

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DENISE FERRACIOLI ODA

Ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre *Enterococcus faecalis* realizada pela combinação do aparelho fotopolimerizador a LED e curcumina

BAURU
2016

DENISE FERRACIOLI ODA

Ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre *Enterococcus faecalis* realizada pela combinação do aparelho fotopolimerizador a LED e curcumina

Dissertação constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes

Versão Corrigida

BAURU
2016

Od1a Ferracioli Oda, Denise
Ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre *Enterococcus faecalis* realizada pela combinação do aparelho fotopolimerizador a LED e curcumina / Denise Ferracioli Oda. – Bauru, 2016.
50p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Nelson Mamoru Oda e Rosana de Lourdes Ferracioli Oda, meu alicerce e porto seguro, pessoas maravilhosas que não mediram esforços para me ajudar a chegar até aqui. Essa conquista é de vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por iluminar meu caminho, minhas escolhas e por permitir que pessoas admiráveis cruzassem o meu caminho.

Agradeço aos meus pais, **Nelson Mamoru Oda e Rosana de Lourdes Ferracioli Oda**, por toda confiança, dedicação e amor incondicional que recebi, além de todo suporte e apoio em minhas decisões.

Agradeço aos meus irmãos, **Eduardo Ferracioli Oda e Cristiane Ferracioli Oda**, pela eterna amizade e companheirismo.

Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes**, obrigada por toda a amizade e pelo enorme conhecimento transmitido a mim, sempre com muita paciência e atenção.

Agradeço ao **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte** pelo auxílio no desenvolvimento e aquisição de equipamento para o desenvolvimento deste trabalho, além das ajudas em sempre esclarecer dúvidas clínicas e sobre estatística.

Agradeço à **Profa. Dra. Flaviana Bombarda Andrade** por me auxiliar nos procedimentos de microbiologia, bem como esclarecer dúvidas e disponibilizar materiais para a sua execução.

Agradeço também aos demais professores do Departamento de Endodontia: **Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, Prof. Dr. Norberti Bernardinelli e Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan**, por compartilharem seus valiosos conhecimentos e conselhos, me engrandecendo tanto na parte clínica quanto acadêmica.

Agradeço aos funcionários **Andressa, Suely e Edimauro** por toda ajuda e gentileza, sempre auxiliando na solução de problemas relacionados a pacientes, materiais e documentos.

Agradeço ao **Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e Lilian Tan Moriyama**, ambos da USP-São Carlos, pela idéia e ajuda no trabalho, bem como na realização dos testes de intensidade da luz.

Agradeço à **Thelma Lopes Silva**, pela ajuda e ensinamentos prestados na realização da diluição da curcumina.

Agradeço a grande amizade de todos os pós-graduandos do Departamento de Endodontia, por todos os momentos compartilhados, em especial a **Rafaela Zancan, Talita Tartari, Jussaro Duque e Lyz Canallis**. Obrigada por todo o companheirismo e alegria que vocês me proporcionaram durante essa jornada.

Agradeço à **Francine Cesário, Raquel Midená, Layla Vasconcelos e Thaís Pereira** pela grande amizade e paciência que tiveram comigo enquanto eu as acompanhava durante as contaminações.

Agradeço ao **Rafael Maenoso** por toda ajuda e apoio que me deu durante o mestrado.

Agradeço ao **Marcelo Milanda e Pepe Burgos** por toda a ajuda e paciência em explicar a manusear equipamentos e executar procedimentos no CIP, vocês foram fundamentais.

Agradeço também a **Márcia Graeff** pelas belas imagens do Confocal, além de ficar até tarde comigo nos dias de análise.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Prof. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, diretora da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**, coordenador da pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**, coordenador da pós-graduação da área de concentração de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Agradeço à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** por financia e investir na realização deste trabalho.

“Faça o melhor que puder. Seja o melhor que puder. O resultado virá na mesma proporção de seu esforço”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* da terapia fotodinâmica empregando a combinação do aparelho fotopolimerizador a LED e curcumina

Este trabalho avaliou a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica (TFD) realizada pela combinação do aparelho fotopolimerizador (LED 430-480nm) e curcumina 20 μ M, além de sua associação com Gel Carbopol 2%. Fotos padronizadas, na ausência e presença do gel Carbopol no interior do conduto, previamente preparado, foram analisadas no software OriginLab para verificar a manutenção da intensidade de luz ao longo do canal. Na análise antimicrobiana, uma linhagem de ATCC 4083 do *Enterococcus faecalis* foi utilizada para formação de biofilme sobre a superfície de discos de dentina (4mm de diâmetro) e para contaminação intratubular de segmentos radiculares (15mm), ambos obtidos de raízes bovinas. A ação sobre o biofilme foi avaliada de acordo com os grupos (n=20): [BST]: sem tratamento (controle); [BC]: Curcumina; [BL]: LED; [BCL]: Curcumina + LED e [BAL]: Azul de metileno 0.05% + LASER (660nm). A ação intratubular foi avaliada nos grupos (n=8): [IST]: sem tratamento (controle); [ICL]: Curcumina + LED; [ICGL]: Curcumina + Gel Carbopol + LED e [IAL]: Azul de metileno 0.05% + LASER (660nm). Discos e segmentos foram analisados em Microscópio Confocal de Varredura a LASER para detectar a porcentagem de bactérias viáveis. Os dados obtidos, que apresentaram distribuição normal, foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, a 1 critério, e para distribuição não normal, Kruskall-Wallis. Os resultados mostraram que a presença do gel Carbopol no conduto não contribuiu na manutenção da intensidade da luz LED. Sobre o biofilme, os grupos BAL e BCL apresentaram maior redução microbiana, sem diferença entre eles, enquanto que, na ação intratubular, o IAL apresentou a melhor ação antimicrobiana, com diferença estatística com os demais. Concluiu-se que a TFD realizada com o fotopolimerizador e curcumina é tão eficaz quanto a realizada com LASER e azul de metileno. Entretanto, é necessário investigar meios que permitam a sua utilização no interior do conduto radicular, já que o Gel Carbopol não manteve a intensidade da luz ao longo do trajeto.

Palavras chave: Desinfecção, Endodontia, Fotoquimioterapia

ABSTRACT

Antimicrobial activity of the combination of LED curing light and curcumin on *Enterococcus faecalis* in photodynamic therapy

This work aimed to evaluate the antimicrobial action of photodynamic therapy (PDT) by the combination of light curing device (LED 430-480nm) and Curcumin 20 μ M, and its in association with Carbopol Gel 2%. Standard photos in the absence and presence of Carbopol gel inside of the root canal previously prepared, were analyzed in OriginLab software to check the light intensity maintenance along the canal. In microbial analysis, a strain of *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 was used to make biofilm on the surface of dentin disks (4 mm in diameter), and intratubular contamination of root segments (15 mm), both obtained from bovine roots. The action on the biofilm was evaluated according to groups (n = 20): [BNT]: no treatment (control); [BC]: Curcumin; [BL]: LED; [BCL]: Curcumin + LED and [BML]: methylene blue 0.05% + LASER (660nm). Intratubular action was evaluated in groups (n = 8): [INT]: no treatment (control); [ICL]: Curcumin + LED; [ICGL]: Curcumin Carbopol Gel + LED + and [IML]: methylene blue 0.05% + LASER (660nm). Disks and segments were analyzed in LASER Scanning Confocal Microscope to detect the percentage of viable bacteria. The data, which showed normal distribution, were statistically analyzed by ANOVA 1 WAY test, and for no normal distribution, Kruskal-Wallis. The results showed that presence of Carbopol gel in the root canal did not increase the maintenance of intensity of LED light. About the biofilm, BML and BCL had higher microbial reduction, no difference between them, while in action intratubular, IML presented the higher antimicrobial action, with statistical difference with the other. It was concluded that the PDT realized with curing light and Curcumin is as effective as LASER and methylene blue. However, it is necessary to investigate ways that allow its use inside the root canal, because the Carbopol gel did not maintain the intensity of light until apex.

Key words: Disinfection, Endodontics, Photochemotherapy

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	ARTIGO.....	17
3	DISCUSSÃO.....	41
4	REFERÊNCIAS.....	47

1. *Introdução*

1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico está intimamente relacionado à eliminação ou redução da quantidade de micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares (BYSTROÈM, SUNDQVIST, 1981; VERTUCCI, 1984; SJÖGREN, FIGDOR, PERSSON, 1998). Contudo, em razão da alta complexidade anatômica, apenas a realização do preparo biomecânico dos canais não é suficiente para atingir a condição desejada, independente das técnicas de instrumentação utilizadas (NAIR et al, 2005; RICUCCI, SIQUEIRA, 2008). Esta manutenção de bactérias no interior do sistema de canais radiculares já foi relacionada aos casos de insucesso pós tratamento endodôntico (SIQUEIRA, RÔÇAS, 2008), sendo o *Enterococcus faecalis* a principal cepa bacteriana isolada nestas situações (SUNDQVIST et al, 1998; PINHEIRO et al, 2003; RÔÇAS, SIQUEIRA, SANTOS, 2004).

Em razão dessa dificuldade, o preparo biomecânico pode ser complementado com o uso de diferentes medicações intracanal, aumentando, assim, a sua efetividade antimicrobiana (HEITHERSAY, 1975). Porém, alguns estudos conseguiram verificar que o *Enterococcus faecalis* é capaz de oferecer resistência à ação de certos medicamentos utilizados na endodontia, tais como, o hidróxido de cálcio (EVANS et al, 2002; NAKAJO et al, 2006; WECKWERTH et al, 2013) e determinados antibióticos (AL-AHMAD et al, 2014; AL-BADAH et al, 2015). Diante do crescente aumento da resistência bacteriana, é de extrema importância encontrar terapias antimicrobianas alternativas, efetivas e que não contribuam com o surgimento de cepas bacterianas resistentes.

A Terapia Fotodinâmica (TFD), procedimento inicialmente proposto para o combate de células tumorais, combina ação antimicrobiana de amplo espectro com a não seleção de cepas microbianas resistentes. Seu poder bactericida deve-se à presença do oxigênio singlete, agente

altamente instável e reativo, resultado da interação de um agente fotossensibilizador com uma fonte de luz, na presença de oxigênio molecular (BONSOR et al, 2006, SOUKOS et al, 2006).

O emprego da TFD na odontologia tem aumentado recentemente, assim como, sua aplicação nos canais radiculares, demonstrando resultados satisfatórios na redução bacteriana (FIMPLE et al, 2008), principalmente, quando combinados com o preparo biomecânico (GARCEZ et al, 2007, ARNEIRO et al, 2014). São diversos os tipos de fonte de luz e agentes fotossensibilizadores passíveis de serem utilizados na sua realização, entretanto, a escolha não deve ser aleatória, já que o comprimento de onda da luz empregada deve se enquadrar na banda de absorção do fotossensibilizador, geralmente, um corante.

O LASER (abreviação do inglês Light Amplified by Stimulated Emission Radiation), é a fonte de luz mais utilizada e estudada na TFD (SOUKOS et al, 2006). O mesmo pode ser de baixa ou alta potência, sendo suas principais características a elevada concentração de energia, monocromaticidade, coerência e baixa divergência. O comprimento de onda usualmente empregado para este procedimento compreende a faixa do vermelho visível (630-660nm), como os LASERs de Diodo (SOUKOS et al, 2006), em combinação com os agentes fotossensibilizadores azul de o-toluidina (RIOS et al, 2011) e azul de metileno (SOUKOS et al, 2006). No entanto, o LASER ainda é um equipamento de baixa acessibilidade a muitos profissionais, uma vez que requer um alto investimento, bem como, um treinamento prévio específico.

Os Diodos emissores de luz, ou LEDs (do inglês Light Emitting Diode), são vistos como uma fonte de luz alternativa e promissora para a TFD, uma vez que seu uso apresenta reduções microbianas semelhantes às obtidas com o LASER (CHUI et al, 2013). Os LEDs utilizados podem apresentar o comprimento de onda na faixa do vermelho visível (630-660nm) (RIOS et al, 2011) e do azul visível (450-500nm) (CHUI et al, 2013), sendo combinados com os agentes fotossensibilizadores de coloração azul já citados, e com os de coloração

avermelhada, como a eritrosina (COSTA et al, 2011), rosa de bengala (CHUI et al, 2013) ou curcumina (PASCHOAL et al, 2013).

A principal vantagem do LED sobre o LASER é em relação ao seu baixo custo. Além disso, a sua utilização torna-se mais favorável se o LED a ser utilizado na TFD for um dispositivo já presente nos consultórios odontológicos, como o aparelho fotopolimerizador que, nos poucos estudos realizados, demonstrou ser eficaz em reduzir a quantidade de micro-organismos viáveis (PAULINO et al, 2005, LEE et al, 2012). Porém, ainda não há o conhecimento se o aparelho fotopolimerizador utilizado como fonte de luz é capaz de atingir resultados semelhantes aos obtidos com o LASER.

Além disso, diferente do LASER, o LED não apresenta luz coerente, ou seja, sofre divergência ao se afastar de sua fonte. Esta característica pode influenciar a eficácia da TFD realizada ao longo do canal radicular, pois, a densidade de potência presente no terço apical será inferior àquela do terço cervical. Dispositivos, como a fibra óptica, podem ser acoplados ao aparelho na tentativa de contornar este obstáculo (GARCEZ et al, 2013), no entanto, pelos princípios da física, a luz LED continuará a perder potência ao longo da fibra.

Na tentativa de solucionar dificuldade semelhante, um gel, à base de hidrogel Carbopol e emulsão lipídica, é utilizado por pesquisadores no combate a células tumorais como acoplador entre a fonte de luz e o tecido a ser tratado. Este gel aumenta a propagação de luz, fazendo com que esta alcance toda a superfície da lesão de modo homogêneo, intensificando os resultados do procedimento. Por ser basicamente composto por água, este é um material altamente biológico para utilização tópica ou injetável, como é realizado no combate a determinados tumores (DA SILVA, 2014).

Sendo assim, é de grande valia avaliar a ação da TFD realizada por meio do aparelho fotopolimerizador a LED, e encontrar meios, como o Gel Carbopol, que possibilitem a

propagação da luz ao longo do canal radicular sem que ocorra a queda de sua intensidade, tornando este procedimento mais acessível ao cirurgião dentista.

2. *Artigo*

2 ARTIGO

O artigo presente nesta dissertação foi escrito de acordo com as instruções e orientações para a submissão de artigos apresentados na Revista Dental Press Endodontics.

2.1 Artigo 1

Título: Ação antimicrobiana sobre o *Enterococcus faecalis* da terapia fotodinâmica empregando a combinação do aparelho fotopolimerizador a LED e curcumina

Resumo

Introdução: Este trabalho teve o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica (TFD) realizada pela combinação do aparelho fotopolimerizador (LED 430-480nm) e curcumina 20 μ M, além de sua associação com Gel Carbopol 2%.

Métodos: Fotos padronizadas, na ausência e presença do gel Carbopol no interior do conduto, previamente preparado, foram analisadas no software OriginLab para verificar a manutenção da intensidade de luz ao longo do canal. Na análise antimicrobiana, uma linhagem de ATCC 4083 do *Enterococcus faecalis* foi utilizada para formação de biofilme sobre a superfície de discos de dentina (4mm de diâmetro), e para contaminação intratubular de segmentos radiculares (15mm), ambos obtidos de raízes bovinas. A ação sobre o biofilme foi avaliada de acordo com os grupos (n=20): [BST]: sem tratamento (controle); [BC]: Curcumina; [BL]: LED; [BCL]: Curcumina + LED e [BAL]: Azul de metileno 0.05% + LASER (660nm). A ação intratubular foi avaliada nos grupos (n=8): [IST]: sem tratamento (controle); [ICL]: Curcumina + LED; [ICGL]: Curcumina + Gel Carbopol + LED e [IAL]: Azul de metileno 0.05% + LASER (660nm). Discos e segmentos foram analisados em Microscópio Confocal de Varredura a LASER para detectar a porcentagem de bactérias viáveis. Os dados obtidos, que apresentaram distribuição normal, foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, a 1 critério, e para distribuição não normal, Kruskal-Wallis.

Resultados: A presença do gel Carbopol no conduto não contribuiu na manutenção da intensidade da luz LED. Sobre o biofilme, os grupos BAL e BCL apresentaram maior redução

microbiana, sem diferença entre eles, enquanto que na ação intratubular, o IAL apresentou a melhor ação antimicrobiana, com diferença estatística com os demais.

Conclusão: Concluiu-se que a TFD realizada com o fotopolimerizador e curcumina é tão eficaz quanto a realizada com LASER e azul de metileno. Entretanto, é necessário investigar meios que permitam a sua utilização no interior do conduto radicular, já que o Gel Carbopol não manteve a intensidade da luz ao longo do trajeto.

Palavras chaves: Desinfecção, Endodontia, Fotoquimioterapia.

Introdução

Uma das chaves para obtenção do sucesso nos tratamentos endodônticos é a redução ou eliminação de microorganismos presentes no sistema de canais radiculares¹. Porém, devido a sua alta complexidade anatômica, esta condição, muitas vezes, não é alcançada, independente das técnicas de instrumentação utilizadas²⁻⁴. Alguns autores relacionaram esta permanência de micro-organismos aos casos de insucesso em endodontia⁵, principalmente na presença do *Enterococcus faecalis*, bactéria mais freqüentemente isolada nestas situações⁶⁻⁸.

Frente a essa dificuldade, novas abordagens para a anti-sepsia dos canais têm sido testadas para auxiliar o preparo bio-mecânico⁹⁻¹¹. Dentre elas destaca-se a Terapia Fotodinâmica (TFD), que associa resultados antimicrobianos satisfatórios a uma rápida ação, não necessitando de longos períodos, em comparação às medicações intracanalais^{12,13}. Seu efeito antibacteriano dá-se pela combinação de uma fonte de luz e um fotossensibilizador não tóxico, no qual este, ao ser ativado pela luz, reage com o oxigênio molecular presente no meio, formando o oxigênio singlete, agente altamente reativo e considerado o principal responsável pela morte bacteriana¹⁴.

As fontes de luz utilizadas na terapia fotodinâmica podem ser o LASER de baixa potência ou os Diodos Emissores de Luz (LED), em diferentes comprimentos de onda¹⁵. O LASER apresenta elevada concentração de energia, baixa divergência, coerência e monocromaticidade¹⁴ e consiste na principal fonte de luz utilizada na TFD. Junto aos fotossensibilizadores de coloração azul, como o azul de o-toluidina e azul de metileno, o LASER mais empregado é o de diodo (630 - 660nm)¹¹ que, com auxílio de uma fibra óptica, é capaz de irradiar toda a extensão do conduto radicular, alcançando alta eficácia antimicrobiana, mesmo quando aplicado isoladamente do preparo bio-mecânico^{11,12}.

Os LEDs podem ser utilizados dentro da faixa do vermelho visível (628 - 640nm), associando-os aos fotossensibilizadores de coloração azul já citados¹⁶, ou na faixa do azul visível (450 - 495nm) sendo, então, associados aos fotossensibilizadores de coloração avermelhada, como a eritrosina¹⁷, rosa de bengala¹⁸ e curcumina¹⁹. Estes são comercialmente mais interessantes, pois, além de apresentarem custo reduzido em comparação ao LASER, os LEDs azuis estão, frequentemente, presentes nos consultórios odontológicos, como os aparelhos fotopolimerizadores a LED^{20, 21}. Trabalhos in vitro com suspensão bacteriana, que utilizaram o LED azul como fonte de luz, em combinação aos corantes rosa de bengala e curcumina, demonstraram redução significativa no número de bactérias viáveis^{17, 19, 22}, porém, ainda não é possível afirmar se a TFD realizada com fotopolimerizadores é tão eficaz quanto àquela realizada com LASERs.

Além disso, a luz LED apresenta maior divergência ao se afastar de sua fonte, provocando a queda na densidade de potência da superfície irradiada a uma determinada distância. Esta característica prejudica a sua utilização em regiões profundas, como os canais radiculares. Em TFD de células tumorais, dificuldade semelhante foi solucionada com a utilização de um gel acoplador entre a fonte de luz e o tecido a ser tratado, aumentando a propagação da luz sobre a superfície e elevando, assim, a eficácia do tratamento. Neste caso, a base do gel foi o Hidrogel Carbopol, material amplamente utilizado para a suspensão e emulsificação de diversos produtos e que, por possuir alto teor de água em sua composição, não apresenta danos aos tecidos biológicos, sendo considerado um material seguro para aplicação tópica²³.

Assim, seria interessante avaliar a eficácia do aparelho fotopolimerizador como fonte de luz, junto à curcumina em TFD de canais radiculares, além de investigar se o uso do Gel Carbopol seria capaz de melhorar a propagação da luz ao longo do conduto, mantendo sua eficácia e tornando este procedimento mais acessível aos cirurgiões dentistas.

Hipótese nula deste trabalho foi que o uso combinado do aparelho fotopolimerizador a LED azul e curcumina apresenta eficácia antimicrobiana semelhante à obtida pelo uso combinado do LASER vermelho e azul de metileno.

Materiais e Métodos

Propagação da Luz LED (450-470nm) por meio do Gel Carbopol 2% ao longo do Canal Radicular

Delineamento Experimental

Esta etapa apresentou um fator de variação (Preenchimento do conduto) dividido em dois níveis: Presença [G] e Ausência [SG] do Gel Carbopol 2% (Farmácia Specifica, Bauru - São Paulo, Brasil). A variável de resposta foi a intensidade e decaimento da luz propagada no interior canal radicular ao longo de sua extensão, calculada por meio do programa OriginLab (OriginLab Corporation, Northampton-MA, USA).

Seleção e Preparo das Amostras

Oito segmentos de raízes com 15mm de comprimento, obtidas de incisivos bovinos onde as coroas foram removidas, tiveram seus canais radiculares preparados, sendo instrumentados até a lima K #120. Para a irradiação do conduto, foi utilizado um colimador de alumínio, abertura de 1,5mm de diâmetro, fixado na extremidade da ponteira do aparelho fotopolimerizador (Optilight Color, Gnatus Equipamentos Médico-Odontológicos, Ribeirão Preto - SP, Brasil) e posicionado na abertura e centro do conduto radicular. (Figura 01)

Grupos Experimentais

[G] - Gel Carbopol: Por meio de uma capillary tip acoplada a uma seringa plástica, o gel foi inserido no canal radicular, iniciando-se a inserção pelo terço apical, até o completo preenchimento do canal, e então realizada a irradiação;

[SG] - Sem Gel Carbopol: Irradiação do conduto radicular vazio.

Durante a irradiação, foram realizadas fotografias com a câmera Nikon D3100, nos parâmetros 1/200 segundos Abertura:F25 ISO:200, em ambiente totalmente escuro. Por meio do Software OriginLab, os pixels destas imagens foram convertidos em milímetros e, então, geradas imagens e gráficos, representando a distribuição da luz ao longo do conduto, nos terço cervical, médio e apical, indicando as diferentes intensidades e o decaimento da mesma.

*Avaliação da ação antimicrobiana dos diferentes tratamentos realizados sobre *Enterococcus faecalis**

Delineamento Experimental

Esta fase experimental foi dividida em duas etapas:

- Ação sobre o Biofilme, que apresentou um fator de variação (Tratamento), dividido em cinco níveis: [BST] Sem Tratamento, [BC] Curcumina 20 μ M (Farmácia Específica, Bauru - São Paulo), [BL] LED (450-470nm, potência: 1200mW/cm² \pm 200mW/cm²) (Optilight Color, Gnatus Equipamentos Médico-Odontológicos, Ribeirão Preto - SP, Brasil), [BCL] Curcumina 20 μ M + LED (450-495nm) e [BAL] Azul de Metileno 0.05% (Chimiolux 5, DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA. São Carlos/SP - Brasil) + LASER (660nm) (MMOptics LTDA, São Carlos - SP, Brasil).

- Ação Intratubular, que apresentou um fator de variação (Tratamento), dividido em quatro níveis: [IST] Sem Tratamento, [ICL] Curcumina 20 μ M + LED, [ICGL] Curcumina 20 μ M + Gel Carbopol 2% + LED (450-495nm) e [IAL] Azul de Metileno 0.05% + LASER (660nm).

Para ambos os testes, foi utilizada a linhagem ATCC 4083 de *Enterococcus faecalis*, onde a variável de resposta foi a viabilidade bacteriana presente após a execução dos tratamentos, avaliada por meio de Microscopia Confocal de Varredura a LASER (MCVL), (Leica TCS-SPE, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha). O escaneamento foi realizado com a objetiva de 40x, a cada 1 μ m de profundidade até o limite de 14 μ m, em alta resolução (1024 X 1024 pixels), e as imagens foram processadas nos softwares Leica LAS AF Lite para fragmentação das camadas, e no software BioImageL TM v21 para obtenção da porcentagem de bactérias viáveis e valor do biovolume.

Seleção e Preparo das Amostras

Para a formação de Biofilme, foram utilizados 25 discos de dentina, retirados de raízes de incisivos bovinos, sendo suas superfícies planificadas e polidas com lixas d' água de granulações 300, 600 e 900. Previamente à esterelização dos espécimes em autoclave a 120°C, eles foram limpos em cuba ultrassônica, imersos em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (Rioquímica Industria Farmacêutica, São José do Rio Preto - SP, Brasil), Ácido Etilenodiamino

Tetracético (EDTA) a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã - PR, Brasil) a 17% e soro fisiológico, durante 15 minutos em cada irrigante. No interior da câmara de Fluxo Laminar, os discos foram posicionados em placa de 24 poços e, então, inoculados por 900µl de suspensão bacteriana pura ($1,4 \times 10^9$ CFU/mL) e 100µl de meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI, Difco, Kansas City, MO, USA). A cada intervalo de 48 horas, a suspensão era substituída por 1ml de meio BHI até completar o total de 21 dias; período em que a placa era mantida fechada em estufa, a 37°C. Em seguida, os espécimes foram divididos entre os grupos experimentais para realização dos tratamentos.

Para a contaminação intratubular, foram utilizados 32 segmentos de raízes de dentes bovinos, apresentando 15mm de comprimento, obtidos por meio da remoção das coroas e os 5mm apicais, e seus canais instrumentados até lima K#120. Previamente à esterelização dos espécimes em autoclave a 120°C, os mesmos foram limpos em cuba ultrassônica, imersos em NaOCl a 1%, EDTA a 17% e soro fisiológico, durante 15 minutos em cada irrigante. No interior da câmara de fluxo laminar, foi realizada a contaminação intratubular dos espécimes, totalizando 7 dias de experimento que inclui diferentes ciclos de centrifugações, seguindo a metodologia proposta por Andrade et al, em 2015²⁴ e, em seguida, divididos em números iguais entre os diferentes grupos experimentais.

Grupos Experimentais para o Tratamento do Biofilme:

[BST]: Sem tratamento (Controle);

[BC]: Aplicação de 20µl de Curcumina sobre o biofilme, durante 5 minutos;

[BL]: Irradiação de luz LED à distância de 2mm, durante 5 minutos;

[BCL]: Aplicação de 20µl Curcumina sobre o biofilme, durante 5 minutos, seguida da irradiação de luz LED à distância de 2mm, durante 5 minutos;

[BAL]: Aplicação da solução de Azul de Metileno a 0.05% durante 2 minutos, seguida da irradiação de luz LASER durante 4 minutos;

Após os tratamentos, a superfície do disco foi corada durante 15 minutos com LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), para possibilitar a análise em MCVL.

Grupos Experimentais para o Tratamento dos Canais Radiculares com Contaminação

Intratubular:

[IST]: Sem tratamento (Controle);

[ICL]: Preenchimento do canal radicular com solução de Curcumina e, após 5 minutos, irradiação de luz LED na embocadura do conduto, durante 5 minutos;

[ICGL]: Preenchimento do canal radicular com solução de Curcumina e, após 5 minutos, preenchimento do canal com Gel Carbopol, seguido da irradiação de luz LED na embocadura do conduto, durante 5 minutos;

[IAL]: Preenchimento do canal radicular com solução de Azul de Metileno e, após 2 minutos, irradiação de luz LASER no interior do conduto, com auxílio de fibra óptica, durante 4 minutos;

Após os tratamentos, os espécimes foram seccionados longitudinalmente em máquina de corte de precisão (Isomet 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, USA), e a superfície exposta, corada com LIVE/DEAD® durante 15 minutos. Cada espécime teve sua superfície escaneada em 4 diferentes áreas ao longo do conduto radicular: Cervical superficial, cervical profunda, médio superficial e médio profunda, considerando as paredes proximais (Figura 2).

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste D'Agostino & Pearson para verificar se os mesmos apresentavam distribuição normal. Os que apresentaram distribuição normal foram analisados pelo Teste ANOVA 1 critério, seguido do Teste Tukey ($p < 0,05$), e quando não normal, pelo Teste de Kruskal Wallis, seguido de Dunn ($p < 0,05$).

Resultados

Análise da propagação da Luz LED no interior do Canal Radicular

O grupo [G] apresentou distribuição e manutenção da intensidade da luz ao longo do conduto, de modo semelhante e sem diferença estatística, com o grupo [SG]. Houve diferença estatística na comparação entre os terços onde, ambos os grupos, demonstraram nítido decaimento da luz LED do terço cervical para o apical. (Tabela 1).

Análise da porcentagem de bactérias viáveis e quantidade de biovolume após os tratamentos realizados sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*

Todos os grupos experimentais testados apresentaram redução significativa da quantidade de bactérias viáveis, em relação ao controle, sendo esta redução significativamente maior nos grupos BAL e BCL, sem diferença estatística entre os mesmos (Figura 3, Tabela 2 e Tabela 3).

Análise da porcentagem de bactérias viáveis no interior dos túbulos dentinários após execução dos tratamentos avaliados

Em relação à porcentagem de bactérias viáveis, todos os grupos apresentaram redução significativa em comparação ao grupo controle. O grupo IAL apresentou a maior redução microbiana com diferença estatística entre os demais, seguido dos grupos ICL e ICGL, sem diferença estatística entre eles. Quanto à comparação intragrupos, relacionada às diferentes áreas avaliadas ao longo do conduto, houve diferença somente dentro do grupo controle, onde a área superficial do terço cervical apresentou um número menor de bactérias viáveis (Figura 4 e Tabela 4).

Análise da propagação da Luz LED no interior do Canal Radicular

Ao comparar os grupos, sem e com gel Carbopol 2%, na propagação da luz LED ao longo do canal radicular, os dados obtidos por meio do software OriginLab demonstraram que não houve diferença significativa entre eles (Figura 4 e Tabela 4).

Discussão

A hipótese nula deste trabalho foi aceita somente na ação em biofilme, sendo rejeitada para ação intratubular.

A ação antimicrobiana foi avaliada sobre o *Enterococcus faecalis*, bactéria frequentemente relacionada a diversos casos de insucesso endodôntico. Por sua vez, para se aproximar das condições clínicas endodônticas, este trabalho utilizou a linhagem ATCC 4083,

proveniente do canal radicular, ao invés da ATCC 29212, linhagem que provém do trato urinário e, usualmente, utilizada em trabalhos. Porém, ainda são poucos os trabalhos que a utilizam, fazendo com que não seja possível, ainda, realizar uma comparação dos efeitos da Terapia Fotodinâmica em ambas as linhagens.

Em relação à fonte de luz utilizada na TFD, é crescente o número de trabalhos em que empregam-se o LED^{16,22}, como por exemplo o FotoSan²⁵. Entretanto, estes equipamentos são de usos específicos e que somam um gasto adicional a ser realizado pelo profissional. Neste trabalho, foi utilizado o LED azul (450-470nm) do aparelho fotopolimerizador Gnatus que, além de ser uma fonte de luz adequada, é um aparelho de presença constante nos consultórios odontológicos, não havendo a necessidade do cirurgião dentista adquirir novos equipamentos de uso específico.

Junto a ele, o corante Curcumina a 20 μ M foi utilizado como agente fotossensibilizador. Esta substância, derivada da *Curcuma longa*, ou açafrão, exhibe, em uso isolado, nenhum ou muito pouco efeito antimicrobiano, como já demonstrado em alguns trabalhos^{22,26}. Contudo, é de fácil obtenção e apresenta baixo custo. Na TFD, ela pode ser utilizada em combinação com a luz azul, já que apresenta faixa de absorção entre 300-500nm, sendo seu pico máximo em 430nm.

Trabalhos anteriores que também utilizaram o fotopolimerizador como fonte de luz em combinação com corantes como: curcumina¹⁹, rosa de bengala¹⁸ e eritrosina¹⁷, demonstraram reduções microbianas significativas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por este trabalho sobre o biofilme, onde o uso combinado do fotopolimerizador com curcumina demonstrou alta capacidade em reduzir o número de bactérias viáveis, equivalente ao obtido com a combinação usual LASER e azul de metileno. Ao avaliar a ação isolada do LED e da Curcumina, ambos apresentaram pequena redução no número de bactérias vivas, porém, significativamente menor de quando associados, comprovando o seu sinergismo.

No entanto, quando esta combinação foi empregada em segmentos de dentina, os resultados antibacterianos foram inferiores àqueles obtidos com o LASER e azul de metileno. Isso, provavelmente ocorreu pelo fato da luz LED não ser coerente e sofrer divergência ao se afastar de sua fonte, perdendo potência ao longo do trajeto. Trabalho semelhante acoplou uma fibra óptica ao LED azul, porém, mesmo com este auxílio, a redução bacteriana desejada não foi obtida²⁷. Provavelmente, em virtude da própria característica da luz LED, que continua a perder potência ao longo da fibra.

A TFD realizada com o canal radicular completamente preenchido com Gel Carbopol não apresentou diferença significativa com aquela realizada em sua ausência, demonstrando a ineficácia do gel em transmitir e manter a energia de potência da luz LED ao longo do canal. Tais observações são contrárias aos resultados obtidos em TFD realizada em células tumorais²³, onde o gel, posicionado entre a fonte de luz e o tecido afetado, foi capaz de elevar sua eficácia por aumentar a propagação da luz, mantendo sua intensidade e homogeneidade ao longo do trajeto. Possivelmente, esta divergência deve-se à adição de partículas espalhadoras de luz, como as emulsões lipídicas, que permitem o redirecionamento da luz refletida da interface gel / tecido, impedindo que esta seja perdida para o meio e contribui para que não haja o decaimento de sua intensidade. Além disso, o fato do gel apresentar alta viscosidade, dificulta seu íntimo contato com a parede dentinária, bem como sua penetração nos túbulos, diminuindo a ação intratubular da TFD.

Conclusão

Por meio deste trabalho, foi possível concluir que nenhum dos métodos favoreceram a completa inviabilização dos microrganismos em biofilme e no interior dos túbulos dentinários. Em biofilme, a combinação do aparelho fotopolimerizador a LED com a curcumina obteve ação antimicrobiana similar à ação obtida pelo LASER de Diodo e azul de metileno. Contudo, ao longo do conduto, o Gel Carbopol não foi capaz de manter a intensidade de luz LED. Assim,

ainda são necessárias novas pesquisas para encontrar meios auxiliares que possibilitem o emprego desta combinação nos canais radiculares.

Referências

- 1 Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997 Sep;30(5):297-306. Erratum in: *Int Endod J* 1998 Mar;31(2):148.
- 2 Ricucci D, Siqueira JF Jr. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod*. 2008 Oct;34(10):1249-54.
- 3 Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984 Nov;58(5):589-99.
- 4 Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb;99(2):231-52.
- 5 Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1291-1301.
- 6 Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003 Jan;36(1):1-11
- 7 Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jan;85(1):86-93.
- 8 Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004 May;30(5):315-20.

- 9 Martin H. Ultrasonic disinfection of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976 Jul;42(1):92-9.
- 10 White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997 Apr;23(4):229-31.
- 11 Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006 Oct;32(10):979-84.
- 12 Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod.* 2008 Jun;34(6):728-34.
- 13 Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007 Jan;39(1):59-66.
- 14 Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ (2006) Micro- biological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J* 25, 337-341.
- 15 Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):173-86.
- 16 Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy'using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod.* 2011 Jun;37(6):856-9.
- 17 Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame M Jr, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol.* 2011 Nov;56(11):1299-305.

-
- 18 Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Sasaki Y, Hiratsuka K, Abiko Y, Izumi Y. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2013 Dec;48(6):696-705.
- 19 Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 Sep 10(3):313-9.
- 20 Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 2005 Mar;50(3):353-9.
- 21 Lee YH, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit. *Int J Oral Sci*. 2012 Dec;4(4):196-201. doi: 10.1038/ijos.2012.63.
- 22 Pileggi G, Wataha JC, Girard M, Grad I, Schrenzel J, Lange N, Bouillaguet S. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 May;10(2):134-40.
- 23 da Silva DF. Alternativas para otimização da ação fotodinâmica no tratamento de câncer superficial (Tese). São Carlos - São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014
- 24 Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA, Mídina RZ, Moraes IG. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci*. 2015 Dec;23(6):591-8.
- 25 Schlafer S, Vaeth M, Hørsted-Bindslev P, Frandsen EV. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Apr;109(4):634-41.3

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

27 da Frota MF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Bagnato VS, Espir CG, Berbert FL. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. *Lasers Med Sci.* 2015 Sep;30(7):1867-72.

Tabelas

Tabela 1 – Média e Desvio Padrão para a porcentagem de bactérias viáveis após os diferentes tratamentos sobre o biofilme

Controle	LED	Curcumina	Azul de Metileno + LASER	Curcumina + LED
90.65 ± 5.72 ^A	70.91 ± 15.21 ^B	56.59 ± 19.64 ^C	28.38 ± 13.80 ^D	23.31 ± 13.33 ^D

ANOVA a 1 critério seguido de Tukey (P < 0.05). Diferentes letras maiúsculas representam diferença estatística entre os grupos.

Tabela 2 – Média e Desvio Padrão para a quantidade de biovolume (μm^3) após os diferentes tratamentos do biofilme

Controle	LED	Curcumina	Azul de Metileno + LASER	Curcumina + LED
144024 ± 82933 ^{ABC}	116744 ± 100792 ^C	205312 ± 110568 ^{AB}	218243 ± 110986 ^{AB}	152078 ± 92977 ^{ABC}

ANOVA a 1 critério seguido de Tukey (P < 0.05). Diferentes letras maiúsculas representam diferença estatística entre os grupos.

Tabela 3 – Média e Desvio Padrão para a porcentagem de bactérias viáveis de *Enterococcus faecalis* presentes nos túbulos após os tratamentos ANOVA a 1 critério seguido de Tukey e Teste T Não Paramétrico (P < 0.05). Diferentes letras maiúsculas representam diferença estatística entre os grupos e diferentes letras minúsculas representam diferença estatística intragrupos.

	Controle	Azul de Metileno + LASER	Curcumina + LED	Curcumina + Gel + LED
Cervical Superficial	79.78 ± 7.71 ^{Ab}	7.60 ± 7.45 ^{Ba}	28.84 ± 19.27 ^{Ca}	35.76 ± 6.77 ^{Ca}
Cervical Profundo	90.17 ± 11.09 ^{Aa}	8.22 ± 7.69 ^{Ba}	36.19 ± 21.86 ^{Ca}	38.39 ± 9.16 ^{Ca}
Médio Superficial	81.20 ± 9.87 ^{Aab}	6.11 ± 5.08 ^{Ba}	28.82 ± 18.05 ^{Ca}	31.62 ± 8.97 ^{Ca}
Médio Profundo	88.53 ± 6.74 ^{Aab}	9.88 ± 8.58 ^{Ba}	35.06 ± 21.27 ^{Ca}	41.97 ± 13.21 ^{Ca}

Tabela 4 – Mediana (Mínimo -Máximo) para os valores da intensidade de luz em u.a. no interior do conduto radicular, na ausência e presença do Gel Carbopol

Terços	Sem Gel	Com Gel
Cervical	27500 (15000-40000) ^{Aa}	31250 (20000-45000) ^{Aa}
Médio	5000 (2500-8000) ^{Ab}	3750 (2500-7500) ^{Ab}
Apical	125 (0.0-3000) ^{Ab}	0 (0.0-5000) ^{Ab}

Teste Kruskal-Wallis seguido de Duun ($P < 0.05$). Diferentes letras maiúsculas representam diferença estatística entre os grupos e letras minúsculas representam diferença estatística intragrupos.

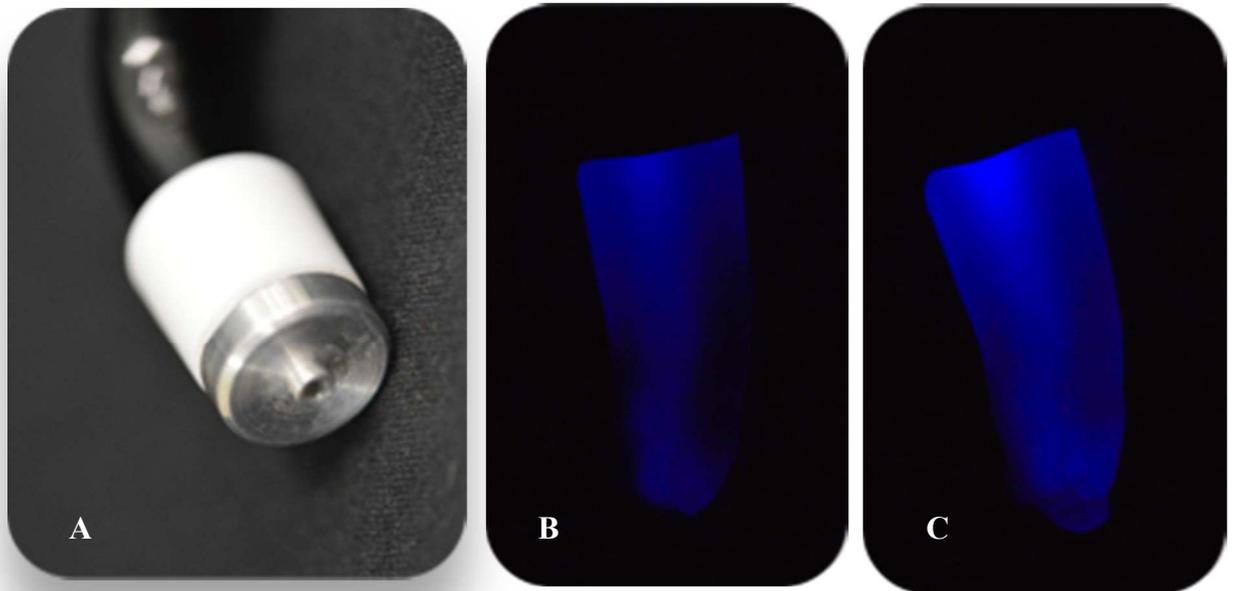
Figuras

Figura 01 - A: Imagem do colimador de alumínio utilizado para irradiar o conduto radicular; B: Conduto radicular irradiado com a luz LED do aparelho fotopolimerizador sem o Gel Carbopol em seu interior; C: Conduto radicular irradiado com a luz LED do aparelho fotopolimerizador com o Gel Carbopol em seu interior

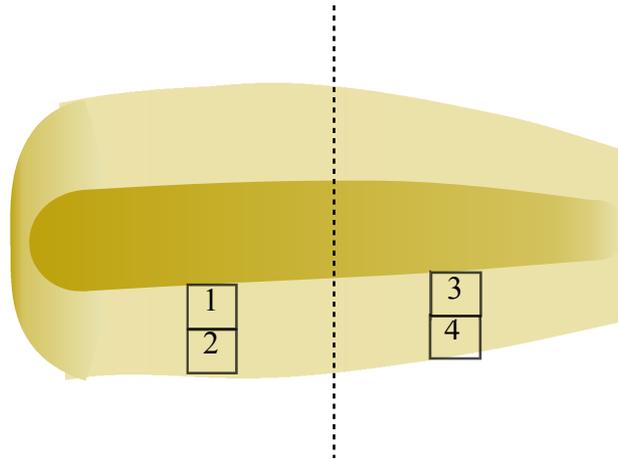


Figura 02: Imagem representativa dos locais analisados no Microscópio Confocal de varredura a LASER: 1 Cervical Superficial, 2 Cervical Profunda, 3 Médio Superficial e 4 Médio Profundo

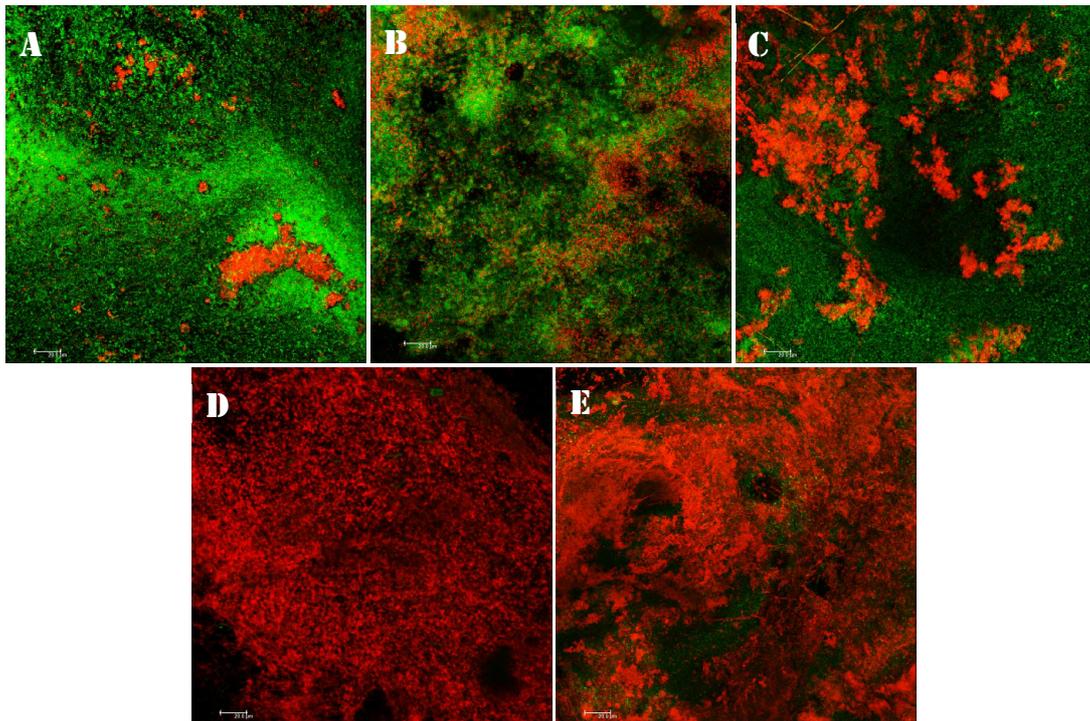


Figura 03 - Imagem do biofilme de *Enterococcus faecalis* após tratamento dos seguintes grupos: A (Controle), B (Apenas curcumina), C (Apenas LED azul), D (Curcumina + LED azul) e E (Azul de Metileno + LASER de Diodo).

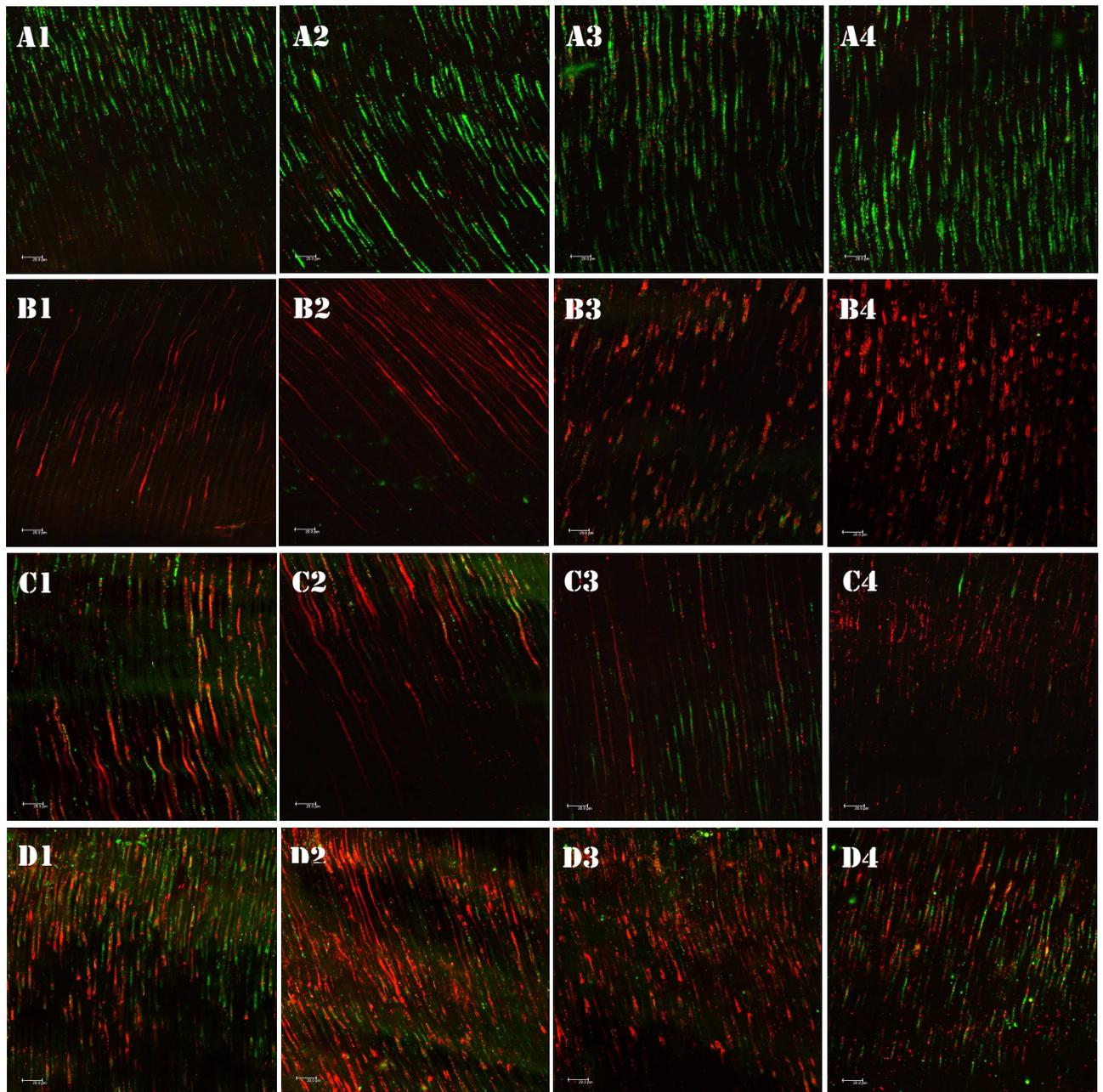


Figura 04 - Imagem da viabilidade de bactérias no interior dos túbulos dentinários após tratamento dos seguintes grupos, nas diferentes regiões do conduto: Controle: A1 Cervical Superficial, A2 Cervical Profunda, A3 Apical Superficial, A4 Apical Profunda; Azul de Metileno + LASER: B1 Cervical Superficial, B2 Cervical Profunda, B3 Apical Superficial, B4 Apical Profunda; Curcumina + LED: C1 Cervical Superficial, C2 Cervical Profunda, C3 Apical Superficial, C4 Apical Profunda; Curcumina + Gel + LED: D1 Cervical Superficial, D2 Cervical Profunda, D3 Apical Superficial, D4 Apical Profunda;

3. Discussão

3 DISCUSSÃO

A hipótese nula deste trabalho foi aceita somente na ação em biofilme, sendo rejeitada na ação intratubular.

É crescente o número de trabalhos que avaliam os efeitos da aplicação da Terapia Fotodinâmica na área de Endodontia (GARCEZ et al, 2007; FIMPLE et al, 2008; RIO et al, 2011), que, por ser um método seguro, rápido e eficaz na redução microbiana, não necessita de longos períodos de espera como algumas medicações intracanaais. O LASER de Diodo é a principal e mais utilizada fonte de luz para a sua realização, apresentando alta redução microbiana em diversos trabalhos já realizados (SOUKOS et al, 2006). No entanto, diversas outras fontes foram e continuam sendo estudadas, como os LASERs Nd:YAG, Er:YAG, Luz Halógena (BRANCALEON, MOSELEY, 2002) e os Diodos Emissores de Luz (LED), vermelho (RIOS et al, 2011) e azul (CHUI et al, 2013), sendo esta considerada uma fonte promissora, pois, além de apresentar resultados antimicrobianos favoráveis, apresenta um custo relativamente baixo. Outra característica do LED, que atribui vantagem na sua utilização é o fato deste possuir uma banda espectral, relativamente estreita, em vez de um comprimento de onda específico, como o LASER. Isso favorece a ação de complementariedade com os agentes fotossensibilizadores utilizados, ou seja, amplia a variedade de substância que podem ser utilizadas (SIMPLICIO, MAIONCHI, HIOKA 2002).

O oxigênio singleto, principal responsável pela ação antimicrobiana, age de modo efetivo na eliminação de cepas de *Enterococcus faecalis*. Basicamente, o agente fotossensibilizador se adere à parede celular da bactéria, durante o tempo de pré-irradiação, e, ao ser irradiado pela luz, reage liberando radicais livres, íons hidroxila e oxigênio singleto, que destroem a parede celular bacteriana (SOUKOS et al, 2006; SOUZA et al, 2010).

A ação antimicrobiana foi avaliada sobre o *Enterococcus faecalis*, bactéria relacionada à diversos casos de insucesso endodôntico. Por sua vez, este trabalho utilizou a linhagem ATCC 4083, proveniente da cavidade bucal, e não sobre a ATCC29212, bactéria que provem do trato urinário e usualmente utilizada em trabalhos, buscando atribuir maior aos resultados maior proximidade às condições clínicas. Porém, ainda são poucos os trabalhos que a utilizam, não sendo possível, ainda, realizar uma comparação dos efeitos da Terapia Fotodinâmica em ambas as bactérias.

Em relação à fonte de luz utilizada na TFD, é crescente o número de trabalhos que empregam o LED (RIOS et al, 2011; PILEGGI et al, 2013), como o FotoSan (SCHLAFER et al, 2010). Entretanto, geralmente estes são equipamentos específicos, somando mais um gasto a ser realizado pelo profissional. Neste trabalho foi utilizado o LED azul (450-470nm) do aparelho fotopolimerizador Gnatus que, além de ser uma fonte de luz adequada, é um aparelho de presença constante nos consultórios odontológicos, não havendo a necessidade do cirurgião dentista adquirir novos equipamentos de uso específico.

Junto a ele, o corante Curcumina, na concentração de 20 μ M e diluído em 10% de DMSO, foi utilizado como agente fotossensibilizador. Esta substância, derivada da curcuma longa, ou açafrão, exhibe, em uso isolado, um pequeno ou nenhum efeito antimicrobiano, como demonstrado em alguns trabalhos (PILEGGI et al, 2013; PASCHOAL et al, 2013, ARAÚJO et al, 2014). Contudo, é de fácil obtenção e apresenta baixo custo. Na TFD, ela é utilizada em combinação com luz dentro da faixa do azul visível, já que apresenta faixa de absorção entre 300-500nm, sendo seu pico máximo em 430nm.

Trabalhos anteriores que também utilizaram o fotopolimerizador como fonte de luz em combinação com corantes como: curcumina, rosa de bengala e eritrosina, demonstraram reduções microbianas significativas. Estes estão de acordo com os aqui obtidos sobre o biofilme de 21 dias, onde o uso combinado do fotopolimerizador com curcumina demonstrou

alta capacidade em reduzir o número de bactérias viáveis, resultado semelhante ao obtido com a combinação usual LASER e azul de metileno. Assim, pode-se afirmar que este equipamento é viável como fonte de luz na TFD.

Ao avaliar a ação isolada da Luz e da Curcumina, ambos apresentaram ligeira redução no número de bactérias vivas. Isto, talvez, esteja relacionado ao aquecimento provocado pela luz LED, devido à sua proximidade, e ao fato da curcumina, que se liga à parede celular, poder ter reagido com a luz ambiente em curtos períodos durante o tratamento. Porém, ambas situações foram significativamente menor do que quando associados, comprovando o seu sinergismo.

No entanto, quando tais procedimentos foram realizados nos canais radiculares de dentina (15mm), a associação luz LED azul / curcumina apresentou resultados antibacterianos inferiores aos obtidos com o LASER e azul de metileno. Inclusive, este foi o tratamento que apresentou maior eficácia em reduzir o número de bactérias viáveis. Isso, provavelmente ocorreu pelo fato da luz LED não ser coerente e sofrer divergência ao se afastar de sua fonte, perdendo energia de potência ao longo do canal radicular. Em trabalho semelhante a este, porém, utilizando uma fibra óptica acoplada ao LED azul, foi observado que a redução bacteriana, também não foi significativa (DA FROTA et al, 2015), provavelmente, em virtude da própria característica da luz LED que continua a perder potência ao longo do trajeto da fibra.

Na tentativa de encontrar outros meios de guiar a luz LED ao longo do conduto sem que haja a perda de energia de potência significativa, os 15mm do canal foram completamente preenchidos com Gel Carbopol. Contudo, o efeito antimicrobiano obtido neste grupo foi semelhante ao grupo que não o utilizou. Além disso, no teste realizado para avaliar a manutenção da intensidade da luz LED ao longo do conduto, não houve diferença significativa nas imagens realizadas na presença e ausência do Gel Carbopol. Isto demonstra a ineficácia do gel em transmitir e manter a energia de potência da luz LED ao longo do canal radicular.

Tais observações são contrárias aos resultados obtidos em TFD realizada em células tumorais, onde o gel, posicionado entre a fonte de luz, LED vermelho, e o tecido afetado, foi capaz de aumentar a propagação da luz, mantendo sua intensidade e homogeneidade ao longo da superfície irregular (DA SILVA, 2014). Talvez esta divergência nos resultados esteja relacionada à adição de partículas espalhadoras de luz, como as emulsões lipídicas, que permitem o redirecionamento da luz refletida da interface gel / tecido, impedindo que ela seja perdida para o meio e contribuindo para que não haja o decaimento de sua intensidade. Além disso, o fato do gel apresentar alta viscosidade, pode ter dificultado seu íntimo contato com a parede dentinária, bem como sua penetração nos túbulos dentinários, diminuindo a ação intratubular da TFD.

Assim, foi possível concluir que nenhum dos métodos favoreceram a completa inviabilização dos microrganismos em biofilme e no interior dos túbulos dentinários. A combinação do aparelho fotopolimerizador a LED com a curcumina obteve ação antimicrobiana similar à ação obtida pelo LASER de Diodo e azul de metileno. Contudo, o Gel Carbopol não foi capaz de manter a intensidade de luz LED ao longo do conduto radicular. Assim, ainda são necessárias novas pesquisas para encontrar meios auxiliares que possibilitem o emprego desta combinação nos canais radiculares.

Referências

REFERÊNCIAS

Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA, Midena RZ, Moraes IG. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci.* 2015 Dec;23(6):591-8.

Al-Badah AS, Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, Ibrahim SSS. Clonal diversity and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from endodontic infections. *Electronic Journal of Biotechnology.* 2015 May; 18(3): 175-80.

Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Andeson AC, Spitzmüller B, Hellwig E. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *J Endod.* 2014 Feb;40(2):223-30.

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

Arneiro RA, Nakano RD, Antunes LA, Ferreira GB, Fontes K, Antunes LS. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Oral Sci.* 2014 Dec;56(4):277-85.

Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ (2006) Micro-biological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J* 25, 337-341.

Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):173-86.

Bystroëm A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scandinavian Journal of Dental Research.* 1981; 89, 321-8.

Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Sasaki Y, Hiratsuka K, Abiko Y, Izumi Y. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2013 Dec;48(6):696-705.

Costa AC, de Campos Rasteiro VM, Pereira CA, da Silva Hashimoto ES, Beltrame M Jr, Junqueira JC, Jorge AO. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol.* 2011 Nov;56(11):1299-305.

da Silva DF. Alternativas para otimização da ação fotodinâmica no tratamento de câncer superficial (Tese). São Carlos - São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2002 Mar;35(3):221-8.

Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008 Jun;34(6):728-34.

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2007;39:782-7.

da Frota MF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Bagnato VS, Espir CG, Berbert FL. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. *Lasers Med Sci*. 2015 Sep;30(7):1867-72.

Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H, Ribeiro MS. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? *Lasers Med Sci*. 2013 Jan;28(1):79-85.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007 Jan; 39(1):59-66.

George S, Kishen A. Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:599-602.

Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *Journal of the British Endodontic Society*. 1975; 8: 74-92.

Lee YH, Park HW, Lee JH, Seo HW, Lee SY. The photodynamic therapy on *Streptococcus mutans* biofilms using erythrosine and dental halogen curing unit. *Int J Oral Sci*. 2012 Dec;4(4):196-201. doi: 10.1038/ijos.2012.63.

Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 283-288. Ó Blackwell Munksgaard, 2006.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Feb; 99(2):231-52.

Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DM, Bagnato VS, Giusti JS, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 Sep 10(3):313-9.

Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G Jr, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 2005 Mar;50(3):353-9.

Pileggi G, Wataha JC, Girard M, Grad I, Schrenzel J, Lange N, Bouillaguet S. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013 May;10(2):134-40.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003 Jan;36(1):1-11

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod.* 2008 Oct;34(10):1249-54.

Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod.* 2011 Jun;37(6):856-9.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004 May;30(5):315-20.

Schlafer S, Vaeth M, Hørsted-Bindslev P, Frandsen EV. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source: an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Apr;109(4):634-41.3

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1291-1301.

Simplicio, F.I.; Maionchi, F.; Hioka, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Quim Nova.* 25(5): 801-7, 2002.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997 Sep;30(5):297-306. Erratum in: *Int Endod J* 1998 Mar;31(2):148.

Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*. 2006 Oct;32(10):979-84.

Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36:292–6.

Stefan K, Andre G, Volpel Andrea, et al. Photodynamic suppression of *Enterococcus faecalis* using the photosensitizer mTHPC. *Lasers Surg Med* 2011;43:241–8.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jan;85(1): 86-93.

Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984 Nov;58(5):589-99.4

Weckwerth PH, Zapata RO, Vivan RR, Tanomaru Filho M, Maliza AG, Duarte MA. In vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J*. 2013 Sep-Oct;24(5):474-6.