel**, pois toda minha luta foi em prol de vocês. Espero que um dia entendam e sintam orgulho de sua mãe, algumas coisas perdi, por esta ausente, mas tenham certeza que durante toda essa trajetória, sempre tentei equilibrar a família e o mestrado, preferindo sacrificar a mim, do que à vocês. Não foi fácil a trajetória, mas considero que cumpri bem a missão.

À vocês, dedico esta vitória e minha trajetória de vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, por toda sua atenção, cuidado, incentivo e compreensão ao longo desses dois anos. Agradeço pelos seus ensinamentos e por despertar em mim o desejo de sempre buscar mais. Por ter me mostrado o universo da laserterapia e estimular a trilhar meu próprio caminho nessa trajetória. Pelas oportunidades cedidas em cada estágio docência e no projeto de extensão, que faziam com que meus olhos brilhassem e saísse convicta de que é isso que quero para minha vida profissional. Seu empenho na jornada acadêmica, aumentaram em mim a admiração e respeito pela senhora, pois além de uma excelente orientadora, é íntegra, amiga, generosa e coerente. Obrigada pelas suas orientações que vão além das produções científicas, nos ensinando lições para a vida, e sempre nos estimulando a crescer, compartilhando suas experiências e nos conduzindo pelo melhor caminho.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota**, por todo seu empenho incondicional nesta pesquisa. Por ser inspiração de pesquisadora, e me oportunizado trabalhar com alta tecnologia. Agradeço toda sua dedicação e ensinamentos. Saiba que é uma fonte de inspiração de trabalho e talento.

À **Universidade Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA)** por ter autorizado o desenvolvimento de parte fundamental desta pesquisa em suas instalações. Meus sinceros agradecimentos a esta instituição!

AGRADECIMENTOS

Ao **Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)** pela sólida formação que recebi no curso de mestrado, por todos os ensinamentos e imensurável contribuição no meu processo de formação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marconi Eduardo Sousa Maciel Santos** pela enorme contribuição na minha formação ao longo dos anos, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, pela dedicação a este trabalho, por acreditar neste estudo e investir tempo e dinheiro nessa pesquisa. Sou grata a você por todo apoio imensurável e que foi fundamental durante esse período de formação.

Ao **Laboratório de Biofotônica e Materiais Dentários**, ao **Laboratório de Farmacologia** da ASCES-UNITA e a todos desta instituição que contribuíram de forma direta ou indireta com esta pesquisa, em especial à **Profa. Dra. Patrícia Lins Azevedo do Nascimento**, por todos os ensinamentos de microbiologia, pela paciência, disponibilidade e acompanhamento no desenvolvimento dessa pesquisa; **Profa. Dra. Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota**, pelo ensino do manuseio do OCT, além da disponibilidade de tempo em todas as fases; **Prof. Dr. Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo**, pela orientação e condução no desenvolvimento do fitoterápico.

Agradeço imensamente aos alunos de graduação **Nathália Alexandre Eloy Lins; Maria Carolina Oliveira Lins; Renan Lennon Silva Henrique**, vocês foram escolhidos a dedo para participar dessa pesquisa e não teria escolha melhor, pois vocês são excelentes, cada um com seu talento e habilidade individual, que juntos formam uma grande equipe. Sei que vocês têm um futuro promissor na odontologia e talento gigantesco para a vida acadêmica/pesquisa, sucesso a todos!

Ao **Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes**, responsável pelo departamento de física da UFPE, por ter concedido o OCT para desenvolvimento desta pesquisa e todas as sugestões dadas durante a qualificação deste trabalho e revisão do manuscrito final.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa e da Liga Interdisciplinar de Odontologia da UEPB, representados por **Ana Luzia, José de Alencar, Thamyres Simões, Thiago Lacerda, Alisson e a Professora Carmem**. Cada um contribuiu de alguma forma para meu crescimento pessoal e profissional. Admiro muito o grupo e torço para que se fortaleça, ainda mais, ao longo dos anos.

À minha amiga **Paula Miliana Leal**, com quem tive oportunidade de dividir apartamento em Campina Grande e conhecer a excelente pessoa que és. Partilhamos estudos para as provas, ensaios para os seminários, avaliação de dados de pesquisa, produções de artigos científicos etc. Compartilhei contigo tanto as questões acadêmicas como os desafios pessoais. Desejo muito sucesso para você e espero que a vida nos oportunize dividir outros momentos juntas, quem sabe profissionais. E à amiga **Yêska Paola**, pelo incentivo de fazer o mestrado, por ter me enviado o edital e fazer conhecer o programa da UEPB e pelo apoio em Campina Grande nas diversas vezes que precisei.

À coordenadora, do programa de pós-graduação da UEPB, **Profa. Dra. Daniela Pita de Melo**, ao vice coordenador **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka** representando todos que fazem parte do programa. Agradeço à todos os professores permanentes e colaboradores, em especial aqueles que tive contato direto ao longo de minha formação e que contribuíram muito com meu crescimento acadêmico: **Prof. Dr. Alessandro Leite Cavalcanti; Profa. Dra. Ana Flávia Granville-Garcia; Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes; Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa; Profa. Dra. Patrícia Meira Bento; Prof. Dr. Sérgio d'Ávila Lins B. Cavalcanti; Profa. Dra. Renata Rocha, Profa. Dra. Rilva Suely de Castro Cardoso Lucas, Prof. Dr. Kenio Costa de Lima**; agradeço por todos os ensinamentos e inestimável contribuição no meu processo de formação.

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta dissertação: **Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes; Profa. Dra. Ana Marly; Daniela Pita de**

Melo; Profa. Dra. Patrícia Lins Azevedo do Nascimento pela atenção e disponibilidade em aprimorar este trabalho, compartilhando seu tempo e conhecimentos científico.

Aos meus colegas de turma, **Camila Pereira, Daniella Morais, Isla Laureano, Jaildo Nascimento, Jéssica Melo, José Eraldo Pereira, Kyara Pires, Luiz Vieira, Lunna Farias, Paula Leal, Pedro Ribeiro, Priscilla Silva, Roanny Lopes**, cuja característica mais evidente é a união, desde apoio nos momentos difíceis, até os momentos de alegrias e incentivos compartilhados durante essa jornada. Estarei sempre torcendo pelo sucesso de todos!

À toda a minha família, pela atuação incisiva nos momentos que mais precisei de apoio, em especial: a minha mãe, **Conceição Palmeira**, cujas palavras não seriam suficientes para expressar toda a minha gratidão, por sair de Recife, largando suas atribuições para me ajudar. Aos meus Tios **Elias Santos Júnior** e **Givanilda Santos**, por todas as vezes que precisei deixar minhas filhas em seu lar, para participar de algum congresso. O fato de não ter família em Caruaru, tornaram as coisas bem mais difíceis para mim, sou grata à minha sogra **Malude Maciel** e ao meu sogro **Marco Maciel**, os quais muitas vezes levaram minha filha na escola na durante minha ausência; agradeço a minha cunhada **Fabiana Maciel**, que neste último semestre, me apoiou na busca da minha filha na escola nos dias que estava em Campina Grande. Saibam que por mais singelos que pareçam a ajuda de cada um, sempre lembrarei com gratidão por esses momentos.

Às pessoas que colaboraram na minha ausência, cuidando das minhas filhas, tanto nas noites que estive em CG, como nas que tive que viajar para algum congresso, agradeço à todas e em especial à **Ivane Bezerra** que passou um período mais longo comigo, desde o preparatório para a seleção do mestrado e até hoje me socorre quando preciso.

Ao **Hotelzinho Espaço da Criança**, em nome de **Lane e Lili**, que acolheram minhas filhas no momento que estava descoberta, se empenhado para elas se adaptarem da melhor forma e me dando um suporte fundamental para continuar minha caminhada nesse último semestre, meus sinceros agradecimentos!

À **ULTRADENT**, através da representante Maria de Fátima M Miranda, pelo empréstimo do aparelho VALO CORDLESS; à **KERR**, através da representante Kamilla, pelo empréstimo da peça de mão Sonic Fill.

Ao professor **Roberto Sergio**, por ter disponibilizado seu microscópio de luz invertida durante toda a pesquisa. E a todos aqueles que me introduziram ao laboratório, cada um ensinando e se disponibilizando até eu aprender o manuseio de todas as fases, com carinho a **Taysnara, Almir, Danilo, Alex, Evair e Elayne Diniz**, meus sinceros agradecimentos.

“Gratidão muda tudo a nossa volta, pois passamos a querer retribuir ao mundo tudo que ele tem para nos dar”.

Autor desconhecido

RESUMO

A cavidade bucal é um dos locais em que há uma maior variedade de micro-organismos que podem, por um desequilíbrio, como acúmulo exacerbado de biofilmes, tártaros e ausência de higiene oral, tornar-se patogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fitoterápico *Zingiber officinale* sobre o crescimento e aderência de micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans in vitro* sobre superfícies lisas de resinas compostas Bulk Fill de alta viscosidade e esmalte dentário, comparando seus resultados com a aplicação tópica de clorexidina. Para isso, foi realizada uma pesquisa experimental laboratorial *in vitro* com abordagem analítica, com duas resinas do tipo Bulk Fill condensáveis Tetric N-Ceram Bulk Fill - Ivoclar, Sonic Fill -Kerr e o esmalte humano, inoculando os grupos de micro-organismos supracitados, tendo como teste o *Zingiber officinale* para inibição de crescimento, como controle positivo a clorexidina e como controle negativo a não intervenção. Neste estudo, foram utilizados dois sistemas de tomografia por coerência óptica (OCT): o Callisto (Thorlabs Inc, New Jersey, USA) e o LabScope (Lummedica, Durham, NC, USA), todas as amostras foram analisadas através do OCT. A amostra total foi de 180 corpos de prova, tendo $n = 10$ por grupo, sendo obtidas 10 imagens de cada corpo de prova e 30 imagens de cada plaqueamento, ambos em três momentos distintos, estéreis, crescido e tratado. O processamento das imagens foi realizado com um algoritmo produzido em linguagem MatLab para determinação da média da intensidade de sinal e cálculo da densidade óptica, usando as imagens em formato tiff geradas pelo OCT Labscope. Foram calculadas a média e o desvio-padrão de cada grupo, utilizado o teste de Mann-Whitneye de Kruskal Wallis. A resina Tetric apresentou menor crescimento de biofilme quando comparadas a Sonic quando tratadas por meio dos enxaguantes analisados. O fitoterápico *Zingiber officinale* foi eficaz na inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* e da *Candida albicans in vitro* sobre superfícies lisas de resinas compostas Bulk Fill de alta viscosidade e esmalte dentário, apesar da Clorexidina apresentar os melhores resultados numéricos, não houve diferença estatística entre a *Zingiber officinale* e a Clorexidina. Portanto, o *Zingiber officinale* é um método eficaz viável para controle e inibição microbiana.

Palavras chaves: Tomografia de Coerência Óptica; Resina composta; Ação antibacteriana; Biofilme; *Zingiber officinale*.

ABSTRACT

The oral cavity is one of the places where there is a greater variety of microorganisms that can, due to an imbalance, become pathogenic. The aim of this study was to evaluate the effects of *Zingiber officinale* phytotherapeutic on the growth and adherence of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* microorganisms *in vitro* on smooth surfaces of high viscosity Bulk Fill composite resins and dental enamels, comparing their results with the application of chlorhexidine. For this purpose, an *in vitro* experimental laboratory study of the analytical type was carried out with two condensable Bulk Fill resins Tetric N-Ceram Bulk Fill - Ivoclar, Sonic Fill-Kerer and human enamel inoculating the groups. aforementioned microorganisms, using *Zingiber officinale* for growth inhibition as a positive control for chlorhexidine and as a negative control for non-intervention. In this study, two optical coherence tomography (OCT) systems were used: Callisto (Thorlabs Inc, New Jersey, USA) and LabScope (Lummedica, Durham, NC, USA), all samples were analyzed by OCT. The total sample consisted of 180 specimens, with n = 10 per group, and 10 images of each specimen and 30 images of each plating were obtained, both at three different times, sterile, grown and treated. Image processing was performed using an algorithm produced in MatLab language to determine the average signal strength and calculate optical density using the tiff images generated by OCT LabScope. The mean and standard deviation of each group were calculated using the Mann-Whitney and Kruskal Wallis tests. Through OCT evaluation, it was found that in the three surface types, both chlorhexidine and *Zingiber officinale* were effective in inhibiting *S. Aureus* and *C. Albicans*. The Tetric resin showed lower biofilm growth when compared to Sonic when treated with the analyzed rinses *Zingiber officinale* being an effective and viable method for microbial control and inhibition.

Keywords: Optical Coherence Tomography; Composite resin; Antibacterial action; Biofilm; *Zingiber officinale*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCES-UNITA	Centro Universitário Tabosa de Almeida
BIS-GMA	Bisfenol-A glicidil metacrilato
BIS-EMA	Bisfenol A glicidil dimetacrilato etoxilado
<i>C.Albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLX	Clorexidina
EPI	Equipamento de proteção individual
ESM	Esmalte dentário
EBADMA	Etil bisfenol A dimetacrilato
LED	Light Emitting Diode
MMA	Metil Metacrilato
MO	Micro-organismos
NI	Sem Intervenção
OCT	Tomografia de Coerência Óptica
PB	Paraíba
PMMA	Polimetil Metacrilato
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Caldo Sabouraud Dextrose
SON	Sonic Fill
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEGDMA	Trietileno glicol dimetacrilato / Triethylene glycol dimethacrylate;
TET	Tetric N-Ceram Bulk Fill
TSB	Triptona de Soja
UDMA	Uretano dimetacrilato / Urethane dimethacrylate
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
ZIN	<i>Zingiber officinale</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma da metodologia	24
Figura 2. Localização geográfica das cidades e centros universitários envolvidos	25
Figura 3. Variáveis do estudo	27
Figura 4. Confecção dos disco de resinas, a partir de uma matriz de teflon	28
Figura 5. Padronização do inóculo e condições de armazenamento	32
Figura 6. Plaqueamento em meio sólido	33
Figura 7. Controle por meio da Concentração Inibitória Mínima	33
Figura 8. Escaneamento dos espécimes através do OCT	34
Figura 1 (Artigo). Comparação das amostras estéreis em três momentos distintos expostas a <i>Candida Albicans</i>	59
Figura 2 (Artigo). Comparação das amostras estéreis em três momentos distintos expostas ao <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Figura 3 (Artigo). Comparação da densidade óptica das amostras expostas a <i>Candida Albicans</i>	61
Figura 4 (Artigo). Comparação da densidade óptica das amostras expostas ao <i>Staphylococcus aureus</i>	62

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Resinas compostas, fabricante, composição, classificação e técnica de uso	25
Quadro 2. Composição dos grupos experimentais	28
Quadro 3. Composição do fitoterápico	30
Quadro 4. Micro-organismos para inoculação dos grupos experimentais	31
Quadro 1 (Artigo). Resinas compostas, fabricante, composição, classificação e técnica de uso	54
Quadro 2 (Artigo). Composição dos grupos experimentais	55
Tabela 1 (Artigo). Médias e desvio padrão da intensidade do sinal dos grupos estudados e análise intragrupos das superfícies	56
Tabela 2 (Artigo). Avaliação da intensidade de sinal da inibição nas diferentes superfícies (Tipo de intervenção x superfícies)	57
Tabela 3 (Artigo). Avaliação da inibição e crescimento nas diferentes superfícies (<i>Staphylococcus aureus</i> x <i>Candida albicans</i>)	58

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A -Parecer do comitê de ética e pesquisa	69
ANEXO B - Laudo técnico do óleo essencial de gengibre	72
ANEXO C –Declaração do banco de dentes	73
ANEXO D -Normas do periódico Scientific Reports	74

SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	19
2.	OBJETIVOS.....	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA	23
3.2	LOCAL DO ESTUDO	23
3.3	TIPO DE ESTUDO.....	24
3.4	AMOSTRA	24
3.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
3.6	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	25
3.7	VARIÁVEIS.....	25
3.8	SELEÇÃO DOS MATERIAIS	26
3.9	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	26
3.9.1	DIVISÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO	27
3.9.2	CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA	27
3.10	FORMULAÇÃO DO FITOTERÁPICO	29
3.11	APLICAÇÃO DO FITOTERÁPICO	30
3.12	MEIOS DE CONTROLE	30
3.13	DESENVOLVIMENTO DE INÓCULOS E BIOFILMES /CONTAMINAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	30
3.14	APLICAÇÃO DOS MEIOS DE TRATAMENTO E CONTROLE.....	31
3.15	ESCANEAMENTO DOS ESPÉCIMES ATRAVÉS DO OCT	32
3.16	ANÁLISES QUANTITATIVAS DE BIOFILMES.....	33
3.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
3.18	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
4.	RESULTADOS	35
4.1	APRESENTAÇÃO.....	35
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	36
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	68
	ANEXO B - LAUDO TÉCNICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE	71

ANEXO C – DECLARAÇÃO DO BANCO DE DENTES	72
ANEXO D - NORMAS DO PERIÓDICO SCIENTIFIC REPORTS	73

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Restaurações dentárias diretas são consideradas a intervenção mais predominante na cavidade bucal (IONESCU et al., 2017; HEINTZE; ROUSSON, 2012). Com o advento das resinas do tipo Bulk Fill, obteve-se uma simplificação da utilização de compósitos dentários para dentes posteriores (ROSATTOA et al., 2015), reduzindo o tempo operatório restaurador, por permitir uma maior penetração de luz no processo de cura (PAR et al., 2018; VAN ENDE et al., 2012) e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de incrementos a serem inseridos na cavidade dentária a ser restaurada (LEPRINCE et al., 2014).

Em sua composição, as resinas Bulk Fill apresentam uma matriz orgânica, partículas de carga, moléculas iniciadoras de polimerização e agente de união (silano) (VAN ENDE et al., 2012). A composição e versatilidade da matriz orgânica interferem na polimerização e no grau de conversão (MARGHALANI, 2010). O grau de conversão, é dado pela quantidade de monômeros convertidos em polímeros, após a completa polimerização do material, fator importante para obtenção de um bom material restaurador (BOING et al., 2011).

Dessa forma, os fabricantes dos compósitos Bulk Fill adicionaram fotoiniciadores mais reativos e com maior absorção luminosa, que possibilitam maior profundidade de cura; incluíram monômeros, que agem como moduladores da reação de polimerização; diminuíram a quantidade de partículas inorgânica, para maior passagem de luz; além de alterar a translucidez do compósito para proporcionar a conversão adequada de monômeros em polímeros (VELOSO et al., 2018; ROSATTOA et al., 2015; ILIE; BUCUT; DRAENERT, 2013).

Apesar de todas essas modificações, foi verificado que as resinas Bulk Fill condensadas, ainda apresentam grau de conversão inferior às resinas convencionais e superior às resinas de baixa viscosidade (LEPRINCE et al., 2014). Este fato favorece a formação de biofilme e dificuldade de remoção sobre as superfícies de resinas compostas, pela liberação de monômeros residuais não polimerizados (FLOREZ et al., 2016). Foi constatado que as resinas Bulk Fill possuem propriedades mecânicas inferiores as resinas convencionais, tais como micro-dureza superficial, resistência à fratura, resistência a flexão, módulo de elasticidade (RIBEIRO et al., 2017).

Outra característica importante, é a camada superficial das resinas compostas, uma vez que o aumento da rugosidade da superfície, resulta em um maior acúmulo de biofilme, fator associado ao fracasso deste tipo de restauração (GLAUSER et al., 2017; IONESCU et al., 2017; IONESCU et al., 2015; BRAMBILLA et al., 2012).

Não existem estudos, até o momento, sobre o crescimento e controle de micro-organismos (MO) em superfícies de resinas Bulk Fill, no entanto, devido as características do próprio material resinoso, é provável a maior colonização biofilme oral, sobre sua superfície (FLOREZ et al., 2016). Dentre os micro-organismos comuns na cavidade oral e propensos a causar infecções relacionadas aos biofilmes, estão os *staphylococcus aureus* (DOMENECH et al., 2013) e a cândida albicans (ZAW; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007).

O uso de produtos naturais (fitoterápicos) é eficaz na regulação da formação de biofilmes, tendo como vantagem a menor toxicidade e maior especificidade, quando comparados aos fármacos sintéticos (KIM et al., 2016). Surge então o interesse de estudar um colutório que possua atividades contra bactérias e fungos e possa ser aplicado na cavidade oral. Sendo o *Zingiber officinale* Roscoe eleito para esse estudo, por se enquadrar nos critérios desejados, possuir um frescor próprio da planta - que torna atrativo para aplicação oral - e por ainda não existirem formulações desenvolvidas para fins odontológicos.

O gengibre foi primeiramente descrito pelo botânico inglês William Roscoe (1753-1813) e é assim classificada: Reino *Plantae*; Divisão *Magnoliophyta*; Classe *Liliopsida*; Ordem *Zingiberales*; Família *Zingiberaceae*; Gênero *Zingiber*; Espécie *Z. officinale*, cujo nome científico é *Zingiber officinale* Roscoe (CORDEIRO et al., 2013). Proveniente da África do Sul e da Ásia, hoje uma planta muito cultivada para uso na indústria cosmética e de medicamentos. Disponível nas mais variadas formas: extrato fluido, extrato glicólico e em óleo essencial. Dentre as propriedades, estão as atividades: antiinflamatória, analgésica, antiemética, antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica (ELPO; NEGRELLE, 2004; CHAVES, 2012) e antibacteriana (CHAKOTIYA, TANWAR; NARULA, 2017).

Uma possibilidade de análise precisa de imagens de biofilmes pode ser realizada através da Tomografia por Coerência Óptica (OCT) que é uma técnica interferométrica de baixa coerência, bem estabelecida, que realiza imagens tomográficas de alta resolução, ultrarrápidas, não invasivas, transversais e livre da emissão de radiação ionizante

(ANDRADE et al., 2017; SHIMADA et al., 2015; MELO et al., 2005). Esta técnica óptica avalia padrões de interferência de luz de retroespalhamento para construir imagens, em profundidade, de estruturas biológicas (SUZUKI et al., 2010), transparentes e semitransparentes (MOTA et al., 2013). Tornando-se, uma opção na detecção de biofilme (HOU et al., 2019).

Em 1998 foi publicado o primeiro estudo aplicando OCT em Odontologia (FELDCHEIN et al., 1998), sendo bastante utilizado na área médica, em especial na oftalmologia. Esse sistema é capaz de gerar imagens em pequena profundidade e de alta resolução (COLSTON et al., 1998), através de ondas eletromagnéticas (MOTA et al., 2013), utilizando Diodos Super Luminescentes (SLDs) como fonte de luz (HALL; GIRKIN, 2004), que penetra a interface ar/tecido, gerando imagens com resolução micrométrica, cujo tempo de aquisição da imagem é inferior a um segundo.

Diante do exposto, este estudo teve como finalidade avaliar, por meio do OCT, a inibição de biofilmes orais com uso do fitoterápico *Zingiber officinale* em superfícies resinosas (Bulk Fill) e em esmalte dentário, levando-se em consideração as propriedades farmacológicas, devido aos compostos químicos presentes, no extrato glicólico das folhas da planta medicinal. Trata-se de um estudo inédito e de alta relevância clínica, uma vez que pretende elucidar o comportamento biológico de microrganismos patogênicos sobre resinas, comercialmente muito utilizadas, frente às características fitoterápicas de uma planta nativa brasileira e amplamente disponível, de baixo custo, sob o prisma de uma tecnologia precisa e inovadora.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do fitoterápico *Zingiber officinale* Roscoe sobre o crescimento de micro-organismos em resinas compostas Bulk Fill e esmalte dentário através da Tomografia por Coerência Óptica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos do fitoterápico *Zingiber officinale* Roscoe na inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* e da *Candida albicans* *in vitro* sobre superfícies lisas de resinas compostas Bulk Fill de alta viscosidade e esmalte dentário, comparando seus resultados com a aplicação tópica de clorexidina;

Constar se a viscosidade das resinas e seu tamanho médio das partículas inorgânicas (híbridas e nanohíbridas) influenciam no crescimento de microrganismos nas resinas Bulk Fill;

Comparar o crescimento da colonização do *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* por meio do OCT.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA



Figura 1. Fluxograma da metodologia

3.2 LOCAL DO ESTUDO

Este estudo foi pensado e desenvolvido no Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) na cidade de Campina Grande - PB, no Laboratório de Biofotônica e Materiais Aplicados à Saúde do Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA) na cidade de Caruaru - PE, e no Laboratório de Fotônica e Biofotônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife - PE.



Figura 2. Localização geográfica das cidades e centros universitários envolvidos (Fonte: Google Maps).

3.3 TIPO DE ESTUDO

Tratou-se de uma pesquisa experimental laboratorial *in vitro* com abordagem analítica (ANTUNES; PERES, 2006).

3.4 AMOSTRA

Foram utilizados esmalte dentário humano e dois tipos de resina para o estudo, descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Resinas compostas, fabricante, composição, classificação e técnica de uso.

RESINAS COMPOSTAS	FABRICANTE	LOTE	MATRIZ ORGÂNICA	CLASSIFICAÇÃO	FOTOATIVÇÃO
Tetric N-Ceram Bulk Fill	Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein	U33216	Bis-GMA; Bis-EMA; UDMA.	Híbrido	10 seg $\geq 1.000 \text{ mW/cm}^2$ Espessura máx do incremento: 4 mm
SonicFill	Kerr Corp., Orange, Califórnia, USA	6504838	Bis-GMA; Bis-EMA; TEGDMA.	Nanohíbrido	20 seg $>1000 \text{ mW/cm}^2$ Espessura máx do incremento: 5 mm

A resina Tetric N-Ceram Bulk Fill é uma resina padrão para pesquisa de Bulk Fill na literatura, por isso foram incluídas na amostra, além de apresentar sua forma de inserção de maneira tradicional e ser do tipo híbrida (LEPRINCE et al., 2014). A resina Sonic Fill é uma resina ainda pouco explorada, por seu elevado custo e por possuir um método de inserção diferente do convencional. Nela utiliza-se um dispositivo de vibração ultrassônica, por meio de uma peça de mão, que altera a sua viscosidade no momento de inserção na cavidade, promovendo maior escoamento e melhor adaptação da resina às paredes do preparo, além de ser do tipo nanohíbrida (ILIE, BUCUT, DRAENERT, 2013). Por esse

motivo o interesse de seu uso nesse estudo, para verificar se essa modificação de viscosidade e modo de aplicação, bem como sua classificação em híbrida ou nanohíbrida, teria alguma influência na adesão de biofilme.

Foi confeccionado uma amostra de 120 corpos de prova em Resina e 60 corpos de prova em esmalte dentário, n=10 por grupo estudado.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Resinas Bulk fill de alta viscosidade aprovadas pela ANVISA.

Colutório à base do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe).

Terceiros molares hígidos extraídos por indicação ortodôntica.

3.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Resinas Bulk fill do tipo Flow, ou que não permitam o seu uso para escultura da superfície oclusal.

Falhas ou bolhas visíveis nos corpos de prova.

Terceiros molares com cáries lesão de cárie ou associado a alguma patologia periodontal ou periapical.

3.7 VARIÁVEIS

As variáveis dependentes e independentes do estudo, estão representadas pela Figura 3. A variável resposta (dependente) foi o crescimento e inibição de microrganismo. As variáveis explicativas (independentes) foi estabelecida pelo tipo de intervenção para alcançar a inibição, tipos de superfícies a serem colonizadas e o método de diagnóstico foi através do OCT.

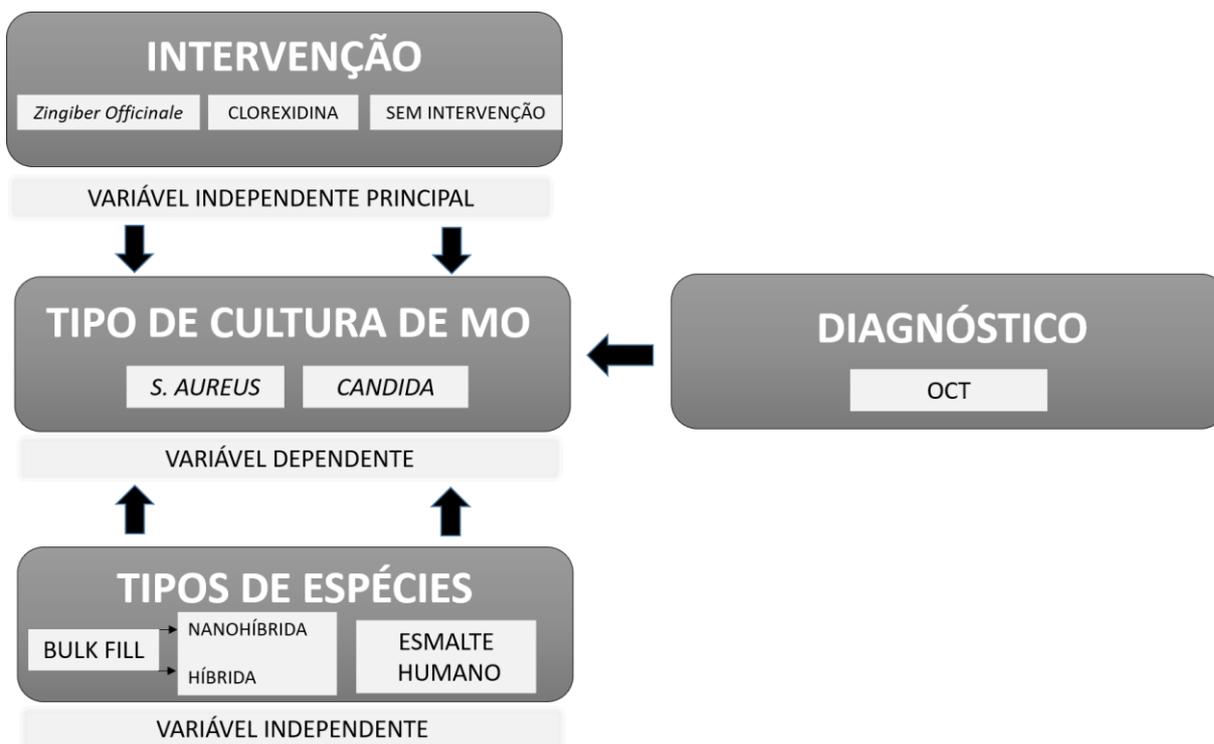


Figura3. Variáveis do estudo.

3.8 SELEÇÃO DOS MATERIAIS

Esta pesquisa analisou o potencial do *Zingiber officinale* no tocante à inibição do crescimento/aderência de microrganismos na superfície de resinas compostas de incremento único. Para tal, foram testadas sobre o esmalte dentário e resinas Bulk fill previamente apresentadas no Quadro 1.

Para controle microbiano, foi usado o *Zingiber officinale*, cujo potencial de ação será comparado à clorexidina a 0,12%.

O óleo essencial adicionado ao produto manipulado foi da empresa Ferquima, com aparência de líquido límpido, cor amarelo, isento de impurezas com origem da China conforme descrito em laudo técnico (ANEXO B).

3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS

As etapas de preparo das amostras, cultura de microrganismos, e aplicação do fitoterápico e plaqueamento foram realizadas, cada uma, por um único pesquisador, no intuito de evitar viés.

3.9.1 DIVISÃO E FORMAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO

Os grupos experimentais foram constituídos de acordo com o tipo de resina composta e método de controle do biofilme, conforme apresentado no Quadro 2. Também foi analisado o esmalte dentário humano (KIM, KANG WI, 2017), com a finalidade de avaliar a eficácia do *Zingiber officinale* sobre essa superfície.

Quadro 2. Composição dos grupos experimentais.

GRUPOS	SUBGRUPOS	TESTE E CONTROLE	NOMEAÇÃO
Esmalte humano (n = 60)	Cultura <i>Staphylococcus aureus</i> (n= 30)	<i>Zingiber officinale</i> (n= 10)	G1
		Clorexidina (n= 10)	G2
		Sem Intervenção (n= 10)	G3
	Cultura <i>Candida albicans</i> (n= 30)	<i>Zingiber officinale</i> (n= 10)	G4
		Clorexidina (n= 10)	G5
		Sem Intervenção (n= 10)	G6
Resina Híbrida Tetric N-Ceram Bulk Fill, Ivoclar (n = 60)	Cultura <i>Staphylococcus aureus</i> (n= 30)	<i>Zingiber officinale</i> (n= 10)	G7
		Clorexidina (n= 10)	G8
		Sem Intervenção (n= 10)	G9
	Cultura <i>Candida albicans</i> (n= 30)	<i>Zingiber officinale</i> (n= 10)	G10
		Clorexidina (n= 10)	G11
		Sem Intervenção (n= 10)	G12
Resina Nanohíbrida Sonic Fill, KERR (n = 60)	Cultura <i>Staphylococcus aureus</i> (n= 30)	<i>Zingiber officinale</i> (n= 10)	G13
		Clorexidina (n= 10)	G14
		Sem Intervenção (n= 10)	G15
	Cultura <i>Candida albicans</i> (n= 30)	<i>Zingiber officinale</i> (n= 10)	G16
		Clorexidina (n= 10)	G17
		Sem Intervenção (n= 10)	G18

3.9.2 CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

3.9.2.1 DISCOS DE RESINA COMPOSTA

Foram confeccionados discos de resina composta a partir de uma matriz pré-fabricada de teflon (Figura 4) com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, sendo confeccionadas 60 amostras para cada tipo de resina composta selecionada para este estudo (n=10 por grupo).



Figura. 4. Confeccção dos disco de resinas, a partir de uma matriz de teflon pré-fabricada.

O material resinoso foi inserido no interior da matriz e, sobre este, posicionado sobre uma lamínula de vidro a fim de nivelar o material na porção superior da matriz, eliminando os excessos e, conseqüentemente, evitando a formação de bolhas na superfície. Adicionalmente a lamínula de vidro, serviu para impedir o contato da resina composta com o oxigênio do ambiente no momento da reação de cura, de modo a assegurar maior grau de conversão.

Respeitou-se o tempo de fotoativação preconizado pelos respectivos fabricantes das resinas compostas. A fonte de luz empregada foi LED de alta potência VALO (Ultradent, Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Áustria), que emite radiação na faixa de 385 nm a 515 nm, com potência constante e irradiância de 1.200 mW/cm².

As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz durante 24h em água destilada à temperatura ambiente, para permitir a expansão higroscópica das mesmas e, então, foram submetidas aos procedimentos de acabamento e polimento de superfície. Padronizou-se a sequência de polimento para todos os espécimes, utilizando lixas d'água (3M, São Paulo, SP, Brasil) sob refrigeração constante em ordem decrescente de granulação (380 e 400) durante 30 segundos para cada lixa, com a finalidade de simular a rugosidade e polimento superficial da região oclusal dos dentes posteriores, local de indicação para uso das resinas Bulk Fill.

Após o polimento, os espécimes foram banhados em cuba ultrassônica (Ultrasonic Cleaner, Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA, Campo Mourão, Paraná, Brasil) por 15 minutos, e novamente armazenados em água destilada ao abrigo da luz sob as mesmas condições anteriormente descritas, visando à remoção dos resíduos granulosos das lixas e minimizar o impacto do monômero residual na viabilidade celular.

Por fim, para dar início às etapas experimentais do estudo os espécimes foram submetidos à esterilização em luz ultravioleta (UV): 256 µm por 60 minutos (FARRUGIA et al., 2015).

3.9.2.2 ESMALTE DENTÁRIO

O esmalte dentário foi extraído de coroas de dentes terceiros molares humanos, doados pelo Banco de Dentes do Centro Universitário Tabosa de Almeida da ASCES-UNITA (ANEXO C) e previamente desinfetados com Timol. Em seguida foram cortados em blocos de esmalte (n=60) medindo 5 mm x 5 mm x 2 mm com o auxílio de micromotor montado em peça reta (Modelo KaVo®, Joinville, Santa Catarina, Brasil) e disco flexível

diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo, SP-Brasil). E polidos com a mesma sequência de lixas que as amostras de resina composta, descrita anteriormente.

3.10 FORMULAÇÃO DO FITOTERÁPICO

A manipulação das substâncias químicas necessárias para o desenvolvimento farmacotécnico do produto foi realizada no Laboratório de Farmacologia (ASCES-UNITA, Caruaru, Pernambuco), onde após o desenvolvimento da formulação também foram realizados testes de estabilidade, densidade e pH.

Este modelo de fitoterápico a partir do óleo essencial de *Zingiber officinale* já passou por estudos prévios de desenvolvimento, estabilidade e testes físico-químicos, tendo sido aprovado em vários desses parâmetros na forma de gel (CORDEIRO et al., 2013). Entretanto como não existe formulação desenvolvida na forma de enxaguante bucal, as manipulações farmacêuticas para confecção do colutório nesse estudo, foram com finalidade de uso laboratorial, detalhada no Quadro 3.

Quadro 3. Composição do Fitoterápico.

COMPOSIÇÃO DO ENXAGUATÓRIO À PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE	
ÓLEO ESSENCIAL GENGIBRE	5%
PROPILENOGLICOL	10%
DUODECIL	0,3%
SACARINA	0,1%
NIPAGINO	2%
ÁGUA DESTILADA q.s.p	100%

Para desenvolvimento da formulação inicial, o duodecil foi solubilizado em propilenoglicol, sendo dissolvido pelo aquecimento gradativo em chapa aquecedora. Depois de completamente dissolvido, adicionou-se aos poucos, ainda sob aquecimento e agitação, o óleo essencial do gengibre, permanecendo em agitação e aquecimento até dissolução completa. Finalmente foi adicionado água destilada qsp e todo o complexo ficou sob agitação e aquecimento a 50 °C durante 3h. Sendo acondicionado em vidro âmbar, ao abrigo da luz, em ambiente arejado, até sua utilização.

3.11 APLICAÇÃO DO FITOTERÁPICO

O fitoterápico foi aplicado diretamente sobre a superfície a ser testada dos corpos de prova, durante o tempo de 24h, por ser um estudo *in vitro*.

3.12 MEIOS DE CONTROLE

Como controle positivo, foi utilizado a Clorexidina a 0,12% em solução aquosa, aplicadas nos corpos de prova, pelo mesmo tempo do experimento testado, por um período de 24 horas. E como controle negativo, utilizou-se caldo SD ou TSB estéril que foi aplicado nos grupos a serem testados, por igual período ao fitoterápico, 24h.

3.13 DESENVOLVIMENTO DE INÓCULOS E BIOFILMES /CONTAMINAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Para a contaminação das amostras, todos os grupos foram expostos em momentos distintos à inoculação de microrganismos, conforme Quadro 4. Utilizando para isso, uma bactéria e uma levedura comuns na cavidade oral, todas cedidas pelo Laboratório de Biofotônica e Materiais Aplicados em Odontologia da ASCES-UNITA.

Quadro 4. Microrganismos para inoculação dos grupos experimentais.

Micro-organismos	Identificação	Características Morfo-tintoriais
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Cocos Gram-positivos
<i>Candida albicans</i>	URM 6547	Leveduras

Os inóculos foram vertidos em 10mL de caldo Sabouraud dextrose (SD - KASVI Imp e Dist de Prod p/ Laboratórios Ltda. São José dos Pinhais - PR, lote: 011718503) para a levedura e caldo Triptona Soja (TSB - SIGMA-ALDRICH, Co. St. Louis, lote: BCBV7568) para a bactéria; após 24h foi realizada a padronização dos microrganismos inoculados na proporção de 1:10 (100 µL do inóculo crescido adicionados a 900 µL de

caldo Sabouraud dextrose (SD) para a levedura e 900 μ L caldo Triptona Soja (TSB) para a bactéria, em tubos falcon estéreis, dando o volume total de 1 mL para cada amostra, e em seguida adicionados os corpos de prova estéreis. Esses tubos foram incubados em por 48 horas para a levedura (35 °C) e 24 horas para a bactéria (37 °C) para formação inicial de biofilme. Em seguida foram realizadas trocas do meio, removendo 500 μ L contaminado e adicionando 500 μ L de caldo estéril a cada 24 h, até que se completassem 96 h de crescimento do biofilme (Figura 5).

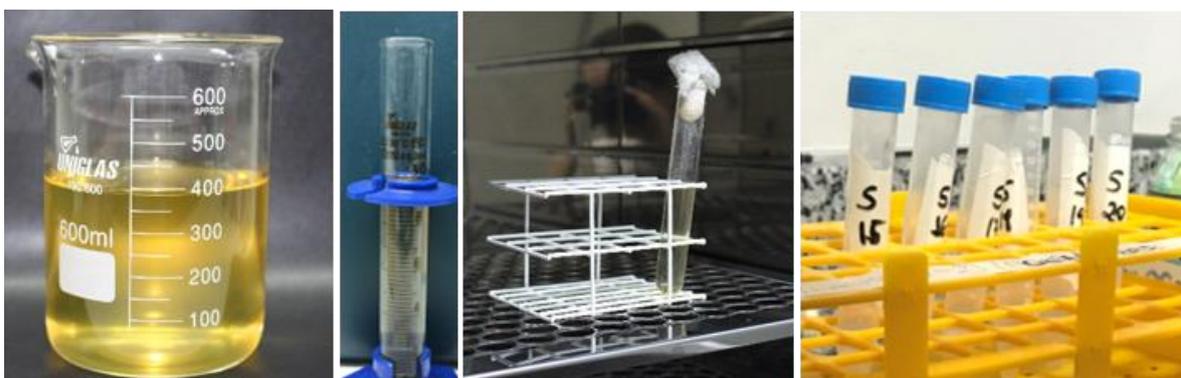


Figura 5. Padronização do inóculo e condições de armazenamento.

3.14 APLICAÇÃO DOS MEIOS DE TRATAMENTO E CONTROLE

Formadas as 96 h de crescimento de biofilme, os corpos de prova foram removidos, lavados com 1 mL de água destilada esterilizada, por face, e depois da leitura no OCT, foram colocados em novos tubos falcon estéreis contendo as soluções de tratamento (gengibre, clorexidina e um grupo sem intervenção, deixados no próprio caldo SD ou TSB estéril), ficando o fitoterápico em contato direto com as superfícies das resinas e esmalte durante o período de 24 h, armazenados em estufa microbiológica.

Em seguida foram pipetadas (Figura 6) em placa Petri estéril com Ágar Mueller Hinton (KASVI Imp e Dist de Prod p/ Laboratórios Ltda. São José dos Pinhais - PR, lote: 905161) para bactéria e Ágar Sabouraud 4% (ISO FAR - Indústria e comércio de produtos químicos Ltda. Duque de Caxias - RJ, lote: MC190216) para fungo, 10 μ L do caldo crescido, em triplicata para cada amostra, e armazenados em estufa a 35 °C para levedura e 37 °C para a bactéria, para análise em meio sólido, 24 h após armazenamento em estufa para bactéria e 48 h para fungo.

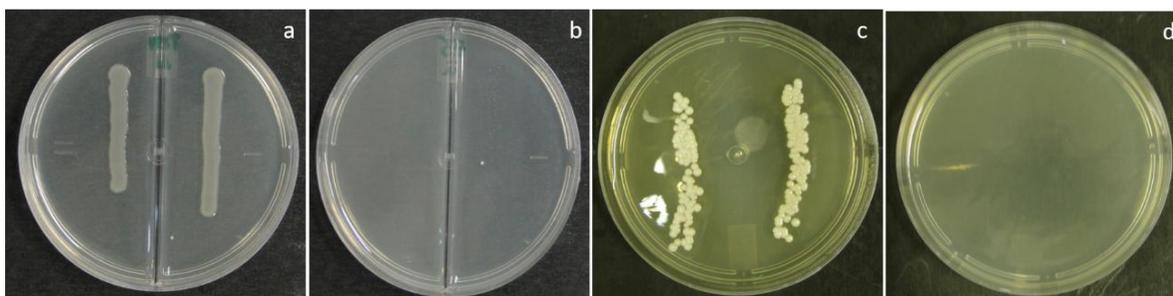


Figura 6. Plaqueamento em meio sólido a) Crescimento de *Staphylococcus aureus* com Ágar Mueller Hinton; b) Inibição de *Staphylococcus aureus* após aplicação de solução de tratamento; c) Crescimento de *Candida albicans* com Ágar Sabouraud; d) Inibição *Candida albicans* após aplicação de solução de tratamento.

Como controle, removeu-se 200 μL do caldo contaminado para confirmação de crescimento ou inibição de cada grupo testado, adicionando 30 μL de Rezazurina em placa de 96 poços (Figura 7).

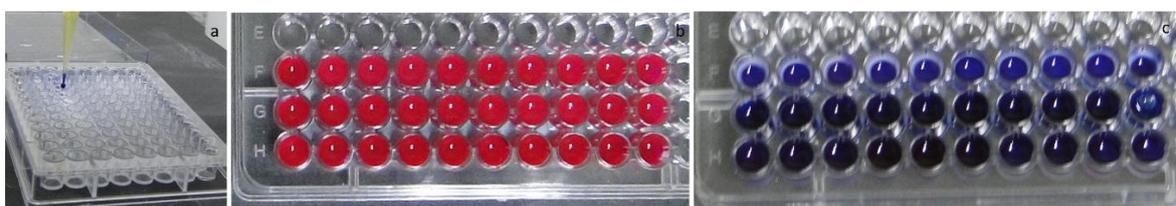


Figura 7. Controle por meio da Concentração Inibitória Mínima. a) uso da Rezazurina nos poços com o caldo a ser analisado; b) confirmação de crescimento dos grupos testados; c) confirmação de inibição do grupo submetidos ao tratamento.

3.15 ESCANEAMENTO DOS ESPÉCIMES ATRAVÉS DO OCT

Nesse estudo, foram utilizados dois sistemas de tomografia por coerência óptica: o Callisto (Thorlabs Inc, New Jersey, USA) e o LabScope (Lummedica, Durham, NC, USA), ambos disponíveis no Laboratório de Fotônica e Biofotônica do Departamento de Física da UFPE.

Ambos são sistemas de OCT que operam no domínio espectral, utilizando um diodo superluminescente como fonte de luz. O modelo comercial Callisto Spectral Domain OCT Imaging System, possui comprimento de onda central de 930 nm, 100 nm de largura de banda e 5 mW de potência de saída. Este sistema possui um espectrômetro com câmera CCD para coleta do sinal e geração de imagens transversais bi e tridimensionais, com resolução axial de 7/5,3 μm (ar/água) e resolução lateral de 8 μm . As imagens geradas

foram capturadas na forma de matrizes numéricas com 2000 colunas x 512 linhas. A frequência de varredura axial deste sistema é 1,2 kHz, o que permite a captura de duas imagens por segundo com 105 dB de sensibilidade (MOTA et al., 2013).

Já o modelo OQ LabScope é um sistema SD-OCT possui comprimento de onda central de 840 nm como fonte de luz e 0,75 mW de potência de saída. Imagens geradas por este sistema apresentam uma resolução lateral de 15 μm , resolução axial de 7 μm no ar e 100 dB de sensibilidade, com captura de 12 imagens por segundo, constituindo uma matriz numérica de 512 x 512 pixels e 7 mm de amplitude de varredura.

A captura de imagens de OCT foi realizada antes e após a inoculação de microrganismos e respectivos métodos de controle, buscando-se observar se havia alterações estruturais na superfície dos corpos de prova. As amostras foram fixadas perpendicularmente à fonte de luz, apoiadas em uma base metálica capaz de se deslocar nos eixos x e z com auxílio de um parafuso micrométrico, de modo a permitir o deslocamento da amostra com precisão (Figura 8).

Foi analisada apenas a face polida dos corpos de prova. Esta análise tem por intenção determinar o crescimento de microrganismo na superfície destes materiais.

Foram obtidas pelo Callisto, 10 imagens equidistantes para cada amostra (em três distintos tempos - estéril, crescido e tratado). E no OCT OQ LabScope, foram capturadas 30 imagens de cada amostra plaqueada em triplicata nos três momentos.

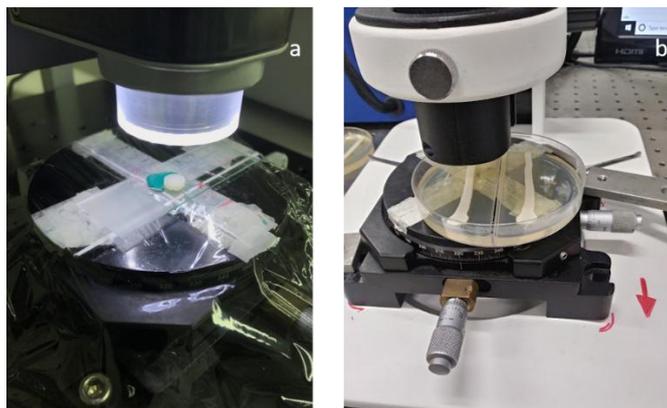


Figura 8. Escaneamento dos espécimes através do OCT. a) Disco de resina escaneado com Callisto; b) Placa de Petri escaneado com LabScope.

3.16 ANÁLISES QUANTITATIVAS DE BIOFILMES

As imagens capturadas foram processadas através do MatLab (KIM et al, 2018). Para processamento dos dados, foram usadas as imagens em formato tiff geradas pelo OCT

Labscope. Cada imagem corresponde a uma média de outras dez imagens obtidas a partir de uma mesma região e, portanto, já produzidas com redução de ruído, sem necessidade de filtragem.

O processamento das imagens foi realizado com um algoritmo produzido em linguagem MatLab para determinação da média da intensidade de sinal e cálculo da densidade óptica. Para determinação da intensidade de sinal, foi selecionada uma área imediatamente abaixo da interface ar-material, e calculada distribuição de sinal conforme o valor dos pixels (intensidade de branco). Já para determinação da densidade óptica, foi considerada a razão $I/Imáx$ em uma coluna específica, escolhida individualmente para cada imagem. Isto é, foi considerada a razão entre o pixel com intensidade máxima da amostra em função da intensidade sinal por profundidade. Isto foi realizado individualmente para as amostras estéreis, pós-crescimento de biofilme e pós-tratamento para inibição deste.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Foram calculadas a média e o desvio-padrão de cada grupo. A distribuição não normal foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se há diferença entre os grupos, foi usado o teste de Mann-Whitney para comparações entre dois grupos e o Teste de Kruskal Wallis com o Post-hoc de Dunn para comparações acima de três grupos. A significância estatística de todos os testes foi considerada como $p > 0,05$.

3.18 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi registrado na Plataforma Brasil, CAAE 10101019.4.0000.5187, seguindo as diretrizes estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS) (BRASIL, 2012), e submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) com Seres Humanos da UEPB no tocante ao uso de dentes humanos pós-exodontias, sendo aprovado sob o número 3.251.657 (ANEXO A)

4. RESULTADOS

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação: “Inibição de microrganismos em resinas compostas bulk fill com uso de fitoterápico *Zingiber officinale*”.

O referido artigo será submetido ao periódico *Scientific Reports* (ISSN:2045-2322, Fator de impacto: 4.011, Qualis Odontologia A1), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram no ANEXOD.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Avaliação da inibição de microrganismos em resinas compostas bulk fill com uso de fitoterápico *Zingiber officinale* Roscoe

Running title:

Inhibition evaluation of microorganisms in bulk fill composite resins using herbal medicine *Zingiber officinale* Roscoe

Pettely Thaíse de Souza Santos Palmeira¹, Nathália Alexandre Eloy Lins², Maria Carolina Oliveira Lins², Renan Lennon Silva Henrique², Mayra Macêdo de Aquino³, Patrícia Lins Azevedo do Nascimento², Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo², Sérgio de Lemos Campello⁴, Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota², Anderson Stevens Leônidas Gomes^{3,5}, Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão*¹

¹ Universidade Estadual da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Rua Baraúnas, 351, 58429-500, Campina Grande, Brasil.

² Centro Universitário Tabosa de Almeida, Curso de Odontologia, Av. Portugal, 584, 55016-400, Caruaru, Brasil.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Av. Professor Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Brasil.

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Campus do Agreste, Núcleo Interdisciplinar de Ciências Exatas e Inovação Tecnológica, Av. Campina Grande s/n, 55014-900, Caruaru, Brasil.

⁵ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Física, Av. Professor Luiz Freire s/n, 5670-901, Recife, Brasil.

Corresponding author

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúnas, 531 – Bairro Universitário – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-500 Phone/Fax:+55 83 3315-3471

e-mail: mhelenact@zipmail.com.br

Resumo

A cavidade bucal é um dos locais em que há uma maior variedade de micro-organismos que podem por um desequilíbrio, tornar-se patogênicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fitoterápico *Zingiber officinale* Roscoe sobre o crescimento e aderência de micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* *in vitro* sobre superfícies lisas de resinas compostas Bulk Fill de alta viscosidade e esmalte dentário, comparando seus resultados com a aplicação tópica de clorexidina. Para isso, foi realizada uma pesquisa experimental laboratorial *in vitro* com abordagem analítica, com duas resinas do tipo Bulk Fill condensáveis Tetric N-Ceram Bulk Fill - Ivoclar (híbrida), Sonic Fill -Kerr (nanohíbrida) e o esmalte humano, sob a ação do *Zingiber officinale* Roscoe, clorexidina e a não intervenção. Foram utilizados dois sistemas de tomografia por coerência óptica (OCT): o Callisto (Thorlabs Inc, New Jersey, USA) e o LabScope (Lumedita, Durham, NC, USA) para escanear todas as imagens. A amostra total foi de 180 corpos de prova, tendo n = 10 por grupo, sendo obtidas 10 imagens de cada corpo de prova e 30 imagens de cada plaqueamento, ambos em três momentos distintos, estéreis, crescido e tratado. O processamento das imagens foi realizado com um algoritmo produzido em linguagem MatLab para determinação da média da intensidade de sinal e cálculo da densidade óptica, usando as imagens em formato tiff geradas pelo OCT Labscope. Foram calculadas a média e o desvio-padrão de cada grupo, utilizado o teste de Mann-Whitney e de Kruskal Wallis. Após análise, verificou-se que nos três tipos de superfícies, tanto a clorexidina, como o *Zingiber officinale* Roscoe foram efetivos na inibição de *S. Aureuse* e *C. Albicans*. A resina do tipo híbrida apresentou menor crescimento de biofilme quando comparadas a nanohíbrida quando tratadas por meio dos enxaguantes analisados. Sendo o *Zingiber officinale* Roscoe um método eficaz e viável para controle e inibição microbiana.

Palavras chaves: Tomografia de Coerência Óptica; Resina composta; Ação antibacteriana; Biofilme; *Zingiber officinale*.

Introdução

O uso de resinas compostas na odontologia é bastante abrangente, sendo considerado o material restaurador direto mais utilizado devido as suas excelentes propriedades estéticas e crescente procura por tratamentos minimamente invasivos^{1,2}. Com o intuito de simplificar o uso dos compósitos dentários para dentes posteriores³ (ROSATTOA et al., 2015), foram desenvolvida as Resinas Bulk Fill, que possuem partículas de cargas que atuam permitindo a maior penetração de luz durante a reação de cura⁴ (PAR et al., 2018), deixando de lado características importantes como fator C e técnica incremental, reduzindo assim o tempo de trabalho⁵.

Para facilitar a propagação de luz em profundidade, outras modificações foram realizadas nas resinas Bulk fill, dentre elas: (1) aumento da translucidez do compósito; (2) redução do número de partículas inorgânicas; (3) adição de fotoiniciadores com absorção luminosa com maior profundidade de cura; (4) inclusão de monômeros de alto peso molecular para reduzir a contração de polimerização^{6,7}.

Apesar da diminuição do tempo de trabalho através do uso de volumes grandes de material, as resinas Bulk fill deixam a desejar quando se trata das propriedades mecânicas, como microdureza superficial, resistência à fratura, resistência à flexão, módulo de elasticidade e grau de conversão, sendo inferiores às resinas convencionais⁵. Bem como surge a preocupação com a rugosidade superficial destas resinas, afinal o aumento da rugosidade resulta em maior formação de biofilme⁸.

Por ser considerada uma resina relativamente nova no mercado, ainda não há estudos em relação à aderência de microrganismos em sua superfície e suspeita-se que por seu grau de conversão ser inferior, haja uma maior aderência de biofilme – o que é um risco, uma vez que as resinas Bulk fill são indicadas para uso em dentes posteriores que, por sua vez, são mais propícios à formação de biofilme por sua localização e dificuldade de acesso. Inúmeros trabalhos *in vitro*^{9,10,11,12,13} buscaram meios de controlar ou inibir a colonização de biofilme nas superfícies lisas ou rugosas de resinas compostas convencionais e com isso, diminuir a incidência de lesões bucais como cáries recorrentes e doenças periodontais.

Os estafilococos estão entre as espécies de bactérias que são mais propensas a causar infecções relacionadas ao biofilme¹⁴. Outro microrganismo capaz de formar biofilme é a *Candida*, que tem como uma das principais características a capacidade de virulência, a versatilidade de adaptação a diferentes habitats e a formação de comunidades microbianas

ligado à superfície¹⁵. Nesse contexto, desponta a necessidade de um produto (Ex.: colutório ou gel) que apresente características antimicrobianas, de baixo custo, que possam ser aplicadas sobre estruturas dentárias e/ou restaurações a fim de promover equilíbrio entre saúde-doença na cavidade bucal, e em especial de pacientes com dificuldades motoras para higiene mecânica convencional.

Sabe-se que os produtos naturais (fitoterápicos) são eficazes na regulação da formação de biofilmes, tendo como vantagem a menor toxicidade e maior especificidade, quando comparados aos fármacos sintéticos¹⁶. Destaca-se então o gengibre, cujo nome científico é *Zingiber officinale* Roscoe, pertencente à família Liliaceae, proveniente da África do Sul e da Ásia, hoje uma planta muito cultivada para uso na indústria cosmética e de medicamentos. Dentre as propriedades do gengibre estão as atividades antiinflamatória, antiemética, antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica^{17,18,19} e antibacteriana¹⁹. O *Zingiber officinale* está presente em várias formulações anti-inflamatórias e analgésicas, nas mais variadas formas: extrato fluido, extrato glicólico e, também, disponível em óleo essencial. Entretanto, não existe até o momento formulações para seu uso na forma de enxaguante bucal.

Uma possibilidade de análise de biofilme é por meio da Tomografia de Coerência Óptica (OCT), que é considerado uma das mais importantes categorias de imagem em biofotônica²⁰. Trata-se de uma técnica interferométrica de baixa coerência bem estabelecida, que gera imagens tomográficas de alta resolução, ultrarrápidas e não invasivas^{21,22}. Esta técnica óptica avalia padrões de interferência de luz retroespalhada para construir imagens, de estruturas biológicas, com pequena profundidade de penetração^{23,24,25,26}. Embora raramente aplicada, esta técnica de imagem pode ser uma opção na detecção de biofilme^{27,22} já que foi desenvolvida como um método de geração de imagens para estruturas transparentes e semitransparentes²⁸.

Diante do exposto, este estudo terá como finalidade avaliar por meio da tomografia de coerência óptica, os efeitos de um fitoterápico no processo de aderência e crescimento microbiológico em superfície resinosa (Bulk Fill) e sobre o esmalte dentário humano, levando-se em consideração as propriedades farmacológicas devido aos compostos químicos presentes no extrato glicólico das folhas da *Zingiber officinale*. Trata-se de um estudo inédito e de alta relevância clínica, uma vez que pretende elucidar o comportamento biológico de micro-organismos patogênicos sobre resinas largamente utilizadas frente às características fitoterápicas de uma planta nativa brasileira e amplamente disponível, de baixo custo, sob o prisma de uma tecnologia precisa e inovadora.

Materiais e Métodos

Considerações Éticas

Trata-se de uma pesquisa experimental laboratorial *in vitro* com abordagem analítica²⁹ (ANTUNES; PERES, 2006), com molares humanos doados pelo Banco de Dentes do Centro Universitário Tabosa de Almeida, após aprovação pela Comissão de Ética CAAE: 10101019.4.0000.5187 (Parecer: 3.251.657), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Confecção dos Corpos de Prova

Duas resinas compostas foram selecionadas, apresentadas no Quadro 01. A Tetric N-Ceram Bulk Fill (TET) é considerada padrão ouro na literatura para pesquisas com resinas Bulk Fill, por ser do tipo híbrida, cuja forma de uso consiste na inserção de um único incremento com até 5 mm de espessura^{5,7}. A Sonic Fill (SON), por sua vez, é uma resina nanohíbrida, cujo método de inserção difere das demais resinas Bulk fill, uma vez que faz-se necessário o uso de um dispositivo de vibração ultrassônica, por meio de uma peça de mão, que altera a sua viscosidade no momento de inserção na cavidade, promovendo maior escoamento e melhor adaptação da resina às paredes do preparo⁷.

Foram confeccionados 120 discos de resina composta a partir de uma matriz pré-fabricada de teflon com 8 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Para isso, o material resinoso foi inserido no interior da matriz e, sobre este, foi posicionada uma lamínula de vidro a fim de nivelar o material na porção superior, eliminando os excessos e, conseqüentemente, evitando a formação de bolhas na superfície. Adicionalmente a lamínula de vidro serviu para impedir o contato da resina composta com o oxigênio do ambiente no momento da reação de cura, de modo a assegurar maior grau de conversão.

Respeitou-se o tempo de fotoativação preconizado pelos respectivos fabricantes das resinas compostas: 20 segundos por face. A fonte de luz empregada foi o LED de alta potência VALO (Ultradent, Vivadent, Schaan, Liechtenstein, Áustria), que emite radiação na faixa de 385 nm a 515 nm, com potência constante e irradiância de 1.200 mW/cm².

As amostras foram armazenadas ao abrigo da luz durante 24h em água destilada à temperatura ambiente, para permitir a expansão higroscópica das mesmas e, então, foram submetidas aos procedimentos de acabamento e polimento de superfície. Padronizou-se a seqüência de polimento para todos os espécimes, utilizando lixas d'água (3M, São Paulo,

SP, Brasil) sob refrigeração constante em ordem decrescente de granulação (380 e 400) durante 30 segundos para cada lixa.

Após o polimento, os espécimes foram banhados em cuba ultrassônica (Ultrasonic Cleaner, Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA, Campo Mourão, Paraná, Brasil) por 15 minutos, e novamente armazenados em água destilada ao abrigo da luz sob as mesmas condições anteriormente descritas, visando à remoção dos resíduos granulosos das lixas e minimizar o impacto do monômero residual na viabilidade celular.

O esmalte dentário (ESM) foi obtido a partir de terceiros molares humanos, doados pelo Banco de Dentes da ASCES-UNITA, previamente desinfetados em timol. As coroas foram seccionadas para obtenção de blocos de ESM (n=60) a partir da face vestibular dos dentes, medindo 5 mm x 5 mm x 2 mm com o auxílio de micromotor montado em peça reta (Modelo KaVo®, Joinville, Santa Catarina, Brasil) e disco flexível diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo, SP-Brasil). Em seguida foram polidos com a mesma sequência de lixas que as amostras de resina composta, descrita anteriormente.

Por fim, para dar início às etapas experimentais do estudo os espécimes foram submetidos à esterilização em luz ultravioleta (UV): 256 µm por 60 minutos³⁰ (FARRUGIA et al., 2015) e divididos em grupos conforme o quadro 2.

Formulação do Fitoterápico

Foi desenvolvido um enxaguante bucal a partir do óleo essencial de *Zingiber officinale*, (Ferquima Ind. e Comércio, Lote FERQ103, Vargem Grande Paulista, SP), com aparência de líquido límpido, cor amarelo, isento de impurezas com origem da Costa do Marfim. O produto foi desenvolvido com finalidade de uso laboratorial, e foi composto por óleo essencial a 5%, propilenoglicol a 10%, duodecil a 0,3%, sacarina a 0,1%, nipagino a 2% e água destilada q.s.p. 100%. Para isso, o duodecil foi solubilizado em propilenoglicol, sendo dissolvido pelo aquecimento gradativo em chapa aquecedora. Depois de completamente dissolvido, adicionou-se aos poucos, ainda sob aquecimento e agitação, o óleo essencial do *Zingiber officinale*, permanecendo em agitação e aquecimento até dissolução completa. Finalmente foi adicionado água destilada qsp e todo o complexo ficou sob agitação e aquecimento a 50°C durante 3h. Sendo acondicionado em vidro âmbar, ao abrigo da luz, em ambiente arejado, até sua utilização.

Estirpes bacterianas, condições de crescimento e controle

Os micro-organismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (URM 6547), comuns na cavidade oral, foram utilizados de forma isolados. Após esterilização em luz ultravioleta, os corpos de prova de resina composta dos 18 grupos estudados foram dispensados individualmente em tubos tipo falcon estéreis de 15 mL e imersos num volume de 1 mL de inóculo padronizado em 10^6 UFC/mL para cada micro-organismo. Os meios de cultura utilizados foram caldo Sabouraud Dextrose (SD) (KASVI Imp e Dist de Prod p/ Laboratórios Ltda. São José dos Pinhais - PR, lote: 011718503) para a levedura e caldo Triptona Soja (TSB) (SIGMA-ALDRICH, Co. St. Louis, lote: BCBV7568) para a bactéria. Os tubos contendo inóculo padronizado e corpos de prova foram incubados em estufa microbiológica por 96 horas a 35 °C para a levedura e 24 horas a 37 °C para a bactéria.

Em seguida, as alíquotas de 10µL do caldo crescido foram pipetadas em placa Petri estéril com Ágar Mueller Hinton (KASVI Imp e Dist de Prod p/ Laboratórios Ltda. São José dos Pinhais - PR, lote: 905161) para bactéria e Ágar Sabouraud Dextrose 4% (ISOFAR - Indústria e comércio de produtos químicos Ltda. Duque de Caxias - RJ, lote: MC190216) para a levedura em triplicata. As placas foram incubadas em estufa por 24 h (37 °C) e 48 h (35 °C) para a bactéria e levedura respectivamente, em condições estáticas, a fim de formar biofilme, para análise em meio sólido²⁷.

Como controle, removeu-se 200 µL do caldo contaminado para confirmação de crescimento ou inibição de cada grupo testado, adicionando 30 µL de Rezazurina (Rezazurina sodium salt, SIGMA Aldrich Brasil Ltda. Cotia-SP, Lote: SHBL0708) em placa de microtitulação 96 poços pela técnica da Concentração Inibitória Mínima, armazenados em estufa microbiológica e realizado leitura final com 2h e 24h de armazenamento.

Decorrido esse período, os corpos de prova foram removidos dos tubos e lavados com 1 mL de água destilada esterilizada por face, e os biofilmes foram escaneados através do OCT para dar sequência às etapas subsequentes²⁷. Em seguidas, foram colocados em novos tubos falcon estéreis contendo as soluções de tratamento – colutório *Zingiber officinale*(ZIN), clorexidina (CLX) e um grupo sem intervenção (NI), deixados no próprio caldo SD ou TSB estéril - ficando o fitoterápico em contato direto com as superfícies das resinas e esmalte durante o período de 24 h, armazenados em estufa microbiológica. Logo após, foram feitos novos plaqueamentos em placa Petri, nas mesmas condições citadas anteriormente, para avaliar se houve inibição após exposição aos meios de tratamento.

Como meio de controle desta etapa, repetiu-se a técnica da Concentração Inibitória Mínima, cuja placa de microtitulação ficou armazenada em estufa microbiológica e realizou-se leitura final após tempo pré-determinado.

Medições de OCT e análise de intensidade de sinal de imagens 2D de OCT

OCT foi escolhido como método de analisar a morfologia transversal de cada disco ou espécime coberto por biofilme³¹. Possui alta velocidade, sensibilidade e é a tecnologia de última geração para análise *in vivo*^{32,33}. As análises foram realizadas por meio do sistema OCT que fornece informações detalhadas das estruturas com base na avaliação da luz refletida e retroespalhada da amostra^{23,24,26}.

Neste estudo, os biofilmes foram escaneados por dois sistemas de tomografia por coerência óptica: Callisto Spectral Domain OCT Imaging (Callisto SD-OCT, Thorlabs Inc, New Jersey, USA) e o LabScope (Lumetica, Durham, NC, USA), ambos operando no domínio espectral.

O modelo comercial Callisto SD-OCT utiliza um diodo superluminescente emitindo 930 nm de comprimento de onda central, com 100 nm de largura de banda e 5 mW de potência de saída. Este sistema possui um espectrômetro com câmera CCD para captura do sinal e gera imagens transversais bi e tridimensionais, com resolução axial de 7/5,3 μm (ar/água) e resolução lateral de 8 μm . As imagens geradas foram capturadas na forma de matrizes numéricas com 2000 colunas x 512 linhas. A frequência de varredura axial deste sistema é 1,2 kHz, o que permite a captura de duas imagens por segundo com 105 dB de sensibilidade^{27,28,32}.

Enquanto, o modelo OQ LabScope é um sistema SD-OCT que usa um diodo superluminescente com comprimento de onda central de 840 nm como fonte de luz e 0,75 mW de potência de saída. Imagens geradas por este sistema apresentam uma resolução lateral de 15 μm , resolução axial de 7 μm no ar e 100 dB de sensibilidade, com captura de 12 imagens por segundo, constituindo uma matriz numérica de 512 x 512 pixels e 7 mm de amplitude de varredura.

A captura de imagens do Callisto SD-OCT foi realizada antes e após a inoculação de micro-organismos e aplicação dos respectivos métodos de controle, buscando-se observar se havia alterações estruturais na superfície dos corpos de prova. As amostras foram fixadas perpendicularmente à fonte de luz, apoiadas em uma base metálica capaz de se deslocar nos eixos x e z com auxílio de um parafuso micrométrico, de modo a permitir o deslocamento da amostra com precisão. Foi analisada apenas a face polida dos corpos de

prova. Foram coletadas 10 imagens 2D aleatórias de cada amostra de resina e esmalte dentário e armazenadas em computador para posterior análise. Esta análise teve por intenção determinar o crescimento ou inibição de micro-organismo na superfície destes materiais.

Foi realizado também o escaneamento das amostras de biofilme crescido e inibido em placas de Petri com o OCT OQ LabScope, seguindo metodologia proposta por HOU & cols.(2019)²⁷. Para estas amostras foram selecionadas três imagens de localizações distintas em formato tiff, cada uma delas composta por uma média de 10 imagens do mesmo local.

Portanto, foram obtidas pelo Callisto Spectral, 10 imagens 2D (Fig. 1) equidistantes para cada amostra (em três momentos distintos – estéril, crescido e inibida). E no OCT OQ LabScope, foram capturadas 30 imagens 2D (Fig. 2) de cada amostra plaqueada em triplicata, nos mesmos tempos supracitados.

Análises das imagens do OCT

As imagens capturadas foram processadas através do MatLab³². Para processamento dos dados, foram usadas as imagens em formato tiff geradas pelo OCT Labscope. Cada imagem corresponde a uma média de outras dez imagens obtidas a partir de uma mesma região e, portanto, já produzidas com redução de ruído, sem necessidade de filtragem. O processamento das imagens foi realizado com um algoritmo produzido em linguagem MatLab para determinação da média da intensidade de sinal e cálculo da densidade óptica. Para determinação da intensidade de sinal, foi selecionada uma área imediatamente abaixo da interface ar-material, e calculada distribuição de sinal conforme o valor dos pixels (intensidade de branco). Já para determinação da densidade óptica, foi considerada a razão $I/Imáx$ em uma coluna específica, escolhida individualmente para cada imagem. Isto é, foi considerada a razão entre o pixel com intensidade máxima da amostra em função da intensidade sinal por profundidade. Isto foi realizado individualmente para as amostras estéreis, pós-crescimento de biofilme e pós-tratamento para inibição deste.

Análises Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.). Foram calculadas a média e o desvio-padrão de cada grupo. A distribuição não normal foi determinada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se há diferença entre os grupos, foi usado o teste de Mann-Whitney para comparações entre dois

grupos e o Teste de Kruskal Wallis com o Post-hoc de Dunn para comparações acima de três grupos. A significância estatística de todos os testes foi considerada como $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A tomografia por coerência óptica é um método viável e seguro para estudo e medição da espessura e morfologia de biofilmes^{34,35,36,37,38,39}.

De acordo com a metodologia proposta, foi identificado que o biofilme se apresenta no OCT de maneira distinta dependendo do tipo de micro-organismo e do meio de cultura (Fig. 1 e 2). Por isso, nesta pesquisa, as imagens foram coletadas de duas formas: direta, sobre as amostras de resina e esmalte dentário com uso do Callisto e de forma indireta, em placas Petri, para análise de biofilme, usando o OCT OQ LabScope, pois desta maneira não haveria influência de água sobre a superfície do biofilme, caracterizado como um problema na análise do OCT ao comparar diferentes espécies de biofilme ou substratos. Uma vez que a presença de água, interfere na intensidade de sinal e escala de valor de cinza associada, podendo ser maior ou menor, dependendo da espécie^{27,40,41}.

Como o OCT mede a intensidade de luz que se propaga através da amostra, foi possível comparar as médias de intensidade a partir das áreas hachuradas (Fig. 1 e 2), determinando os valores médios das intensidades de sinal amostras estéreis, expostas ao crescimento e ao tratamento, onde foi constatada inibição de crescimento de biofilme frente aos micro-organismos testados. A partir disso, foi possível também mensurar a intensidade óptica, que é dada pela intensidade de sinal do OCT em função da concentração microbiológica²⁷, que foram realizadas a partir das amostras estéreis, pós crescimento e pós tratamento de inibição (Fig. 3 e 4).

A partir das mensurações de intensidades ópticas pelo OCT, foi possível traçar uma análise das médias de inibição intragrupos (Tabela 1) que revelou que as colônias de *Staphylococcus aureus* e *Candida Albicans*, nos grupos ZIN e CLX apresentaram os menores valores médios de crescimento de biofilme, quando comparados ao grupo NI. Este padrão se repetiu nas três diferentes superfícies estudadas o que corrobora com a hipótese de que ambos os enxaguantes demonstraram padrões similares de inibição de crescimento.

Na superfície ESM o teste de Kruskal-Wallis demonstrou que os tratamentos com ZIN e CLX apresentaram diferenças significativas ($< 0,0001$), em relação ao grupo controle negativo NI (Tabela 1). Entretanto, não foi encontrada significância entre os enxaguantes bucais ZIN e CLX sendo ambos efetivos na inibição de *S. Aureus* e *C. Albicans*. Dessa

forma, os dados sugerem que o ZIN possa se tornar uma alternativa viável, natural, de poder bactericida e fungicida⁴¹, de acordo com esse ensaio *in vitro*.

Ainda na Tabela 1, na avaliação da superfície de resina híbrida TET, foi constatado a menor colonização de biofilmes sobre esta superfície, comparada ao ESM, cujas intervenções com os enxaguantes bucais testados mostraram diferenças significativas ($<0,0001$). Já em relação à superfície nanohíbrida SON, foram vistos maior crescimento de biofilme em todos os grupos testados, sendo estatisticamente significativo ($<0,0001$).

Ao fazer a análise extragrupo (tipo de intervenção x superfícies), foi verificado comportamento similar entre os micro-organismos testados, frente aos grupos de tratamento, cuja intervenção CLX mostrou os menores valores quando comparadas aos demais, e o grupo NI apresentou as maiores médias (Tabela 2). Na intervenção com ZIN observa-se uma menor média no grupo ESM, com $2,548E+03$; e a maior na resina SON $6,643E+03$. Estas diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). Quando comparada a ação do ZIN nas diferentes superfícies observou-se que não houve diferenças significativas entre o ESM e a TET. Entretanto, houve diferenças entre o ESM e a SON, e entre as resinas. Sugere-se, portanto, que a resina Tetric N-Ceram Bulk Fill possua uma lisura superficial e, conseqüentemente, comportamento semelhante ao esmalte dentário.

Na intervenção CLX pode-se observar (Tabela 2) que a menor média é na superfície ESM, seguido de TET e com o maior valor a SON ($p < 0,0001$). Esperava-se que as resinas do tipo nanohíbrida tivessem menor adesão e crescimento de biofilme, no entanto na análise do grupo NI observa-se maior intensidade de sinal na SON, seguida do ESM e a menor TET. Mostrando que a resina TET do tipo híbrida possui o menor crescimento de biofilme entre as superfícies testadas. O teste de Dunn revelou que houve diferenças entre o ESM e a SON, e entre as resinas ($p < 0,0001$). Não foi encontrada diferenças significantes entre ESM e TET, confirmando o maior crescimento de biofilme sobre as resinas SON do tipo nanohíbrida.

Em estudo prévio⁴³, é sugerido que o padrão da superfície não influenciaria na formação de biofilme. Entretanto, vai de encontro ao que foi verificado nesta pesquisa, uma vez que o tipo de partícula, nanohíbrida ou híbrida, bem como a viscosidade do material, alterou de forma significativa no maior crescimento e colonização de biofilme.

Isso, também, pode ser justificado pela rugosidade de superfície das Resinas Bulk Fill, que aumentam a capacidade de retenção de biofilme sobre as resinas em comparação ao esmalte, pois diferenças na adesão do biofilme podem ser atribuídas a variados níveis de rugosidade superficial^{8,42}.

Outro fator que pode estar associado a diferença de biofilme em distintas superfícies resinosas é a reação de cura, uma vez que havendo reação de cura incompleta, já aumentaria a capacidade de retenção de biofilme, sugerindo que as Resinas Bulk Fill tenham um grau de conversão menor que o desejado⁵.

Avaliou-se o crescimento e a inibição nas diferentes colônias (*Staphylococcus aureus* x *Candida albicans*) nos grupos de inibição (ZIN e CLX) e crescimento (NI) em relação ao tipo de colônia utilizado (Tabela 3). Foram encontradas diferenças estatísticas em todos os grupos das superfícies de resina, onde verificou-se que o crescimento da *Candida albicans* foi estatisticamente superior ao *Staphylococcus aureus* ($p < 0,001$). Enquanto nos grupos testados da superfície de ESM não foi encontrada significância entre a intervenção e o tipo de colônia utilizado ($p > 0,05$).

Apesar de não haver outros estudos prévios na literatura com *Zingiber Officinale* na aplicação oral, bem como na inibição de micro-organismos sobre superfícies, não foi possível comparar os resultados obtidos nessa pesquisa com estudos bases, pois para nosso conhecimento este é o primeiro estudo que utiliza o *Zingiber Officinale* como enxaguante bucal com fins de controle e inibição de biofilme, o que faz desta pesquisa um estudo inédito. Tal descoberta, torna-se importante tanto pelo poder de inibição do *Zingiber Officinale* frente a micro-organismos, assim como o fato de se tornar uma alternativa fitoterápica de baixo custo, efeitos colaterais e contra-indicação.

Conclusões

Foi apresentada uma nova opção fitoterápica à base de *Zingiber officinale*, eficaz na inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* e da *Candida albicans*, *in vitro*, sobre superfícies lisas de resinas compostas Bulk Fill de alta viscosidade e esmalte dentário.

A resina Sonic Fill apresentou pior desempenho, com maior crescimento e adesão de biofilme e menor resposta à intervenção. Já a resina TetricN-Ceram Bulk Fill se comportou de forma semelhante ao esmalte dentário, agregando menos biofilme sobre sua superfície.

Houve maior deposição de biofilme por *Candida albicans* do que por *Staphylococcus aureus* nas superfícies resinosas, se comparado ao esmalte dentário que apresentou padrão semelhante de deposição de microorganismo.

Referências

1. Ionescu, A.C. *et al.* Streptococcus mutans adherence and biofilm formation on experimental composites containing dicalcium phosphate dihydrate nanoparticles. *J Mater Sci: Mater Med.* **28**, 108-119 (2017).
2. Heintze, S.D. & Rousson, V. Clinical effectiveness of direct class II restorations - a meta-analysis. *J Adhes Dent.* **14**, 407-31 (2012).
3. Rosatto, C.M.P., *et al.* Mechanical properties, shrinkage stress, cuspal strain and fracture resistance of molars restored with bulk-fill composites and incremental filling technique. *Journal of Dentistry.* **43**, 1519-1528 (2015).
4. Par, M. *et al.* Real-time Light Transmittance Monitoring for Determining Polymerization Completeness of Conventional and Bulk Fill Dental Composites. *Operative Dentistry.* **43**, 19-31 (2018).
5. Leprince J.G. *et al.* Physico-mechanical characteristics of commercially available bulk-fill composites. *J Dent.* **42**, 993-1000 (2014).
6. Veloso, S.R.M., *et al.* Clinical performance of bulk-fill and conventional resin composite restorations in posterior teeth: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations.* (2018). Disponível em: <https://doi:10.1007/s00784-018-2429-7>, acessado em 03 de maio de 2018.
7. Ilie, N., Bucuta, S. & Draenert, M. Bulk-fill resin-based composites: an *in vitro* assessment of their mechanical performance. *Operative Dentistry*, **38**, 618-625 (2013).
8. Glauser, S. *et al.* Bacterial colonization of resin composite cements: influence of material composition and surface roughness. *Eur J Oral Sci.* **125**, 294-302 (2017).
9. Isler, S. *et al.* The effects of different restorative materials on periodontopathogens in combined restorative-periodontal treatment. *J Appl Oral Sci.* **26**, 1678-7757 (2018).
10. Derchi, G. *et al.* Bacterial adhesion on direct and indirect dental restorative composite resins: An *in vitro* study on a natural biofilm. *J Prosthet Dent.* **117**, 669-676 (2017).
11. Zaltsman, N. *et al.* Surface-modified nanoparticles as anti-biofilm filler for dental polymers. *PLoS One.* **12**, e0189397 (2017).
12. Florez, F.L.E. *et al.* Real-time Assessment of Streptococcus mutans Biofilm Metabolism on Resin Composite. *Dent Mater.* **32**, 1263–1269 (2016).

13. Hyun, H.K., Ferracane, J.L. Influence of biofilm formation on the optical properties of novel bioactive glass-containing composites. *Dent Mater.* **32**, 1144-1151 (2016).
14. Domenech, M., et al. Biofilm Formation Avoids Complement Immunity and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infectar. Immun. Espanha*, **81**, 2606–2615 (2013).
15. Zaw M.T., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* **52**, 761–767 (2007).
16. Kim, H.-S. et al. Raffinose, a plant galactoside, inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via binding to LecA and decreasing cellular cyclic diguanylate levels. *Scientific Reports*, **6**, doi:10.1038/srep25318 (2016).
17. Elpo, E.R.S. & Negrelle, R.R.B. *Zingiber officinale Roscoe*: Aspectos botânicos e ecológicos. *Visão Acadêmica*, **5**, 27-32 (2004).
18. Chaves, F.C.M. et al. Avaliação agrônômica e caracterização química de acessos de gengibre (*Zingiber officinale*) nas condições de Manaus, AM. *Hortic. bras.* **30**, (2012).
19. Chakotiya A.S., Tanwar A., Narula A. & Sharma R.K. *Zingiber officinale*: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. *Microbial Pathogenesis.* **107**, 254-260 (2017).
20. Fernandes, L.O. Optical coherence tomography follow-up of patients treated from periodontal disease. *Journal of Biophotonics.* **12**, e201800209 (2018).
21. Mota, C.C.B.O., Fernandes, L.O., Cimões, R., & Gomes, A.S.L. Non-Invasive Periodontal Probing Through Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. *Journal of Periodontology*, **86**, 1087–1094 (2015).
22. Andrade M.C.L. et al. A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. *PLoS ONE.* São Francisco, **12**, e0188020(2017).
23. Maia, A.M.A., Freitas, A.Z., Campello, S.L., Gomes, A.S.L. & Karlsson, L. Evaluation of dental enamel caries assessment using Quantitative Light Induced Fluorescence and Optical Coherence Tomography. *J Biophotonics*, **9**, 596–602 (2016).
24. Shimada, Y., et al. 3D evaluation of composite resin restoration at practical training using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT). *Dent Mater J.* **31**, 409-17, (2012).

25. Suzuki, L.C. et al. Real time optical coherence tomography monitoring of *Candida albicans* biofilm in vitro during photodynamic treatment. *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II*. **7715**, 771524-1 (2010).
26. Melo, L.S. et al. Evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography. *J Biomed Opt.*, **10**,27-64 (2005).
27. Hou, J. et al. Bacterial Density and Biofilm Structure Determined by Optical Coherence Tomography. *Scientific Reports*, **9**, doi:10.1038/s41598-019-46196-7 (2019).
28. Mota, C.C.B.O. et al. Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. *Photomedicine and Laser Surgery*, **31**, 301–306 (2013).
29. Antunes, J.L.F. & Peres, M.A. **Epidemiologia da Saúde Bucal**. Guanabara Koogan, (Rio de Janeiro, 2006).
30. Farrugia, C., Cassar, G., Valdramidis, V., & Camilleri, J. Effect of sterilization techniques prior to antimicrobial testing on physical properties of dental restorative materials. *Journal of Dentistry*, **43**, 703–714 (2015).
31. Patten, J., et al. A Multi-scale Biophysical Approach to Develop Structure-Property Relationships in Oral Biofilms. *Scientific Reports*, **8**, doi:10.1038/s41598-018-23798-1 (2018).
32. Kim, S. et al. Design and implementation of a low-cost, portable OCT system. *Biomedical Optics Express*, **9**, 1232. doi:10.1364/boe.9.001232 (2018).
33. Kim, S-H., Kang S-R., Wi, W-J. Improved accuracy in periodontal pocket depth measurement using optical coherence tomography. *J Periodontal Implant Sci.* **47**, 13-19 (2017).
34. Bao, Q. et al. Antibacterial and anti-biofilm efficacy of fluoropolymer coating by a 2,3,5,6-tetrafluoro- p -phenylenedimethanol structure. *Colloids Surf. B: Biointerf.* **151**, 363–371 (2017).
35. Desmond, P., Morgenroth, E. & Derlon, N. Physical structure determines compression of membrane biofilms during Gravity Driven Membrane (GDM) ultrafiltration. *Water Res.* **143**, 539–549 (2018).
36. Fortunato, L. & Leiknes, T. In-situ biofouling assessment in spacer filled channels using optical coherence tomography (OCT): 3D biofilm thickness mapping. *Biores. Technol.* **229**, 231–235 (2017).

37. Ogrodzki, P. et al. Rapid in-situ imaging and whole genome sequencing of biofilm in neonatal feeding tubes: A clinical proof of concept. *Sci. Rep.* **7**, 15948 (2017).
38. Qian, J. et al. Water quality and daily temperature cycle affect biofilm formation in drip irrigation devices revealed by optical coherence tomography. *Biofouling* **33**, 211–221 (2017).
39. Wagner, M. & Horn, H. Optical coherence tomography in biofilm research: A comprehensive review. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1386–1402 (2017).
40. Gusnaniar, N. et al. Structural changes in *S. epidermidis* biofilms after transmission between stainless steel surfaces. *Biofouling* **33**, 712–721 (2017)
41. Haisch, C. & Niessner, R. Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography. *Water Res.* **41**, 2467–2472 (2007).
42. Snuossi M, et al. *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* Essential Oils: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Bacteria Isolated from Fish and Shellfish. *Molecules*, **21**, 1414 (2016).
43. Ionescu, A.C. et al. Influence of matrix and filler fraction on biofilm formation on the surface of experimental resin-based composites. *J Mater Sci: Mater Med.* **26**, 58 (2015).

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por concessão de bolsa a PTSSP. Este estudo faz parte das atividades do INCT-INFO (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, Instituto de Fotônica - 465.763/2014-6), apoiado pelo programa CNPq/CAPES/MCT, e PRONEX (Programa de Excelência em Biofotônica e Nanofotônica - APQ-0504-1.05/14) patrocinado pela FACEPE/CNPq.

Informações sobre os autores

Afiliações

Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Departamento de Odontologia - Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúna, 531 – Bairro Universitário- Campina Grande - PB – Brasil

Centro Universitário Tabosa de Almeida – ASCES-UNITA

Curso de Odontologia

Av. Portugal, 584 - Universitário, Caruaru – PE – Brasil

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Departamento de Física
Av. Prof. Luiz Freire s/n - Cidade Universitária, Recife - PE - Brasil

Contribuição

MHCVC, PTSSP e CCBOM idealizaram e conceberam esse projeto. PTSSP, NAEL, MCOL e RLSH projetaram e desenvolveram a pesquisa. PLAN, CCBOM e MHCVC, supervisionaram a pesquisa. AFMM desenvolveu a formulação a ser testada e monitorou o fitoterápico. MMA idealizou o método de análise. SLC desenvolveu o método de análise e analisou os experimentos. ASLG revisou criticamente manuscrito. Todos os autores contribuíram na redação do manuscrito.

Autor Correspondente

Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão, PhD

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia - Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúna, 531 – Bairro Universitário- Campina Grande - PB – Brasil

CEP 58429-500 Phone/Fax:+55 83 3315-3471

e-mail: mhelenact@zipmail.com.br

Declaração de interesse

Todos os autores envolvidos nesta pesquisa, declaram não haver conflitos de interesse em potencial com a autoria e/ou publicação desse artigo. As opiniões e afirmações contidas neste documento são de responsabilidade dos autores. Declaramos nenhum interesse financeiro concorrente.

Figuras, Quadros e Tabelas

Quadro 1. Resinas compostas, fabricante, composição, classificação e técnica de uso.

RESINAS COMPOSTAS	FABRICANTE / LOTE	MATRIZ ORGÂNICA	PARTÍCULAS DE CARGA	FOTOATIVAÇÃO
Tetric N-Ceram Bulk Fill	Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein /U33216	Bis-GMA; Bis-EMA; UDMA.	Híbrido	10 seg $\geq 1.000 \text{ mW/cm}^2$ Espessura máx do incremento: 4 mm
SonicFill	Kerr Corp., Orange, Califórnia, USA / 6504838	Bis-GMA; Bis-EMA; TEGDMA.	Nanohíbrido	20seg $>1000\text{mW/cm}^2$ Espessura máx do incremento: 5 mm

Quadro 2. Composição dos grupos experimentais.

GRUPOS (n=60)	SUBGRUPOS (n=30)	TESTE E CONTROLE (n=10)
Esmalte humano	Cultura <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Zingiber officinale</i>
		Clorexidina
		Sem Intervenção
	Cultura <i>Candida albicans</i>	<i>Zingiber officinale</i>
		Clorexidina
		Sem Intervenção
Tetric N-Ceram Bulk Fill IVOCLAR	Cultura <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Zingiber officinale</i>
		Clorexidina
		Sem Intervenção
	Cultura <i>Candida albicans</i>	<i>Zingiber officinale</i>
		Clorexidina
		Sem Intervenção
Sonic Fill KERR	Cultura <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Zingiber officinale</i>
		Clorexidina
		Sem Intervenção
	Cultura <i>Candida albicans</i>	<i>Zingiber officinale</i>
		Clorexidina
		Sem Intervenção

Tabela 1- Médias e desvio padrão da intensidade do sinal dos grupos estudados e análise intragrupos das superfícies.

Cultura	Superfície	Intervenção	N	Média	Desvio Padrão	p-valor ¹
<i>Staphylococcus aureus</i>	Esmalte Dentário	<i>Zingiber officinale</i>	10	2,548E+03 ^a	0,60	<0,0001*
		Clorexidina	10	2,089E+03 ^{ab}	0,49	
		Sem intervenção	10	20,55E+03 ^c	0,97	
	Tetric N-Ceram Bulk Fill	<i>Zingiber officinale</i>	10	4,152E+03 ^d	0,83	
		Clorexidina	10	2,592E+03 ^{de}	0,73	
		Sem intervenção	10	20,14E+03 ^f	0,96	
	Sonic Fill	<i>Zingiber officinale</i>	10	6,643E+03 ^g	0,72	
		Clorexidina	10	4,992E+03 ^h	0,60	
		Sem intervenção	10	25,54E+03 ⁱ	1,09	
<i>Candida albicans</i>	Esmalte Dentário	<i>Zingiber officinale</i>	10	2,065E+03 ^j	0,77	<0,0001*
		Clorexidina	10	2,147E+03 ^{jk}	0,50	
		Sem intervenção	10	21,04E+03 ^l	2,46	
	Tetric N-Ceram Bulk Fill	<i>Zingiber officinale</i>	10	7,721E+03 ^m	0,89	
		Clorexidina	10	6,263E+03 ^{mn}	0,47	
		Sem intervenção	10	32,04E+03 ^o	2,91	
	Sonic Fill	<i>Zingiber officinale</i>	10	13,2E+03 ^p	3,90	
		Clorexidina	10	10,53E+03 ^{pq}	3,34	
		Sem intervenção	10	35,82E+03 ^r	2,03	

¹ Teste de Kruskal-Wallis; Post-hoc de Dunn. Letras diferentes indicam significância estatística.

* Diferenças estatísticas significativas

Tabela 2 – Avaliação da intensidade de sinal da inibição nas diferentes superfícies (Tipo de intervenção x superfícies)

Cultura	Intervenção	Superfície	N	Média	Desvio padrão	p-valor ¹
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Zingiber Officinale</i>	Esmalte	10	2,548E+03 ^a	0,60	<0,0001*
		Tetric N-Ceram Bulk Fill	10	4,152E+03 ^{ab}	0,83	
		Sonic Fill	10	6,643E+03 ^c	0,72	
	Clorexidina	Esmalte	10	2,089E+03 ^d	0,49	<0,0001*
		Tetric N-Ceram Bulk Fill	10	2,592E+03 ^{de}	0,73	
		Sonic Fill	10	4,992E+03 ^f	0,60	
	Sem intervenção	Esmalte	10	20,55E+03 ^g	0,97	<0,0001*
		Tetric N-Ceram Bulk Fill	10	20,14E+03 ^{gh}	0,96	
		Sonic Fill	10	25,54E+03 ⁱ	1,09	
<i>Candida albicans</i>	<i>Zingiber Officinale</i>	Esmalte	10	2,065E+03 ^j	0,77	<0,0001*
		Tetric N-Ceram Bulk Fill	10	7,721E+03 ^k	0,89	
		Sonic Fill	10	13,2E+03 ^{kl}	3,90	
	Clorexidina	Esmalte	10	2,147E+03 ^m	0,50	<0,0001*
		Tetric N-Ceram Bulk Fill	10	6,263E+03 ⁿ	0,47	
		Sonic Fill	10	10,53E+03 ^{no}	3,34	
	Sem intervenção	Esmalte	10	21,04E+03 ^p	2,46	<0,0001*
		Tetric N-Ceram Bulk Fill	10	32,04E+03 ^q	2,91	
		Sonic Fill	10	35,82E+03 ^{qr}	2,03	

¹ Teste de Kruskal-Wallis; Post-hoc de Dunn. Letras diferentes indicam significância estatística.

* Diferenças estatísticas significativas

Tabela 3 – Avaliação da inibição e crescimento nas diferentes superfícies
(*Staphylococcus aureus* x *Candida albicans*)

Superfície	Intervenção	Colônia	N	Média	Desvio Padrão	p-valor ¹	
Esmalte	<i>Zingiber Officinale</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	2,548E+03	0,60	0,1655	
		<i>Candida albicans</i>	10	2,065E+03	0,77		
	Clorexidina	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	2,089E+03	0,49	0,7394	
		<i>Candida albicans</i>	10	2,147E+03	0,50		
	Sem Intervenção	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	20,55E+03	0,97	0,1051	
		<i>Candida albicans</i>	10	21,04E+03	2,46		
	Tetric N-Ceram Bulk Fill	<i>Zingiber Officinale</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	4,152E+03	0,83	<0,0001*
			<i>Candida albicans</i>	10	7,721E+03	0,89	
Clorexidina		<i>Staphylococcus aureus</i>	10	2,592E+03	0,73	<0,0001*	
		<i>Candida albicans</i>	10	6,263E+03	0,47		
Sem Intervenção		<i>Staphylococcus aureus</i>	10	20,14E+03	0,96	<0,0001*	
		<i>Candida albicans</i>	10	32,04E+03	2,91		
Sonic Fill		<i>Zingiber Officinale</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	6,643E+03	0,72	0,0021*
			<i>Candida albicans</i>	10	13,2E+03	3,90	
	Clorexidina	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	4,992E+03	0,60	0,0003*	
		<i>Candida albicans</i>	10	10,53E+03	3,34		
	Sem Intervenção	<i>Staphylococcus aureus</i>	10	25,54E+03	1,09	<0,0001*	
		<i>Candida albicans</i>	10	35,82E+03	2,03		

¹ Teste de Mann-Whitney

* Diferenças estatísticas significativas.

Figura 1. Comparação das amostras em três momentos distintos expostas a *Candida Albicans*.

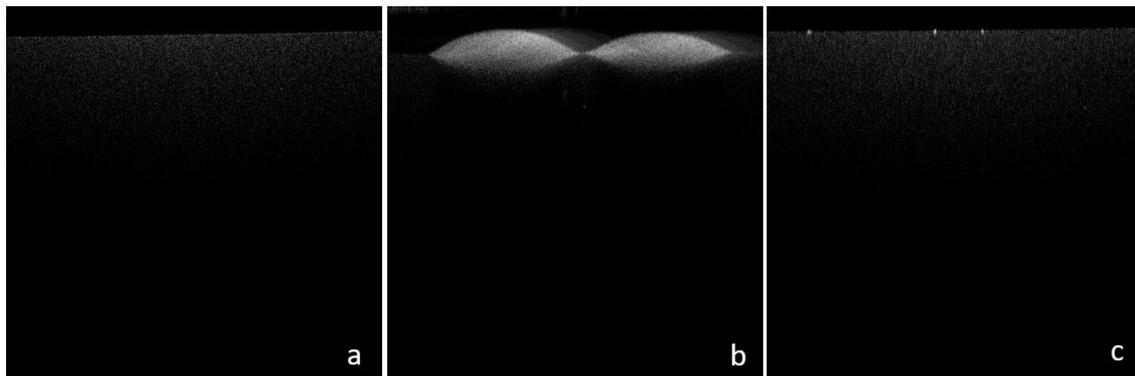


Figura 1. a) Placa estéril Ágar Sabouraud 4%; b) Crescimento *Candida Albicans* em Sonic; c) Inibição *Candida Albicans* em Sonic.

Figura 2. Comparação das amostras em três momentos distintos expostas ao *Staphylococcus aureus*.

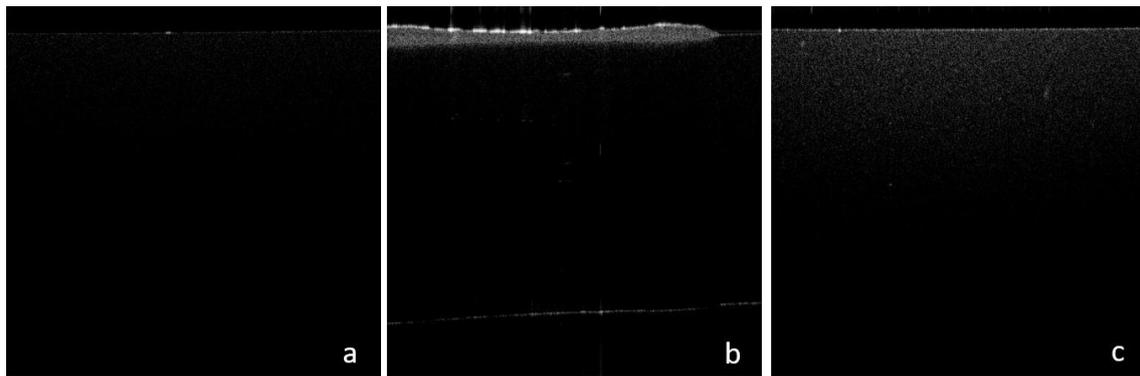


Figura 2. a) Placa estéril Ágar Mueller Hinton; b) Crescimento *Staphylococcus aureus* em Sonic; c) Inibição *Staphylococcus aureus* em Sonic.

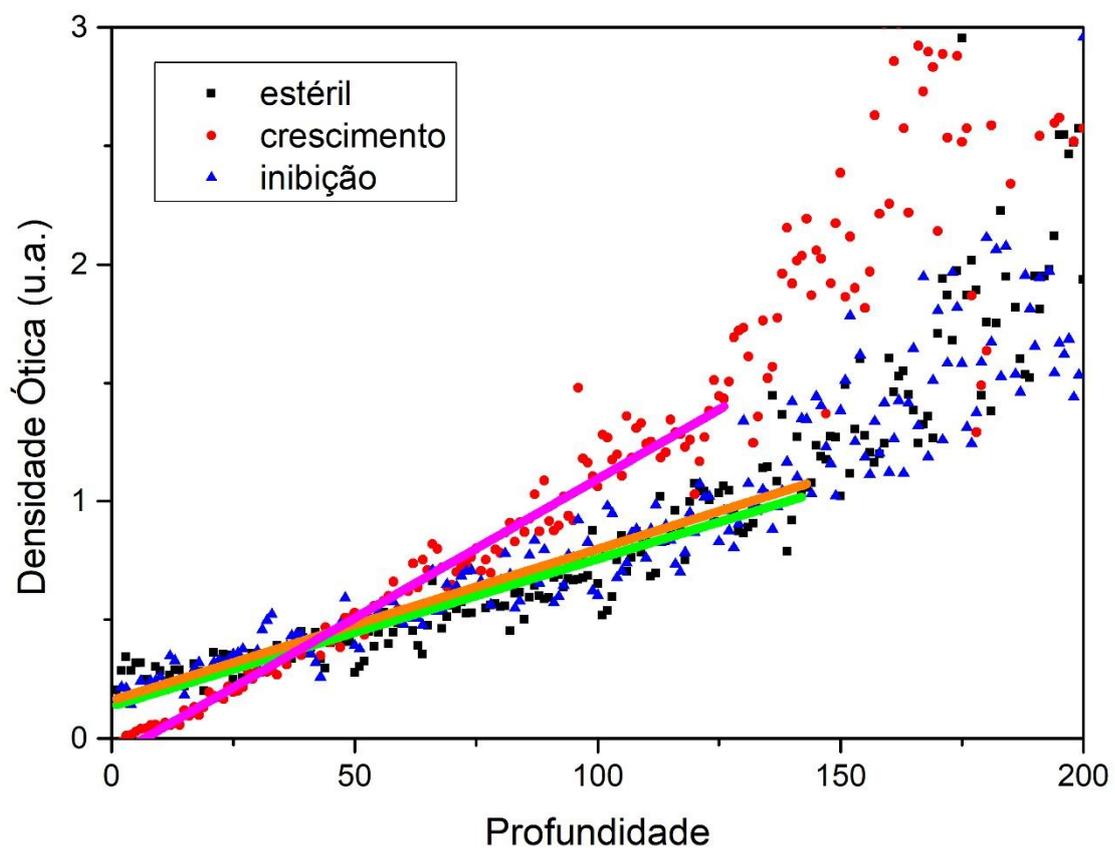
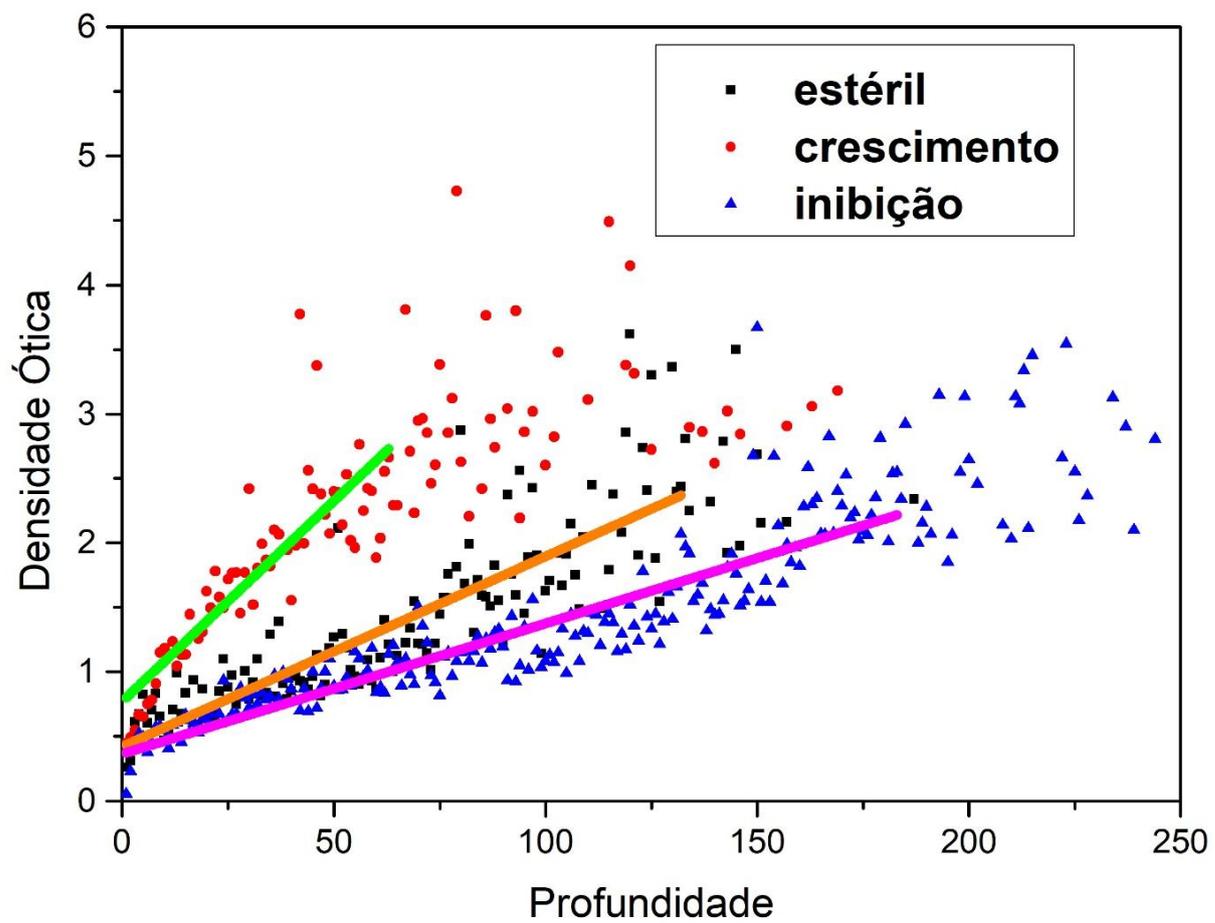
Figura 3. Comparação da densidade óptica das amostras expostas a *Candida Albicans*.

Figura 4. Comparação da densidade óptica das amostras expostas ao *Staphylococcus aureus*.



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi visto colonização e crescimento do *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* sobre as superfícies testadas, não havendo diferença entre as espécies para o esmalte dentário. Entretanto, nas superfícies resinosas foi verificado maior crescimento de *Candida albicans*, frente ao *S.aureus*.

O tamanho das partículas inorgânicas das resinas (híbridas e nanohíbridas), bem como sua viscosidade podem ter influenciado o crescimento de microrganismos nas resinas Bulk Fill, apresentando as do tipo híbrida melhores resultados e as nanohíbridas maior crescimento e adesão de biofilme.

O fitoterápico *Zingiber officinale Roscoe* foi eficaz na inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* e da *Candida albicans* *in vitro* sobre superfícies lisas de resinas compostas Bulk Fill de alta viscosidade e esmalte dentário.

Estudos futuros poderão analisar se o *Zingiber officinale* causa manchamento sobre as superfícies de esmalte e resinas compostas, uma vez que esta é uma desvantagem da Clorexidina. Também é importante a continuidade deste estudo visando o aprimoramento e desenvolvimento de fórmula farmacêutica do colutório para aplicação clínica do produto.

REFERÊNCIAS

1. AHN, S. J. et al. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. **Infection and Immunity**. Washington DC, v.76, n.9, p.4259-4268, 2008.
2. ANDRADE M. C. L. et al. A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. **PLoS ONE**. São Francisco, v.12, n.11, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188020> acessado em 03 de maio de 2018.
3. ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, JR L.V. **Formas farmacêuticas & sistema de liberação controlada**. São Paulo: Editora Preiner, 2000, p.568.
4. ANTUNES, J. L. F., PERES, M.A. **Epidemiologia da Saúde Bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
5. ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm. Acesso em: Julho, 2012.
6. ARDU, S., et al. Color stability of different composite resins after polishing. **Odontology**. Tóquio, v.106, n.3, p. 328-333, 2018.
7. BAUMGARTNER, A., et al. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures. **Caries Research**. v.34, n.1, p. 59-69, 2000.
8. BICALHO, A. A. et al. Incremental Filling Technique and Composite Material—Part II: Shrinkage and Shrinkage Stresses, **Operative Dentistry**, Indianápolis. v.39, n.2, p 83–92, 2014
9. BOING, T. F., et al. Avaliação do grau de conversão de uma resina composta utilizando diferentes tratamentos de superfície previamente á fotopolimerização final. **Revista Dentística Online**, Santa Maria, v.10, n.22, p.9-14, 2011.
10. BRAMBILLA, E., et al. Biofilm formation on composite resins for dental restorations: an in situ study on the effect of chlorhexidinemouthrinses. **Int J Artif Organs**. Itália, v.35, n.10, p.792-799, 2012.
11. CHAKOTIYA, A. S. et al. *Zingiber officinale*: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. **Microbial Pathogenesis**, Elsevier. Índia, v.107, p.254-260, 2017.
12. CHAVES, F. C. M. et al. Avaliação agronômica e caracterização química de acessos de gengibre (*Zingiber officinale*) nas condições de Manaus, AM. **Hortic. bras**. São Paulo, v.30, n.2, 2012.
13. CORDEIRO, M. S. F. et. al. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Revista Brasileira de farmácia**. Caruaru, v.94, n. 2, p.148-153, 2013.
14. COLSTON, B., et al. Dental OCT. **Optics Express**. Whashington, v.3, n.6, p.230-238, 1998.

15. DERCHI, G. et al. Bacterial adhesion on direct and indirect dental restorative composite resins: An *in vitro* study on a natural biofilm. **J Prosthet Dent**. St Louis, v.117, n.5, p.669-676, 2017.
16. DOMENECH, M., et al. Biofilm Formation Avoids Complement Immunity and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. **Infectar. Immun.** Espanha, v.81, p. 2606–2615, 2013.
17. ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B. *Zingiber officinale* ROSCOE: ASPECTOS BOTÂNICOS E ECOLÓGICOS. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.5, n.1, p.27-32, 2004.
18. ELLEPOLA, A. N. B., SAMARANAYAKE, L. P. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **Arch Oral Biol** . Hong Kong, v.43, n.8, p.879-887, 1998.
19. FARRELL, D. J., R. E. et al. Activity of Fusidic Acid Tested against Staphylococci Isolated from Patients in U.S. Medical Centers in 2014. **Antimicrob. Agents Chemother.** London. v.60, p.3827-3831, 2016.
20. FARRUGIA, C. et al. Effect of sterilization techniques prior to antimicrobial testing on physical properties of dental restorative materials. **Journal of Dentistry**, v.43, p.703–714, 2015.
21. FELDCHEIN, F. I. et al. In vivo OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity. **Optics Express**. Washington, v.3, n.6, p.239-250, 1998.
22. FERREIRA, G. A. **Desenvolvimento de sistemas para veiculação de vitamina c, avaliação da estabilidade química, permeação e retenção cutânea.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. Araraquara, São Paulo, 2012.
23. FLOREZ, F. L. E. et al. Real-time Assessment of *Streptococcus mutans* Biofilm Metabolism on Resin Composite. **Dent Mater**. Manchester, v.32, n.10, p.1263–1269, 2016.
24. FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.
25. GENARO, A. R. **Remington the science and practice of pharmacy.** 20th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
26. GLAUSER, S. et al. Bacterial colonization of resin composite cements: influence of material composition and surface roughness. **Eur J Oral Sci.** Aarhus C., v.125, n. 4, p.294-302, 2017.
27. HALL, A.; GIRKIN, J. M. A review of potential new diagnostic modalities for caries lesions. **Journal of Dental Research**, Ann Arbor. v.83, p.89-94, 2004.

28. HASAN, S., DANISHUDDIN, M., KHAN, A. U. Inhibitory effect of *zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: *in vitro* and *in vivo* studies. **BMC Microbiology**. Índia, v.15, n.1, p.1-14, 2015.
29. HEINTZE, S. D., ROUSSON, V. Clinical effectiveness of direct class II restorations - a meta –analysis. **J Adhes Dent**. Nova Malden, v.14, n.5, p.407-31, 2012.
30. HOU, J. et al. Bacterial Density and Biofilm Structure Determined by Optical Coherence Tomography. **Scientific Reports**, n.9, doi:10.1038/s41598-019-46196-7 (2019).
31. HYUN, H. K.; FERRACANE, J. L. Influence of biofilm formation on the optical properties of novel bioactive glass-containing composites. **Dent Mater**. Kidlington, v.32, n.9, p.1144-51, 2016.
32. ILIE, N., BUCUTA, S., DRAENERT, M. Bulk-fill resin-based composites: an *in vitro* assessment of their mechanical performance. **Operative Dentistry**, Indianápolis, v.38, n.6, p.618-625, 2013.
33. ISLER, S. et al. The effects of different restorative materials on periodontopathogens in combined restorative-periodontal treatment. **J Appl Oral Sci**. Ankara, v.26, p.1678-7757, 2018.
34. IONESCU, A. C. et al. Influence of matrix and filler fraction on biofilm formation on the surface of experimental resin-based composites. **J Mater Sci: Mater Med**. Cambridge, v.26, p.58, 2015.
35. IONESCU, A. C. et al. Streptococcus mutans adherence and biofilm formation on experimental composites containing dicalcium phosphate dihydrate nanoparticles. **J Mater Sci: Mater Med**, Cambridge. v.28, p.108, 2017.
36. JAQUES, P., HEBLING, J. Influência da Esterilização de Dentes Humanos em Autoclave Sobre a Resistência de União Resina/Dentina. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada [en linea]**. Campina Grande, 2006.
37. KIM, H.-S. et al. Raffinose, a plant galactoside, inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation via binding to LecA and decreasing cellular cyclic diguanylate levels. **Scientific Reports**, v.6, n.1. 2016.
38. KIM, S-H., KANG S-R., WI, W-J. Improved accuracy in periodontal pocket depth measurement using optical coherence tomography. **J Periodontal Implant Sci**. Seul, v.47, n.1, p.13-19, 2017.
39. KIM, S. et al. Design and implementation of a low-cost, portable OCT system. **Biomedical Optics Express**, v.9, p.1232, 2018.
40. LEPRINCE J. G. et al. Physico-mechanical characteristics of commercially available bulk-fill composites. **J Dent**. Birmingham. v.42, n.8, p.993-1000, 2014.

41. MARGHALANI, H. Y. Effect of finishing/polishing systems on the surface roughness of novel posterior composites. **J Esthet Restor Dent**. London. v.22, p.127-138, 2010.
42. MELO, L. S. A. et al. Evaluation of enamel dental restoration interface by optical coherence tomography. **Journal of Biomedical Optics**. Bellingham. v.10, n.6, p.27-64, 2005.
43. MOTA, C. C. B. O. et al. Optical Coherence Tomography as an Auxiliary Tool for the Screening of Radiation-Related Caries. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.31, n.7, p.301-306, 2013.
44. MOTA, C.C.B.O., FERNANDES, L.O., CIMÕES, R., GOMES, A.S.L. Non-Invasive Periodontal Probing Through Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. **Journal of Periodontology**, v.86, p.1087–1094, 2015.
45. OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE). Oral health surveys. Basic methods. 5th. ed. Geneva: WHO; 2013.
46. PAR, M. et al. Real-time Light Transmittance Monitoring for Determining Polymerization Completeness of Conventional and Bulk Fill Dental Composites. **Operative Dentistry**. Indianápolis, v.43, n.1, p.19-31, 2018.
47. RIBEIRO, R. A. O., et al. Propriedades das resinas bulk fill: uma revisão de literatura. **Odontol. Clín.-Cient.**, Recife, v.16, n.2, p.93-97, 2017.
48. ROSATTOA, C. M. P., et al. Mechanical properties, shrinkage stress, cuspal strain and fracture resistance of molars restored with bulk-fill composites and incremental filling technique. **Journal of Dentistry**. Bristol. v.43, n.12, p.1519-1528, 2015.
49. SHIMADA, Y., et al. 3D evaluation of composite resin restoration at practical training using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT). **Dent Mater J**. Tóquio, v.31, n.3, p.409-17, 2012.
50. SMITH, E.W.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIEDELLOUD, F.; MARTI-ME STRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, New York, Marcel Dekker, p.259-269, 2000.
51. SUZUKI, L.C., et al. Real time optical coherence tomography monitoring of *Candida albicans* biofilm in vitro during photodynamic treatment. **Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care II**. v.7715, p.771524-1,2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1117/12.854305>, acessado em 03 de maio de 2018.
52. VAN ENDE, A., et al. Bonding of low-shrinking composites in high C-factor cavities. **J Dent**, Bristol. v.40, n.4, p.295-303, 2012.
53. VELOSO, S. R. M., et al. Clinical performance of bulk-fill and conventional resin composite restorations in posterior teeth: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**. Berlin, 2018. Disponível em: <https://doi:10.1007/s00784-018-2429-7>, acessado em 03 de maio de 2018.

54. ZAW MT, SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Arch Oral Biol.** Hong Kong; v.52, p.761–767, 2007.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM RESINAVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS EM RESINAS COMPOSTAS BULK FILL COM USO DE GEL FITOTERÁPICO Zingiber officinale PELO SISTEMA DE TOMOGRAFIA POR COERENCIA ÓPTICA

Pesquisador: MARIA HELENA CHAVES DE VASCONCELOS CATÃO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 10101019.4.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.251.657

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se bem elaborado, contendo resumo, revisão da literatura e metodologia exequível. O título e os objetivos se complementam. Atendendo as exigências da Resolução 466/12, do CONEP / MS.

Objetivo da Pesquisa:

Num estudo experimental laboratorial in vitro do tipo analítico, com três resinas do tipo Bulk Fill condensada (Voco, Ivoclar e Kerr) e o esmalte humano como controle, inoculando os três grupos de micro-organismos supracitados e tendo como teste da inibição de crescimento o Zingiber officinale Roscoe, como controle positivo a Clorexidina e a água destilada como controle nulo. Serão avaliados avaliar os efeitos do gel fitoterápico Zingiber officinale Roscoe sobre o crescimento e aderência de microrganismos Sthaphylococcus aureus, Candida albicans e cultura mista

in vitro sobre superfícies lisas de resinas compostas Bulk Fill de alta viscosidade, comparando seus resultados com a aplicação tópica de clorexidina

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existem riscos, pois trata-se de uma pesquisa in vitro.

Endereço: Av. das Baraúnas, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó **CEP:** 58.109-753
UF: PB **Município:** CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 **Fax:** (83)3315-3373 **E-mail:** cep@uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 3.251.657

Os benefícios são que os usos de produtos naturais são eficazes na regulação da formação de biofilmes, tendo como vantagem a menor toxicidade e maior especificidade, quando comparados aos fármacos sintéticos (KIM et al., 2016). Nesse contexto a utilização de um fitoterápico que tenha ação específica, com teste de

suscetibilidade antimicrobiana, com CIM ou CIMA (Concentração Inibitória Mínima)

para *Staphylococcus aureus* e *Cândida*, ambos muito comuns na cavidade oral e testá-los na cultura mista da cavidade bucal e ver se possui a mesma ação. Envolvendo uma planta nativa brasileira, cujo extrato seja de baixo custo, e que se enquadre nos

critérios de incentivos do SUS para pesquisas e/ou desenvolvimento de arranjos produtivos locais de plantas medicinais e fitoterápicos com incentivo governamental.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta as etapas exigidas pela Plataforma Brasil, está seguindo a Resolução 466/12 do MS, apresenta num texto de fácil entendimento e uma sequência lógica de metodologia

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em consonância com o desenvolvimento da pesquisa e o solicitado pelo CEP

Recomendações:

Recomendamos após a conclusão da pesquisa que nos enviasse (CEP) um relatório sobre a mesma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é viável, está embasado cientificamente e conforme preconiza a Resolução 466/12 do MS. Portanto, emitimos parecer favorável

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1297809.pdf	22/03/2019 00:36:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	22/03/2019 00:35:26	MARIA HELENA CHAVES DE VASCONCELOS CATÃO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Termos_de_Assentimento_Justificativa_de_Ausencia.pdf	22/03/2019 00:34:37	MARIA HELENA CHAVES DE VASCONCELOS CATÃO	Aceito

Endereço: Av. das Baraúnas, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó **CEP:** 58.109-753
UF: PB **Município:** CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 **Fax:** (83)3315-3373 **E-mail:** cep@uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 3.251.657

Declaração de Pesquisadores	pesquisador_responsavel.pdf	21/03/2019 23:37:08	MARIA HELENA CHAVES DE VASCONCELOS CATÃO	Aceito
Outros	concordancia_do_projeto.pdf	21/03/2019 23:27:57	MARIA HELENA CHAVES DE VASCONCELOS CATÃO	Aceito
Outros	tai.pdf	21/03/2019 23:25:27	MARIA HELENA CHAVES DE VASCONCELOS CATÃO	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	21/03/2019 23:23:57	MARIA HELENA CHAVES DE VASCONCELOS CATÃO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 09 de Abril de 2019

Assinado por:

Dóris Nóbrega de Andrade Laurentino
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Baraúnas, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó **CEP:** 58.109-753
UF: PB **Município:** CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 **Fax:** (83)3315-3373 **E-mail:** cep@uepb.edu.br

ANEXO B - LAUDO TÉCNICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE GENGIBRE

 FERQUIMA		LAUDO TÉCNICO Óleo Essencial de Gengibre Fresco <i>(Zingiber officinale)</i>	
Lote: 103		CAS Number: 8007-08-7	
Fabricação: Janeiro/2018		Validade: Janeiro/2020	
Ítems Controlados	Resultados	Especificações	
Aparência	Líquido Límpido	Líquido Límpido	
Cor	Amarelo	Amarelo a Marrom	
Impurezas	Isento	Isento	
Odor	Típico – Especiaria	Típico – Especiaria	
Densidade (20°C)	0,884	0,870 – 0,885	
Índice de Refração (20°C)	1,492	1,485 – 1,495	
Rotação Ótica	-33,60°	[-52° ; -25°]	
Data da Análise	07/03/2018		
Resultado	Aprovado		
Origem	Costa do Marfim		
Extração	Destilação a vapor da raiz fresca		
Principais componetes (aprox.)	Alfa zingiberene = 30% Beta sesquifelandrene = 12%		
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.			
Recomendações Especiais			
Manuseio	Perigos mínimos, máscara e luvas recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).		
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Flash Point = 78°C.		
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.		
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.		
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.		
Transporte	Número de risco: 90 / Número da ONU: 3082 / Classe ou Subclasse de risco: 9 / Descrição da classe ou subclasse: Substâncias perigosas diversas / Grupo de Embalagem: III		
As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.			
Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus		CRQ: IV 04330754	
<small>Empresarial Raposo Tavares - Alameda 4, 76 - Vergem Grande, Paulista - SP - CEP: 06725-000 Tel: 11.3500.6108 / 11.3500.6109 - WhatsApp: 11.98346.0743 e-mail: atendimento@ferquima.com.br</small>		FERQUIMA Ind. e Com. Ltda	

ANEXO C –DECLARAÇÃO DO BANCO DE DENTES



Centro Universitário Tabosa de Almeida - ASCES/UNITA
Avenida Portugal, 584, Bairro Universitário - Caruaru - PE - Brasil - CEP 55016-901
Tel.: +55 (81) 2103.2000 / Fax: +55 (81) 2103.2053
e-mail: ascres@ascres.edu.br - www.ascres.edu.br

Banco de Dentes Humanos

Regulamentado de acordo com a Lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Modificada pela Lei nº 10211 de: 23 de março de 2001 e autorizado pela Vigilância Sanitária da Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Caruaru, através do Ofício nº SSC/093 de 11 de maio de 2016.

DECLARAÇÃO DE EMPRESTIMO

Declaramos para fins de comprovação junto ao CEP que, autorizamos a retirada por empréstimo em nossa Entidade de **60 (sessenta)** terceiros molares íntegros, por **Pettely Thaise de Souza Santos Palmeira – CPF nº 064.102.104-69**, aluna da Universidade Estadual da Paraíba, vinculada ao programa de pós-graduação a nível de Mestrado, com a finalidade de realizar um trabalho de pesquisa, sob o título: "**Inibição de Micro-organismos em Resinas Compostas Bulk Fill com uso do Fitoterápico *Zingiber officinale* pelo Sistema de Tomografia por Coerência Óptica**", sob a orientação da **profª Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão** tendo como co-orientadora a **profª Dra. Cláudia Cristina Brainer de Oliveira Mota**.

Dando cumprimento ao nosso Regulamento, de acordo com o Cap. V, Art. 5º, Item IV das Normas que regem o funcionamento do BDH da ASCES/UNITA, os referidos elementos ficarão sob a responsabilidade da pesquisadora requerente, relativo ao transporte, estudo/pesquisa, que se desenvolverá no Laboratório de Biofotônica da ASCES/UNITA e o respectivo comprometimento, da devolução de todos elementos ora retirados por empréstimo, independentemente do estado em que os espécimes se encontrem após o estudo/experiência.

Caruaru-PE, 20 de fevereiro de 2019


Prof. João Manoel Silva Filho
CRO-PE 2826 - Coordenador Geral do BDH - ASCES/UNITA

ANEXO D - NORMAS DO PERIÓDICO SCIENTIFIC REPORTS

Scientific Reports

Format of articles

Scientific Reports publishes original research in one format, Article. In most cases we do not impose strict limits on word count or page number. We do, however, strongly encourage authors to write concisely and to adhere to the guidelines below.

Articles should ideally be no more than 11 typeset pages in length. As a guide, the main text (not including Abstract, Methods, References and figure legends) should be no more than 4,500 words. The maximum Article title length is 20 words. The Abstract — which must be no more than 200 words long and contain no references — should serve both as a general introduction to the topic and as a brief, non-technical summary of the main results and their implications.

For the main body of the text, there are no explicit requirements for section organization. According to the authors' preference, the text may be organized as best suits the research. As a guideline and in the majority of cases, however, we recommend that you structure your manuscript as follows:

- Introduction
- Results (with subheadings)
- Discussion (without subheadings)
- Methods

A specific order for the main body of the text is not compulsory and, in some cases, it may be appropriate to combine sections. Figure legends are limited to 350 words. As a guideline references should be limited to 60 (this is not strictly enforced). Footnotes should not be used.

We suggest that Articles contain no more than 8 display items (figures and/or tables). In addition, a limited number of uncaptioned molecular structure graphics and numbered mathematical equations may be included if necessary. To enable typesetting of papers, the number of display items should be commensurate with the word length — we suggest that

for Articles with less than 2,000 words, no more than 4 figures/tables should be included. Please note that schemes are not used and should be presented as figures.

Authors must provide a competing interests statement within the manuscript file.

Submissions should include a cover letter, a manuscript text file, individual figure files and optional supplementary information files. For first submissions (i.e. not revised manuscripts), authors may incorporate the manuscript text and figures into a single file up to 3 MB in size; the figures may be inserted in the text at the appropriate positions, or grouped at the end. Supplementary information should be combined and supplied as a single separate file, preferably in PDF format.

The following file types can be uploaded for Article text:

- txt, doc, docx, tex, (pdf [first submissions only])*

*We are unable to accept PDF files for article text for revised manuscripts.

A submission template is available in the Overleaf template gallery to help you prepare a LaTeX manuscript within the *Scientific Reports* formatting criteria.

Scientific Reports is read by scientists from diverse backgrounds. In addition, many are not native English speakers. Authors should, therefore, give careful thought to how their findings may be communicated clearly. Although a shared basic knowledge of science may be assumed, please bear in mind that the language and concepts that are standard in one field may be unfamiliar to non-specialists. Thus, technical jargon should be avoided and clearly explained where its use is unavoidable.

Abbreviations, particularly those that are not standard, should also be kept to a minimum. Where unavoidable, abbreviations should be defined in the text or legends at their first occurrence, and abbreviations should be used thereafter. The background, rationale and main conclusions of the study should be clearly explained. Titles and abstracts in particular should be written in language that will be readily intelligible to any scientist. We strongly recommend that authors ask a colleague with different expertise to review the manuscript before submission, in order to identify concepts and terminology that may present difficulties to non-specialist readers.

The format requirements of *Scientific Reports* are described below.

Scientific Reports uses UK English spelling.

Cover letter

Authors should provide a cover letter that includes the affiliation and contact information for the corresponding author. Authors should briefly explain why the work is considered appropriate for *Scientific Reports*. Authors are asked to suggest the names and contact information for scientific reviewers and they may request the exclusion of certain referees. Finally, authors should indicate whether they have had any prior discussions with a *Scientific Reports* Editorial Board Member about the work described in the manuscript.

Format of manuscripts

In most cases we do not impose strict limits on word counts and page numbers, but we encourage authors to write concisely and suggest authors adhere to the guidelines below. For a definitive list of which limits are mandatory please visit the submission checklist page.

Articles should be no more than 11 typeset pages in length. As a guide, the main text (not including Abstract, Methods, References and figure legends) should be no more than 4,500 words. The maximum title length is 20 words. The Abstract (without heading) - which must be no more than 200 words long and contain no references - should serve both as a general introduction to the topic and as a brief, non-technical summary of the main results and their implications.

The manuscript text file should include the following parts, in order: a title page with author affiliations and contact information (the corresponding author should be identified with an asterisk). The main text of an Article can be organised in different ways and according to the authors' preferences, it may be appropriate to combine sections.

As a guideline, we recommend that sections include an Introduction of referenced text that expands on the background of the work. Some overlap with the Abstract is acceptable. This may then be followed by sections headed Results (with subheadings), Discussion (without subheadings) and Methods.

The main body of text must be followed by References, Acknowledgements (optional), Author Contributions (names must be given as initials), Additional Information (including a Competing Interests Statement), Figure Legends (these are limited to 350 words per figure) and Tables (maximum size of one page). Footnotes are not used.

For first submissions (i.e. not revised manuscripts), authors may choose to incorporate the manuscript text and figures into a single file up to 3 MB in size in either a Microsoft Word, LaTeX, or PDF format - the figures may be inserted within the text at the appropriate positions, or grouped at the end.

For revised manuscripts authors should provide all textual content in a single file, prepared using either Microsoft Word or LaTeX. We do not accept PDF files for article text for revised manuscripts. Figures should be provided as individual files.

Supplementary Information should be combined and supplied as a separate file, preferably in PDF format. The first page of the Supplementary Information file should include the title of the manuscript and the author list.

Authors who do not incorporate the manuscript text and figures into a single file should adhere to the following: all textual content should be provided in a single file, prepared using either Microsoft Word or LaTeX; figures should be provided as individual files.

The manuscript file should be formatted as single-column text without justification. Pages should be numbered using an Arabic numeral in the footer of each page. Standard fonts are recommended and the 'symbols' font should be used for representing Greek characters.

TeX/LaTeX - Authors submitting LaTeX files may use the standard 'article' document class (or similar) or may use the wlscrep.cls file and template provided by Overleaf. Non-standard fonts should be avoided; please use the default Computer Modern fonts. For the inclusion of graphics, we recommend graphicx.sty. Please use numerical references only for citations. Our system cannot accept .bib files. If references are prepared using BibTeX (which is optional), please include the .bbl file with your submission (as a 'LaTeX supplementary file') in order for it to be processed correctly; this file is included automatically in the zip file generated by Overleaf for submissions. Please see this help article on Overleaf for more details. Alternatively ensure that the references (source code) are included within the manuscript file itself. As a final precaution, authors should ensure that the complete .tex file compiles successfully on their own system with no errors or warnings, before submission.

Manuscripts published in *Scientific Reports* are not subject to in-depth copy editing as part of the production process. Authors are responsible for procuring copy editing or language editing services for their manuscripts, either before submission, or at the revision stage, should they feel it would benefit their manuscript. Such services include those provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. *Scientific Reports* authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services. To claim 10% off English editing from Nature Research Editing Service, [click here](#). To claim 10% off American Journal Experts, [click here](#). Please note that the use of an editing service is at the author's own expense, and in no way implies that the article will be selected for peer-review or accepted for publication.

Methods

Where appropriate, we recommend that authors limit their Methods section to 1,500 words. Authors must ensure that their Methods section includes adequate experimental and characterization data necessary for others in the field to reproduce their work. Descriptions of standard protocols and experimental procedures should be given. Commercial suppliers of reagents or instrumentation should be identified only when the source is critical to the outcome of the experiments. Sources for kits should be identified. Experimental protocols that describe the synthesis of new compounds should be included. The systematic name of the compound and its bold Arabic numeral are used as the heading for the experimental protocol. Thereafter, the compound is represented by its assigned bold numeral. Authors should describe the experimental protocol in detail, referring to amounts of reagents in parentheses, when possible (eg 1.03 g, 0.100 mmol). Standard abbreviations for reagents and solvents are encouraged. Safety hazards posed by reagents or protocols should be identified clearly. Isolated mass and percent yields should be reported at the end of each protocol. Any manuscript reporting an experiment/s on live vertebrates (or higher invertebrates), humans or human samples must include a statement of ethical approval in the Methods section (see our detailed requirements for further information on preparing these statements).

References

References will not be copy edited by *Scientific Reports*. References will be linked electronically to external databases where possible, making correct formatting of the references essential.

References should be numbered sequentially, first throughout the text, then in tables, followed by figures; that is, references that only appear in tables or figures should be last in the reference list. Only one publication is given for each number. Only papers or datasets that have been published or accepted by a named publication, recognized preprint server or data repository should be in the numbered list; preprints of accepted papers in the reference list should be submitted with the manuscript. Published conference abstracts and numbered patents may be included in the reference list. Grant details and acknowledgements are not permitted as numbered references. Footnotes are not used.

BibTeX (.bib) bibliography files cannot be accepted. LaTeX submission must either contain all references within the manuscript .tex file itself, or (for authors using the Overleaf template) can include the .bbl file generated during the compilation process as a 'LaTeX supplementary file' (see the "Format of manuscripts" section for more details).

Scientific Reports uses standard *Nature* referencing style. All authors should be included in reference lists unless there are six or more, in which case only the first author should be given, followed by 'et al.'. Authors should be listed last name first, followed by a comma and initials (followed by full stops) of given names. Article and dataset titles should be in Roman text, only the first word of the title should have an initial capital and the title should

be written exactly as it appears in the work cited, ending with a full stop. Book titles should be given in italics and all words in the title should have initial capitals. Journal and data repository names are italicized and abbreviated (with full stops) according to common usage. Volume numbers and the subsequent comma appear in bold. The full page range should be given (or article number), where appropriate.

Published papers:

Printed journals

Schott, D. H., Collins, R. N. & Bretscher, A. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin V lever arm length. *J. Cell Biol.* 156, 35-39 (2002).

Online only

Bellin, D. L. *et al.* Electrochemical camera chip for simultaneous imaging of multiple metabolites in biofilms. *Nat. Commun.* 7, 10535; 10.1038/ncomms10535 (2016).

For papers with more than five authors include only the first author's name followed by 'et al.'.

Books:

Smith, J. Syntax of referencing in *How to reference books* (ed. Smith, S.) 180-181 (Macmillan, 2013).

Online material:

Babichev, S. A., Ries, J. & Lvovsky, A. I. Quantum scissors: teleportation of single-mode optical states by means of a nonlocal single photon. Preprint at <https://arxiv.org/abs/quant-ph/0208066> (2002).

Manaster, J. Sloth squeak. *Scientific American Blog Network* <http://blogs.scientificamerican.com/psi-vid/2014/04/09/sloth-squeak> (2014).

Hao, Z., AghaKouchak, A., Nakhjiri, N. & Farahmand, A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. *figshare* <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.853801> (2014).

Acknowledgements

Acknowledgements should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Grant or contribution numbers may be acknowledged. Assistance from medical writers, proof-readers and editors should also be acknowledged here.

Author contributions

Scientific Reports requires an Author Contribution Statement as described in the Author responsibilities section of our Editorial and Publishing Policies.

Competing interests

A competing interests statement is required for all papers submitted to *Scientific Reports*. If there is no conflict of interest, a statement declaring this must still be included in the paper.

The statement included in the article file must be explicit and unambiguous, describing any potential competing interest (or lack thereof) for EACH contributing author.

Examples of declarations are:

Competing interests

The author(s) declare no competing interests.

Competing interests

Dr X's work has been funded by A. He has received compensation as a member of the scientific advisory board of B and owns stock in the company. He also has consulted for C and received compensation. Dr Y and Dr Z declare no potential conflict of interest.

Data availability

Scientific Reports requires a Data Availability Statement to be included in all submitted manuscripts (at the end of the main text, before the References section); see 'Availability of materials and data' section for more information.

Supplementary Information

Any Supplementary Information should be submitted with the manuscript and will be sent to referees during peer review. It is published online with accepted manuscripts. We request that authors avoid "data not shown" statements and instead make their data available via

deposition in a public repository (see 'Availability of materials and data' for more information). Any data necessary to evaluation of the claims of the paper that are not available via a public depository should be provided as Supplementary Information. Supplementary Information is not edited, typeset or proofed, so authors should ensure that it is clearly and succinctly presented at initial submission, and that the style and terminology conform to the rest of the paper. Authors should include the title of the manuscript and full author list on the first page.

The guidelines below detail the creation, citation and submission of Supplementary Information - publication may be delayed if these are not followed correctly. Please note that modification of Supplementary Information after the paper is published requires a formal correction, so authors are encouraged to check their Supplementary Information carefully before submitting the final version.

1. Multiple pieces of Supplementary Information can be combined and supplied as a single file, or supplied separately (e.g. supplementary videos, spreadsheets [.csv or .xlsx] or data files).
2. Designate each item as Supplementary Table, Figure, Video, Audio, Note, Data, Discussion, Equations or Methods, as appropriate. Number Supplementary Tables and Figures as, for example, "Supplementary Table S1". This numbering should be separate from that used in tables and figures appearing in the main article. Supplementary Note or Methods should not be numbered; titles for these are optional.
3. Refer to each piece of supplementary material at the appropriate point(s) in the main article. Be sure to include the word "Supplementary" each time one is mentioned. Please do not refer to individual panels of supplementary figures.
4. Use the following examples as a guide (note: abbreviate "Figure" as "Fig." when in the middle of a sentence): "Table 1 provides a selected subset of the most active compounds. The entire list of 96 compounds can be found as Supplementary Table S1 online." "The biosynthetic pathway of L-ascorbic acid in animals involves intermediates of the D-glucuronic acid pathway (see Supplementary Fig. S2 online). Figure 2 shows..."
5. Remember to include a brief title and legend (incorporated into the file to appear near the image) as part of every figure submitted, and a title as part of every table.
6. File sizes should be as small as possible, with a maximum size of 50 MB, so that they can be downloaded quickly.

Further queries about submission and preparation of Supplementary Information should be directed to email: scirep.admin@nature.com.

Figure legends

Figure legends begin with a brief title sentence for the whole figure and continue with a short description of what is shown in each panel in sequence and the symbols used; methodological details should be minimised as much as possible. Each legend must total no more than 350 words. Text for figure legends should be provided in numerical order after the references.

Tables

Please submit tables in your main article document in an editable format (Word or TeX/LaTeX, as appropriate), and not as images. Tables that include statistical analysis of data should describe their standards of error analysis and ranges in a table legend.

Equations

Equations and mathematical expressions should be provided in the main text of the paper. Equations that are referred to in the text are identified by parenthetical numbers, such as (1), and are referred to in the manuscript as "equation (1)".

For submissions in a .doc or .docx format please ensure that all equations are provided in an editable Word format. These can be produced with the equation editor included in Microsoft Word.

General figure guidelines

Authors are responsible for obtaining permission to publish any figures or illustrations that are protected by copyright, including figures published elsewhere and pictures taken by professional photographers. The journal cannot publish images downloaded from the internet without appropriate permission.

Figures should be numbered separately with Arabic numerals in the order of occurrence in the text of the manuscript. When appropriate, figures should include error bars. A description of the statistical treatment of error analysis should be included in the figure legend. Please note that schemes are not used; sequences of chemical reactions or experimental procedures should be submitted as figures, with appropriate captions. A limited number of uncaptioned graphics depicting chemical structures - each labelled with their name, by a defined abbreviation, or by the bold Arabic numeral - may be included in a manuscript.

Figure lettering should be in a clear, sans-serif typeface (for example, Helvetica); the same typeface in the same font size should be used for all figures in a paper. Use 'symbols' font for Greek letters. All display items should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, spurious decorative effects (such as three-dimensional 'skyscraper' histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical

axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. Labelling must be of sufficient size and contrast to be readable, even after appropriate reduction. The thinnest lines in the final figure should be no smaller than one point wide. Authors will see a proof that will include figures.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case bold a, b, and so on, in the same type size as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with only the first letter of each label capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature (for example, ms rather than msec) or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by commas (1,000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined on the bar itself rather than in the legend. In legends, please use visual cues rather than verbal explanations such as "open red triangles".

Unnecessary figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced at the smallest size at which essential details are visible.

Figures for peer review

At the initial submission stage authors may choose to upload separate figure files or to incorporate figures into the main article file, ensuring that any inserted figures are of sufficient quality to be clearly legible.

When submitting a revised manuscript all figures must be uploaded as separate figure files ensuring that the image quality and formatting conforms to the specifications below.

Figures for publication

Each complete figure must be supplied as a separate file upload. Multi-part/panel figures must be prepared and arranged as a single image file (including all sub-parts; a, b, c, etc.). Please do not upload each panel individually.

Please read the digital images integrity and standards section of our Editorial and Publishing Policies. When possible, we prefer to use original digital figures to ensure the highest-quality reproduction in the journal. When creating and submitting digital files, please follow the guidelines below. Failure to do so, or to adhere to the following guidelines, can significantly delay publication of your work.

Authors are responsible for obtaining permission to publish any figures or illustrations that are protected by copyright, including figures published elsewhere and pictures taken by professional photographers. The journal cannot publish images downloaded from the internet without appropriate permission.

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1. Line art, graphs, charts and schematics

For optimal results, all line art, graphs, charts and schematics should be supplied in vector format, such as EPS or AI, and should be saved or exported as such directly from the application in which they were made. Please ensure that data points and axis labels are clearly legible.

2. Photographic and bitmap images

All photographic and bitmap images should be supplied in a bitmap image format such as tiff, jpg, or psd. If saving tiff files, please ensure that the compression option is selected to avoid very large file sizes.

Please do not supply Word or Powerpoint files with placed images. Images can be supplied as RGB or CMYK (note: we will not convert image colour modes).

Figures that do not meet these standards will not reproduce well and may delay publication until we receive high-resolution images.

3. Chemical structures

Chemical structures should be produced using ChemDraw or a similar program. All chemical compounds must be assigned a bold, Arabic numeral in the order in which the compounds are presented in the manuscript text. Structures should then be exported into a 300 dpi RGB tiff file before being submitted.

4. Stereo images

Stereo diagrams should be presented for divergent 'wall-eyed' viewing, with the two panels separated by 5.5 cm. In the final accepted version of the manuscript, the stereo images should be submitted at their final page size.

Statistical guidelines

Every article that contains statistical testing should state the name of the statistical test, the n value for each statistical analysis, the comparisons of interest, a justification for the use of that test (including, for example, a discussion of the normality of the data when the test is appropriate only for normal data), the alpha level for all tests, whether the tests were one-tailed or two-tailed, and the actual P value for each test (not merely "significant" or " $P < 0.05$ "). It should be clear what statistical test was used to generate every P value. Use of the word "significant" should always be accompanied by a P value; otherwise, use "substantial," "considerable," etc.

Data sets should be summarized with descriptive statistics, which should include the n value for each data set, a clearly labelled measure of centre (such as the mean or the median), and a clearly labelled measure of variability (such as standard deviation or range). Ranges are more appropriate than standard deviations or standard errors for small data sets. Graphs should include clearly labelled error bars. Authors must state whether a number that follows the \pm sign is a standard error (s.e.m.) or a standard deviation (s.d.).

Authors must justify the use of a particular test and explain whether their data conform to the assumptions of the tests. Three errors are particularly common:

- Multiple comparisons: When making multiple statistical comparisons on a single data set, authors should explain how they adjusted the alpha level to avoid an inflated Type I error rate, or they should select statistical tests appropriate for multiple groups (such as ANOVA rather than a series of t -tests).
- Normal distribution: Many statistical tests require that the data be approximately normally distributed; when using these tests, authors should explain how they tested their data for normality. If the data do not meet the assumptions of the test, then a non-parametric alternative should be used instead.
- Small sample size: When the sample size is small (less than about 10), authors should use tests appropriate to small samples or justify their use of large-sample tests.

Chemical and biological nomenclature and abbreviations

Molecular structures are identified by bold, Arabic numerals assigned in order of presentation in the text. Once identified in the main text or a figure, compounds may be referred to by their name, by a defined abbreviation, or by the bold Arabic numeral (as long as the compound is referred to consistently as one of these three).

When possible, authors should refer to chemical compounds and biomolecules using systematic nomenclature, preferably using IUPAC. Standard chemical and biological abbreviations should be used. Unconventional or specialist abbreviations should be defined at their first occurrence in the text.

Gene nomenclature

Authors should use approved nomenclature for gene symbols, and use symbols rather than italicized full names (for example Ttn, not titin). Please consult the appropriate nomenclature databases for correct gene names and symbols. A useful resource is LocusLink.

Approved human gene symbols are provided by HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), e-mail: hgnc@genenames.org; see also www.genenames.org. Approved mouse symbols are provided by The Jackson Laboratory, e-mail: nomen@informatics.jax.org; see also www.informatics.jax.org/mgihome/nomen.

For proposed gene names that are not already approved, please submit the gene symbols to the appropriate nomenclature committees as soon as possible, as these must be deposited and approved before publication of an article.

Avoid listing multiple names of genes (or proteins) separated by a slash, as in 'Oct4/Pou5f1', as this is ambiguous (it could mean a ratio, a complex, alternative names or different subunits). Use one name throughout and include the other at first mention: 'Oct4 (also known as Pou5f1)'.

Characterization of chemical and biomolecular materials

Scientific Reports is committed to publishing technically sound research. Manuscripts submitted to the journal will be held to rigorous standards with respect to experimental methods and characterization of new compounds. Authors must provide adequate data to support their assignment of identity and purity for each new compound described in the manuscript. Authors should provide a statement confirming the source, identity and purity of known compounds that are central to the scientific study, even if they are purchased or resynthesized using published methods.

1. Chemical identity

Chemical identity for organic and organometallic compounds should be established through spectroscopic analysis. Standard peak listings (see formatting guidelines below) for ¹H NMR and proton-decoupled ¹³C NMR should be provided for all new compounds. Other NMR data should be reported (³¹P NMR, ¹⁹F NMR, etc.) when appropriate. For new materials, authors should also provide mass spectral data to support molecular weight identity. High-resolution mass spectral (HRMS) data are preferred. UV or IR spectral data may be reported for the identification of characteristic functional groups, when appropriate. Melting-point ranges should be provided for crystalline materials. Specific rotations may be reported for chiral compounds. Authors should provide references, rather than detailed

procedures, for known compounds, unless their protocols represent a departure from or improvement on published methods.

2. Combinational compound libraries

Authors describing the preparation of combinatorial libraries should include standard characterization data for a diverse panel of library components.

3. Biomolecular identity

For new biopolymeric materials (oligosaccharides, peptides, nucleic acids, etc.), direct structural analysis by NMR spectroscopic methods may not be possible. In these cases, authors must provide evidence of identity based on sequence (when appropriate) and mass spectral characterization.

4. Biological constructs

Authors should provide sequencing or functional data that validates the identity of their biological constructs (plasmids, fusion proteins, site-directed mutants, etc.) either in the manuscript text or the Methods section, as appropriate.

5. Sample purity

Evidence of sample purity is requested for each new compound. Methods for purity analysis depend on the compound class. For most organic and organometallic compounds, purity may be demonstrated by high-field ^1H NMR or ^{13}C NMR data, although elemental analysis ($\pm 0.4\%$) is encouraged for small molecules. Quantitative analytical methods including chromatographic (GC, HPLC, etc.) or electrophoretic analyses may be used to demonstrate purity for small molecules and polymeric materials.

6. Spectral data

Detailed spectral data for new compounds should be provided in list form (see below) in the Methods section. Figures containing spectra generally will not be published as a manuscript figure unless the data are directly relevant to the central conclusions of the paper. Authors are encouraged to include high-quality images of spectral data for key compounds in the Supplementary Information. Specific NMR assignments should be listed after integration values only if they were unambiguously determined by multidimensional NMR or decoupling experiments. Authors should provide information about how assignments were made in a general Methods section.

Example format for compound characterization data. mp: 100-102 °C (lit.^{ref} 99-101 °C); TLC (CHCl_3 :MeOH, 98:2 v/v): $R_f = 0.23$; $[\alpha]_D = -21.5$ (0.1 M in n-hexane); ^1H NMR (400

MHz, CDCl₃): δ 9.30 (s, 1H), 7.55-7.41 (m, 6H), 5.61 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 5.40 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 4.93 (m, 1H), 4.20 (q, J = 8.5 Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.25 (t, J = 8.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 165.4, 165.0, 140.5, 138.7, 131.5, 129.2, 118.6, 84.2, 75.8, 66.7, 37.9, 20.1; IR (Nujol): 1765 cm⁻¹; UV/Vis: λ_{max} 267 nm; HRMS (m/z): [M]⁺ calcd. for C₂₀H₁₅C₁₂NO₅, 420.0406; found, 420.0412; analysis (calcd., found for C₂₀H₁₅C₁₂NO₅): C (57.16, 57.22), H (3.60, 3.61), Cl (16.87, 16.88), N (3.33, 3.33), O (19.04, 19.09).

7. Crystallographic data for small molecules

Manuscripts reporting new three-dimensional structures of small molecules from crystallographic analysis should include a .cif file and a structural figure with probability ellipsoids for publication as Supplementary Information. These must have been checked using the IUCR's CheckCIF routine, and a PDF copy of the output must be included with the submission, together with a justification for any alerts reported. Crystallographic data for small molecules should be submitted to the Cambridge Structural Database and the deposition number referenced appropriately in the manuscript. Full access must be provided on publication.

8. Macromolecular structural data

Manuscripts reporting new structures should contain a table summarizing structural and refinement statistics. Templates are available for such tables describing NMR and X-ray crystallography data. To facilitate assessment of the quality of the structural data, a stereo image of a portion of the electron density map (for crystallography papers) or of the superimposed lowest energy structures (≥ 10 ; for NMR papers) should be provided with the submitted manuscript. If the reported structure represents a novel overall fold, a stereo image of the entire structure (as a backbone trace) should also be provided.