Centro Universitário de Patos – UNIFIP
Patos, Paraíba
The Open Brazilian Dentistry Journal
2021; 1(1): 01-12.
ISSN 2675-2557
http://dentistryjournal.unifip.edu.br/

REDUÇÃO MICROBIANA COM DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES NA TERAPIA FOTODINÂMICA: ESTUDO IN VITRO

MICROBIAL REDUCTION WITH DIFERENT PHOTOSENSITIZER IN PHOTODYNAMIC THERAPY: IN VITRO STUDY

Kaline Pereira da Silva
Centro Universitário de Patos – UNIFIP – Patos – PB – Brasil
kalinesilva6@gmail.com

Ertânia Araujo Bezerra
Centro Universitário de Patos – UNIFIP – Patos – PB – Brasil
ertaniaaraujo@gmail.com

Cícero Romão Gadê Neto
Pós Graduação Centro Universitário de Patos – UNIFIP – Patos – PB – Brasil
gadeneto@yahoo.com

Maria Cleide Azevedo Braz
Centro Universitário de Patos – UNIFIP – Patos – PB – Brasil
cleidebraz2011@gmail.com

RESUMO
Objetivo: O presente estudo teve como objetivo avaliar a redução microbiana após a terapia fotodinâmica como coadjuvante ao preparo químico-cirúrgico, utilizando como fotossensibilizador o Azul de Metileno, Azul de Toluidina, Tanino hidrolisável e a Curcumina em canais radiculares de dentes humanos, incisivos inferiores, contaminados com *Enterococcus faecalis.*
Métodos: Foram utilizados 60 dentes, divididos em seis grupos, 10 espécimes em cada grupo. O cálculo da amostra foi baseado no desfecho principal do estudo adotando os seguintes parâmetros: nível de significância de 5% (α = 0,05), intervalo de confiança de 95%, poder estatístico de 80% (β = 0,20), razão de alocação das amostras nos grupos estudados de 1:1 e tamanho de efeito esperado variando de moderado a grande após a análise dos dados do estudo piloto, indicando a necessidade de incluir 20 amostras em cada grupo.
Resultados: Na avaliação intragrupo, constatou-se que o número de UFC apresentou tendência de declínio significativa para G1 (p = 0,006), G3 (p = 0,025), G5 (p = 0,008) e G6 (p < 0,001). Ao comparar os valores iniciais e finais, as reduções percentuais em relação à média de UFC para o G1, G3 e G5 e G6 foram, respectivamente, de 85,32%, 65,99%, 67,23% e 97,49%.
Conclusão: Ao comparar os valores iniciais e finais, as reduções percentuais em relação à média de UFC de Enterococcus Faecalis foi: para o G1 com hipoclorito de sódio a 2,5%, para o Azul de Metileno e Azul de Toluidina , para a Curcumina e para o Tanino, foram, respectivamente, de 85,32%, 65,99%, 67,23% e 97,49%.
Palavras-chaves: Terapia Fotodinâmica; Endodontia; Tanino; Curcumina.

ABSTRACT

The present study had as objective to evaluate the microbial reduction after photodynamic therapy as supportive care to chemical-surgical prepare, using as photosensitizer the methylene blue, toluidine blue, hydrolysable Tannin and Curcumin in radicular channels of human teeth, lower incisor teeth, contaminated with *Enterococcus faecalis*. It was used 60 teeth, divided at six groups, 20 specimens at each group. The calculation shows of the sample was based on the main outcome of the study, adopting the following parameters: significance level of 5% (α = 0,05), confidence interval of 95%, statistic strength of 80% (β = 0,20), allocation ratio of the samples in the studied groups of 1:1 and size of the expected effect varying of moderate to great after the analysis of the data of pilot study, showing the need of inclusion of 20 samples in each group. At the intragroup evaluation, was verified that the number of CFU presented trend of decay to G1 (p = 0,006), G3 (p = 0,025), G5 (p = 0,008) and G6 (p < 0,001). Comparing the initial and final values, the percentual reductions related to the mean of CFU to G1, G3, G5 and G6 was, respectively, 85,32%, 65,99%, 67,23% and 97,49%. Comparing the initial and final values, the percentual reductions related to the mean of CFU of *Enterococcus faecalis* was: to G1 with sodium hypochlorite at 2,5%, to methylene blue and toluidine blue, to curcumin and tannin, respectively, 85,32%, 65,99%, 67,23% and 97,49%.
Keywords: Photodynamic Therapy. Endodontics. Tannin. Curcumin.

1. Introdução

A Endodontia é uma especialidade que envolve desde a etiologia, até as alterações patológicas do endodonto e da região apical e periapical. Os agentes microbiológicos são uns dos principais fatore etiológicos, por isso, o controle destes agentes patológicos possuem relevante influência no sucesso clínico e radiográfico da terapia endodôntica, assim, eliminar os fatores etiológicos, principalmente os existentes no interior do sistema de canais radiculares (SCR), respeitando sua anatomia, e, durante a terapia, seguir um correto protocolo, que envolve, desde a fase inicial do tratamento, como a abertura, até o selamento tridimensional do SCR, se torna um desafio[1,2].

O *Enterococcus faecalis*, é uma bactéria anaeróbia facultativa, normalmente infectam o trato gastrointestinal, corrente sanguínea, endocárdio e canal radicular. Na endodontia tem sido a espécie mais prevalente em dentes com canal tratado, mesmo não sendo encontrado frequentemente em infecções endodônticas primárias, é geralmente isolado em casos de insucesso, sendo o principal patógeno envolvido no fracasso do tratamento endodôntico. Este tipo de bactéria apresenta capacidade de penetração pelos tubos dentinários, tornando as sobreviventes durante o preparo químico-mecânico do conduto radicular. Por este motivo, após a obturação do canal, a bactéria poderá invadir o conduto e infectá-lo novamente. Os microrganismos sobrevivem dentro dos tubos devido à presença de colágeno e permitem sua adesão. Outro fator é a alta virulência, decorrente da persistência bacteriana após inserção de medicamentos intra-radicular utilizado durante procedimento endodôntico[1].

Na busca por técnicas mais capazes de eliminar bactérias do interior do SCR, surge a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT), que consiste em uma opção a qual permite

a descontaminação de um variado número de microrganismos, desde protozoários, fungos, vírus e bactérias, sendo considerada uma técnica que atua como um antimicrobiano de largo espectro, efetivamente contra espécies gram positivas e gram negativas[3].

A aPDT consiste basicamente de três elementos: Fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz coerente ou não coerente e oxigênio do meio ambiente. Ao corar a superfície de um microrganismo com um FS para em seguida ativar esta substância com uma fonte de luz externa, cria-se um verdadeiro circuito elétrico, onde o FS cora, por exemplo, a parede bacteriana com cargas positivas, permitindo uma ligação ao componente aniônico da membrana celular de ditas bactérias[4] .

Ao entregar energia irradiante a uma superfície corada por um FS, sucede uma verdadeira cascata de transferência de elétrons, formação de radicais livres e produção de oxigênio singleto[3].

Ditas reações são as responsáveis pela desnaturação dos componentes protéicos e lipídicos das paredes bacterianas, promovendo o seu rompimento, exposição do conteúdo intracelular e finalmente, provocando morte celular por necrose e/ou apoptose. A aPDT tem sido utilizada com algum sucesso há pouco mais de uma década na Endodontia [2,5].

Evidenciamos a necessidade de pesquisar novas alternativas de fármacos que apresentem menor toxicidade, maior potencial antimicrobiano e baixo custo no tratamento endodôntico, sobretudo contra o *E. Faecalis*. É objetivo deste trabalho, quantificar a redução da carga bacteriana, de canais radiculares, de dentes humanos, contaminados por cepas *de E. faecalis*, aplicando o PDT, como coadjuvante ao preparo químico mecânico, utilizando o Azul de Metileno, Azul de Toluidina, tanino e a Curcumina como fotosensibilizador.

2. Métodos

2.1 Preparação dos espécimes

Tomando como base o protocolo de Dametto, foram selecionados 60 incisivos inferiores, doados pelo Banco de dentes Humanos (BHD) das FIP, após a assinatura do termo de consentimento Livre e Esclarecido do doador (TCLE). Os dentes deveriam apresentar os ápices completamente formados, canal único[6].

Os espécimes foram limpos com raspadores periodontais, cureta Gracey (Millennium – Golgran), para remoção de tecido periodontal ou ósseo aderido à superfície radicular, quando presentes, e, foi realizada profilaxia com taça de borracha (Taça de Borracha CA–Preven), pasta profilática (Pasta Profilática Herjos–Coltene) e pedra-pomes (Lysanda).

As coroas dos dentes foram removidas na junção amelocementária com disco diamantado (Disco Praxis) para facilitar o acesso cervical, de modo que o remanescente radicular permaneça com 12mm de comprimento.

Após o estabelecimento da Odontometria e corte da coroa dos dentes, os espécimes foram vedados, no terço apical, com resina epóxi Araldite (Brascola, São Paulo, SP) de endurecimento rápido, com a finalidade de prevenir o extravasamento da cultura bacteriana após a sua contaminação.

2.2 Microrganismo e meio de cultura

As culturas puras de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) em caldo de BHI foram utilizadas como contaminantes dos espécimes. Colônias isoladas foram suspensas em tubos com tampas rosqueáveis contendo 5ml de BHI. Esta suspensão foi agitada mecanicamente e ajustada em espectrofotômetro com absorbância de 800nm, até obter-se a concentração equivalente a 1,0 da escala McFarland ($3,0 \times 10^8$ bactérias/ml).

Os espécimes foram colocados em frascos contendo Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid; Basinkstoke**,** UK) estéril, e autoclavados a 120^0C, 1 atm, por 20 min. Permaneceram incubados a 37^0C por 24h em estufa de CO2 para confirmação da esterilidade.

2.3 Contaminação dos espécimes com *Enterococcus faecalis*

Os frascos contendo os espécimes estéreis foram abertos em uma câmara de fluxo laminar (VECO-C.G.C-46255972/001-28-Campinas-SP-Indústria Brasileira).

As pipetas estéreis foram utilizadas para remover 5,0 ml de BHI estéril e substituir por 4,0ml da suspensão de *E faecalis* e em seguida, o frasco foi vedado e incubado em estufa a 37^0 e atmosfera de 10% de CO_2 por 7 (SETE) dias, com trocas de 2,0 ml de BHI-Caldo contaminado por 2,0 ml de BHI-Caldo estéril, a cada 2 dias, a fim de se evitar a saturação do meio. O crescimento bacteriano durante o período de incubação foi constatado pela presença de turbidez do meio, conforme protocolo [6,7].

O instrumento para coleta dos dados foi uma planilha digitada do Excell em que foram anotados os dados de Unidade Formadora de Colônia bacteriana (UFC) no estado Inicial, Intermediária (logo após o PQM) e final, após passarem 7 (sete) dias depois de ter sido realizado o PQM de cada grupo experimental.

2.4 Condições experimentais

As amostras foram distribuídas homogeneamente em 6 grupos de acordo com a forma de desinfecção utilizada durante o PQC, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos grupos

	N	SUBSTÂNCIAS
G1(Controle)	20	PQC + Hipoclorito de Sódio 2,5%
G2(Controle)	20	PQC + Soro Fisiológico
G3	20	PQC+ Azul de Metileno + aPDT
G4	20	PQC + Azul de Toluidina + aPDT
G5	20	PQC + Tanino + aPDT
G6	20	PQC+Curcumina+LED

Fonte: Autoria própria (2019).

2.5 Preparo Químico-Mecânico e Terapia Fotodinâmica dos Grupos

Todo o experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, para evitar contaminação cruzada e o material da pesquisa foi previamente esterilizado.

Previamente a realização do PQC, todos os dentes, de cada grupo, foram retirados dos frascos por meio de uma pinça estéril, e dispostos em um Torno Mecânico de mesa (SPERTA, ind, brasileira Ltda), e, uma gaze estéril. O torno mecânico contém uma maçaneta lateral ajustável com a finalidade de evitar o manuseio dos espécimes com a mão, e, com isso, uma possível contaminação do interior dos canais com a superfície radicular externa.

Todos os espécimes foram instrumentados, através da técnica de instrumentação Automatizada, com uma única Lima no terço cervical, médio e oclusal, utilizando, para todos os dentes, a lima Wave one Gold 35.06 (Dentsply), no CRT (12mm) acionada no motor Rotatório (Sylver-Dentsply). A patência foraminal era realizada com limas tipo K file 10 (Dentsply Maillefer; Baillaigues, Switzerland) no CRD (12 mm).

Para irrigação, durante o PQC, foram utilizadas seringas de plástico estéreis, descartáveis, Injex (Ind. Cirúrgica Ltda, São Paulo, Brasil) e agulhas Endo-Eze em aço inoxidável da Ultradent (Utah, EUA), de diâmetro 30 Gauge e de comprimento médio de 24mm, sendo calibradas em 11mm, correspondentes ao CRT.

Para todos os grupos, exceto para o Grupo 2, os canias foram preparados e irrigados com 10ml de NaOCl á 2,5% a cada movimento realizado na lima.

Após o PQC, os canais foram irrigados com 10ml de soro fisiológico e, nos grupos em que foi aplicada a aPDT, foram colocados no interior do canal radicular, 3ml do fotossensibilizador, na concentração de 0,005%, utilizando-se seringa plástica estéril, descartável, Injex (Ind. Cirúrgica Ltda, São Paulo, Brasil) e agulha Endo-Eze em aço inoxidável da Ultradent (Utah, EUA) calibradas em 11 mm, correspondentes ao CRT. Permaneceram no interior do canal radicular por 5min, como tempo de pré- irradiação.

Decorrido este período, foi feita a irradiação na entrada dos canais radiculares. A fonte emissora de luz foi um Laser semicondutor portátil (Laser DUO®, GaAlAs, InGaAlP, λ880nm e λ660nm, MM OPTICS LTDA, São Carlos, SP – Brasil), com potência de saída constante em 100 mW e área do feixe de laser de 3 mm^2. Para o protocolo de irradiação, o equipamento foi ajustado para um comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW, totalizando 1,8 J de energia em área de spot e para o tempo de irradiação 180s. No final foi feita uma irrigação com 10ml de soro fisiológico para a remoção do corante seguindo o protocolo [7].

Apenas no Grupo 6, em que foi utilizada a Curcumina a 0,005%, como corante, a irradiação da aPDT foi realizada com um Fotopolimerizador Gnatus com Luz LED Azul Alimentação: 100, 240,Vac 50/60Hz. Comprimento de onda 420-480 nm. Potência de luz=1200 mW/cm2.

Grupo 1 (Controle 1): NaOCL a 2,5%

No grupo do hipoclorito de sódio a 2,5%, os canais foram irrigados com 10ml do NaOCl a 2,5% a cada avanço e troca da lima. Depois do PQC, os canais foram irrigados com 10ml de soro fisiológico, conforme protocolo definido anteriormente.

Grupo 2 (Controle 2): Soro Fisiológico

Antes, durante e após o PQC os canais foram irrigados com 10ml de soro fisiológico.

Grupo 3: aPDT com Azul de Metileno

Os canais foram irrigados com 10ml de soro fisiológico inicialmente, e, durante o PQC com 10 ml de NaOCl a 2,5%. No final foram utilizados 10ml de soro fisiológico e após o PQC, para realização da aPDT, foi utilizado o fotossensibilizador azul de metileno 0.005% (Empóriopharma, Farmácia de Manipulação, Patos, Paraíba, Brasil). Decorrido os 5 min da Pré-irradiação, foi feita a irradiação na entrada dos canais radiculares por 4 min. Sendo feita uma irrigação final com 10 ml de soro fisiológico para a remoção total do corante.

Grupo 4: aPDT com Azul de Toluidina

Os canais foram irrigados com 10ml de soro fisiológico inicialmente, e, durante o PQC com 10 ml de NaOCl a 2,5%. No final foram utilizados 10ml de soro fisiológico e após o PQC, para realização da aPDT, foi utilizado o fotossensibilizador azul de Toluidina 0.005% (Empóriopharma, Farmácia de Manipulação, Patos, Paraíba, Brasil). Decorrido os 5 min da

Pré-irradiação, foi feita a irradiação na entrada dos canais radiculares por 4 min. Sendo feita uma irrigação final com 10 ml de soro fisiológico para a remoção total do corante.

Grupo 5: aPDT com Tanino

Os canais foram irrigados com 10ml de soro fisiológico inicialmente, e, durante o PQC com 10 ml de NaOCl a 2,5%. No final foram utilizados 10ml de soro fisiológico e após o PQC, para realização da AAAAAPDT, foi utilizado o fotossensibilizador tanino a 0.005% (Empóriopharma, Farmácia de Manipulação, Patos, Paraíba, Brasil). Decorrido os 5 min da Pré-irradiação, foi feita a irradiação na entrada dos canais radiculares por 4 min. Sendo feita uma irrigação final com 10 ml de soro fisiológico para a remoção total do corante.

Grupo 6: aPDT com Curcumina

Os canais foram irrigados com 10ml de soro fisiológico inicialmente, e, durante o PQC com 10 ml de NaOCl a 2,5%. No final foram utilizados 10ml de soro fisiológico e após o PQC, para realização da AAAAAPDT, foi utilizado o fotossensibilizador Curcumina a 0.005% (Empóriopharma, Farmácia de Manipulação, Patos, Paraíba, Brasil). Decorrido os 5 min da Pré-irradiação, foi feita a irradiação na entrada dos canais radiculares por 4 min. Sendo feita uma irrigação final com 10 ml de soro fisiológico para a remoção total do corante.

2.6 Coletas Microbiológicas

Durante o experimento, foram realizadas três coletas microbiológicas, denominadas, de acordo com o momento: Coleta **inicial**, feita antes do PQM, para confirmar a contaminação dos espécimes, **intermediária**, realizada imediatamente após o PQC, para verificar a redução microbiana logo após a realização do PQC e **coleta final**, realizada 7 (SETE) dias após o PQC, para verificar se em algum grupo a atividade antimicrobiana permaneceu, mesmo após o PQC.

- ✓ **Coleta Inicial**

Antes da realização do PQC, os espécimes já dispostos em um Torno Metálico, dentro câmara de fluxo laminar, foram irrigados com 10ml de soror fisiológico e secos, até o CRD com pontas de papel absorvente estéreis (Cell pack- Dentsply-Maillefer) de diâmetro 15, que permaneceram no canal por 1min, com a finalidade das bactérias se aderirem a

ponta de pepel absorvente, e, posteriormente foram depositadas em tubos individuais tipo *eppendorf*.

- ✓ **Coleta Intermediária**

Uma vez realizada a coleta inicial, e após os protocolos serem utilizados em cada grupo durante o PQC, os canais foram novamente secos com pontas de papel absorvente estéril e depositadas em *eppendorfs* individuais, seguindo-se as mesmas orientações realizadas na coleta inicial.

Todos os espécimes submetidos ao tratamento foram preenchidos com BHI, selados com guta-percha em bastão, para evitar que microrganismos presentes na superfície externa dos canais adentrassem o seu interior, e colocados em *eppendorfs* individuais contendo 60 µl de BHI estéril para manutenção da hidratação, de modo que o BHI atingiu, apenas, até o terço médio da raiz para não infiltrar no selamento com guta-percha que foi realizado. Posteriormente, foram novamente incubados a 37^0C em atmosfera de 10% CO_2 por 7 dias.

- ✓ **Coleta Final**

Transcorrido o período de 7dias, os espécimes foram removidos dos *eppendorfs*, debtro da câmara de fluxo laminar, dispostos novamente no Torno Metálico estéril e gaze também estéril. O selamento cervical de guta percha foi removido e os canais radiculares foram novamente irrigados com 10ml de soro fisiológico e secos com pontas de papel absorvente estéreis de diâmetro 35, sendo estas, posteriormente, depositadas em *eppendorfs* individuais contendo 1ml de BHI estéril.

Após a realização de cada coleta, os *eppendorfs* foram agitados por 60 segundos em um VORTEX (Biomixer-QL-901), para desprender as bactérias dos cones de papel absorvente e tornar a solução mais homogênea.

- ✓ **Diluição e plaqueamento das coletas**

Após agitação mecânica, houve diluição das amostras coletadas na proporção de 1/10, 1/100, em BHI estéril. A seguir, 50 µl da diluição 10^{-2} foram plaqueados em triplicata em BHI Agar e incubados a 37^0C em atmosfera de 10% de CO_2. Após o período de 48h, as colônias de microrganismos que estavam presentes nestas placas, uma vez constatada a pureza das colônias, através das características morfológicas típicas do grupo microbiano estudado, foram contadas, determinando-se as unidades formadoras de colônias (UFC). Para a obtenção das unidades formadoras de colônias por ml (UFC), foi necessária a

multiplicação do número de UFC obtidas na contagem das placas em 2000 vezes, pois a solução foi diluída 2 vezes com as bactérias, representando assim, o número de colônias descontando-se as diluições feitas durante o estudo (100 vezes) e o plaqueamento de 50µl (20 vezes menor que 1 ml). A média das 3 (três) placas de cada coleta foi utilizada como valor final da contagem.

Inicialmente, foi realizada a análise estatística descritiva e foram calculadas medidas de tendência central (média, mediana) e de variabilidade (desvio-padrão, intervalo interquartil) para as variáveis quantitativas estudadas. O pressuposto de normalidade dos dados foi avaliado por meio do teste de Shapiro-Wilk. Dessa forma, testes não paramétricos foram aplicados, a saber, o teste de Kruskal-Wallis para a avaliação intergrupo (G1 vs G2 vs G3 G4 vs G5 vs G6 vs) e o teste ANOVA de Friedman para a avaliação intragrupo (CI vs CT vs CF). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$ (HANNIGAN; LYNCH, 2013; LARSON; FARBER, 2016). Todas as análises foram conduzidas usando o *software* IBM SPSS versão 20.0 e considerando um intervalo de confiança de 95%.

Esta pesquisa é do tipo experimental, laboratorial*, "in vitro"*, foi realizada no laboratório de Ciências Básicas das Faculdades Integradas de Patos-FIP/PB no período de setembro de 2017 a março de 2019, sob autorização institucional, conforme, e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa das Faculdades Integradas de Patos-FIP, sob protocolo 2.332.759 em 13/07/2019.

3. Resultados

A Tabela 2 mostra os resultados da análise comparativa do número de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC/mL) observadas em cada grupo de acordo com as etapas de avaliação. Na avaliação intergrupo, foi constatada diferença significativa no número de UFC tanto no momento inicial ($p < 0,001$) e intermediário ($p < 0,001$), como no momento final ($p = 0,001$). Na avaliação intragrupo, constatou-se que o número de UFC apresentou tendência de declínio significativa para G1 ($p = 0,006$), G3 ($p = 0,025$), G5 ($p = 0,008$) e G6 ($p < 0,001$). Ao comparar os valores iniciais e finais, as reduções percentuais em relação à média de UFC para o G1, G3 e G5 e G6 foram, respectivamente, de 85,32%, 65,99%, 67,23% e 97,49%.

Tabela 2. Análise comparativa do número de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC/mL) observadas em cada grupo de acordo com as etapas de avaliação inicial, intermediária e final.

Tempo	Grupo						
	G1	**G2**	**G3**	**G4**	**G5**	**G6**	***p-valor*** *(1)*
Avaliação Inicial (T0)							
Média	87268,47 ^{B,Ca}	1011,67 ^{Da}	356572,43 ^{B,Ca}	116517,99 ^{Ca}	219666,22 ^{Ba}	898524,82 ^{Aa}	**< 0,001***
DP	106556,93	3158,19	378849,03	251106,47	154507,58	409665,39	
Avaliação Intermediária (T1)							
Média	57866,30 ^{B,Ca}	4211,27 ^{Da,b}	42870,05 ^{C,Db}	87469,43 ^{B,Ca}	114962,56 ^{Ba,b}	750363,18 ^{Aa}	**< 0,001***
DP	30678,99	5760,56	80926,36	60386,52	103762,22	388267,23	
Avaliação Final (T2)							
Média	12809,28 ^{Bb}	25253,97 ^{Bb}	121312,73 ^{Ba,b}	134733,00 ^{Aa}	70444,19 ^{A,Bb}	22545,09 ^{Bb}	**0,001***
DP	12403,62	35441,87	262749,22	37075,23	77911,66	19566,07	
p-valor *(2)*	**0,006***	**0,027***	**0,025***	0,497	**0,008***	**< 0,001***	
% de inibição (inicial-final)	**85,32%**	**-**	**65,99%**	**-**	**67,23%**	**97,49%**	

Fonte: Autoria própria (2019).

Nota. DP = desvio-padrão; Letras diferentes denotam resultados significativamente diferentes ($p<0,05$); (1) Letras maiúsculas comparam valores na horizontal (avaliação intergrupo); (2) Letras minúsculas comparam valores na vertical (avaliação intragrupo).

4. Discussão

O presente estudou foi realizado com dentes humanos, incisivos inferiores contaminados por Enterococcus faecalis, essas espécies bacterianas foram escolhidas pelo maior índice de fracassos endodônticos, o que pode ser explicado por sua capacidade de sobrevivência em condições de escassez nutricional e em ausência de oxigênio bem como por sua capacidade de penetração nos túbulos dentinários e de resistência a procedimentos e medicamentos intracanais [8].

Nesta pesquisa utilizou-se como grupo Controle 1 o que administrou-se só o hipoclorito de sódio como solução irrigadora sem a Terapia Fotodinâmica e observou-se

que apresentou um declínio de (p = 0,006) o que foi considerado bom em razão de neste grupo não ter sido realizado a Terapia Fotodinâmica, em um estudo foi realizado a comparação do uso isolado do Hipoclorito de sódio e associado ao PDT, igual a este estudo, e mostrou que o uso combinado de um agente fotossensibilizante e um laser de baixa potência direcionado à cavidade de acesso teve efeito bactericida para S. intermedius em canais radiculares, mas não eliminou totalmente as bactérias, ao contrário de NaOCl a 3%. O hipoclorito de sódio a 1% mostrou-se eficaz na eliminação dos microorganismos o que corrobora com os resultados desta pesquisa, apesar de que neste estudo não comparamos diferentes concentração de NaOCl e sim só utilizamos a 2,5% o que já é padronizado pela literatura, apesar de que algumas escolas ainda são adeptas a diferentes concentrações do NaOCl para a terapia Endodôntica de acordo com o estado da alteração Pulpar, a TFD apenas reduziu o número de bactérias e o laser e o corante não exerceram nenhuma atividade inibidora do crescimento bacteriano isoladamente, neste estudo não testamos o corante e nem o laser usado isoladamente[9].

Porém, quanto a concentração do NaOCl, discordam dos achados desta pesquisa que testaram a capacidade antibacteriana do NaOCl nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%, bem como da clorexidina gel e líquida com 0,2%, 1% e 2% de concentração em poços com suspensões de células de E. faecalis em cloreto de sódio (NaCl) em diferentes tempos. Observaram que todos os irrigantes foram eficazes contra a bactéria estudada, sendo os mais ativos a clorexidina líquida em todas as concentrações e o NaOCl a 5,25%. Observou-se também que o tempo necessário para a eliminação do microrganismo depende da concentração do irrigante utilizado.[7]

Em um experimento preliminar realizado em tubos de ensaio com o objetivo de comparar a eficácia do NaOCl a 0,5% e do laser diodo na potência de 50 mW e da pasta de azuleno na eliminação de E. faecalis, utilizados separadamente ou de modo combinado, concluíram que nem o laser, nem a pasta sozinha apresentaram efeitos bactericidas. Enquanto o NaOCl a 0,5% reduziu em 97,06% o número de células viáveis, a combinação da pasta de azuleno e laser reduziu em 99,89%, sendo observada, portanto uma diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos. Posteriormente, realizaram o PQC em trinta dentes humanos unirradiculares, contaminando-os com E. faecalis por vinte e quatro horas e os dividindo em três grupos: NaOCl a 0,5%; PDT com laser diodo e pasta de azuleno; controle. As coletas foram realizadas antes e após os procedimentos específicos de cada grupo. Observaram os autores, uma redução de 93,25% no grupo do NaOCl, de 99,2% no da PDT e um aumento da carga bacteriana no grupo controle. Concluíram que a PDT foi eficaz na redução da população de E. faecalis em canais radiculares, podendo ser usada como coadjuvante do tratamento endodôntico. Nesta pesquisa usamos o Azul de Metileno a 0,005% que associado a PDT mostrou uma redução de p=0,025*, isso mostra uma relevância do Azul de Metileno como corante, já que é o

mais conhecido e popularmente utilizado, porém em comparação a Curcumina e ao Tanino que foi p= G5 ($p = 0,008$) e G6 ($p < 0,001$)[10].

Em um estudo investigaram in vitro a resposta de infecção polimicrobiana em canais uniradiculados de humanos, submetidos à PDT, após sensibilização com azul de metileno e exposição à luz. Os espécimes foram contaminados com Actinomyces israelli, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis e Prevotella intermedia. Os canais radiculares foram expostos ao azul de metileno (25 μg/mL) por 10 minutos e em seguida foram irradiados por meio de fibra ótica com laser emitindo no vermelho com comprimento de onda de 665 nm. Foram feitas duas irradiações de 2.5 minutos com energia de fluência de 15 J/cm², com intervalo de 2.5 minutos, totalizando 30 J/cm². Os resultados obtidos com a PDT alcançaram uma redução microbiana de 80% nas unidades formadoras de colônias. Para este estudo, apesar de ter sido testado outro microorganismo, porém usou-se o Azul de Metileno como corante, observou-se que a redução bacteriana foi de 85,32% para o grupo do NaOCl, 65,99% para o grupo do Azul de Metileno e Azul de Toluidina, 67,23% para a Curcumina e 97,49% para o grupo que utilizou o Tanino[11].

O Azul de Toluidina na presente pesquisa mostrou um resultado satisfatório em relação à redução bacteriana discordando dos achados de um estudo, no qual foram avaliados os efeitos antibacterianos da aPDT em biofilmes de Enterococcus faecalis infectados experimentalmente em condutos radiculares portadores de infecções endodônticas primárias e secundárias (retratamento endodôntico). Foi utilizado o AT como FS e uma fonte de luz LED de 635 nm de comprimento de onda e 100 mW de potência para realização do protocolo de aPDT. O Azul de Toluidina associada a PDT se mostrou menos efetiva na eliminação de E. faecalis quando comparada a irrigação com NaOCl a 3%. Todavia, a combinação de a PDT e NaOCl a 3% foi a que apresentou melhores resultados de desinfecção dos condutos radiculares contaminados com E. faecalis. Isso só reafirma a lógica que a PDT sozinha não é eficaz para redução bacteriana, ela só funciona associada ao PQM e as Soluções irrigadoras e ou até as Medicações Intracanais[12].

Em um estudo de espectroscopia, para verificar a medida de absorção da luz, realizado para buscar novos fotossensibilizadores para uso em PDT, verificaram que o tanino hidrolizável apresenta banda de absorção intensa entre 500 e 700nm. Nesta pesquisa usamos o Tanino a 0,005% hidrolisável que apresentou resultados surpreendentes de 97,49% como redução do microorganismo na coleta final, isto mostra que é um corante promissor, de baixo custo e facilmente adquirido já que é extraído da jurema preta e da Aroeira, porém, ressaltamos que esta pesquisa é um estudo laboratorial. É necessário testar o Tanino como corante com o Laser em Ensaios Clínicos Controlados e Randomizados em virtude da relevância científica[13].

5. Conclusão

Ao comparar os valores iniciais e finais, as reduções percentuais em relação à média de UFC de Enterococcus Faecalis foi: para o G1 com hipoclorito de sódio a 2,5%, para o Azul de Metileno e Azul de Toluidina , para a Curcumina e para o Tanino, foram, respectivamente, de 85,32%, 65,99%, 67,23% e 97,49%.Havendo uma grande redução bacteriana, principalmente no grupo que foi utilizado o Tanino como corante associado a PDT.

Houve um resultado equiparado nos grupos que foram utilizados o Azul de Metileno, Azul de Toluidina e a Curcumina. Porém, entre o Azul de Metileno e Azul de Toluidina e o Tanino, o último mostrou resultados bem superiores quanto à redução bacteriana.

A Curcumina apresentou resultados satisfatórios na redução bacteriana, porém, o Tanino foi bem superior a Curcumina no resultado final.

Referências

1- Alfenas CF, Santos MF, Takehara GN; de Paula MV. Photodynamic Therapy in the Reduction of microorganisms in the root canal system Rev. Bras. Odontol., Rio De Janeiro, (68)1:68-71, Jan./Jun. 2011.

2- Siqueira J, Rôças I, Alves F, Santos K. Selected Endodontics Pathogens In The Apical Third Of Infected Root Canals: A Molecular Investigation. J Endod. (30)638-643, 2004.

3- Chiniforush N et al. Can Antimicrobial Photodynamic Therapy (Aaaaaapdt) Enhance The Endodontic Treatment? Journal Of Lasers In Medical Sciences, (2)7:76-85 · March, 2016.

4- Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal Efficacy Of Photodynamic Therapy Against Enterococcus Faecalis In Infected Root Canals: A Systematic Literature Review. Photodiagnosis And Photodynamic Therapy, (4)10: 632-643, 2013.

5- Holliday R. Traditional And Contemporary Techniques For Optimizing Root Canal Irrigation. N. March 2014, 2015.

6- Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira F.B, Souza-Filho F.J. In Vitro Assessment Of The Immediate And Prolonged Antimicrobial Action Of Chlorhexidine Gel As An Endodontic Irrigant Against Enterococcus Faecalis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.(99)768-772, 2010.

7- Gomes B et al. Microbial Analysis of Canals of Root-Filled Teeth With Periapicallesions Using Polymerase Chain Reaction. J Endod, (34) 537-540, 2008.

8- Evans M, Davies J.K, Sundqvist G, Fidgor D. Mechanisms Involved In The Resistance Of Enterococcus Faecalis To Calcium Hydroxide. Int Endod J, (35)221- 228, 2002.
9-Mesquita, 2013.
10- Garcez AS, Silvia CN, Michael H, Ribeiro MS. Efficiency Of Naocl And Laser-Assisted Photosensitization On The Reduction Of Enterococcus Faecalis In Vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.(102)93-98,2006.
11- Fimple JL et al. Photodynamic Treatment Of Endodontic Polymicrobial Infection In Vitro. J Endod, (34)728-734, 2008.
12-Tennert C et al. Effect Of Photodynamic Therapy (Aaaaapdt) On Enterococcus Faecalis Biofilm in Experimental Primary and Secondary Endodontic Infections. Bmc Oral Health, V. (14)1:132, 2014.
13-Setúbal CA. Procura por novos Fotossensibilizadores para uso em Terapia Fotodinâmica. Dissertação, Mestrado em Química. Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná. Cruritiba, Paraná, Rio Grande do Sul, 2007, 111f.