



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BRUNO LUIZ RIBEIRO CAMPOS
NEVES**

**AVALIAÇÃO DA TFDa ASSOCIANDO A LUZ LASER VERMELHO
(660nm) AO COMPOSTO FENOTIAZINICO AZUL DE TAYLOR
PARA O TRATAMENTO DE CANAIS RADICULARES
INFECTADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

Salvador
2022

BRUNO LUIZ RIBEIRO CAMPOS NEVES

**AVALIAÇÃO DA TFD_a ASSOCIANDO A LUZ LASER VERMELHO
(660nm) AO COMPOSTO FENOTIAZINICO AZUL DE TAYLOR
PARA O TRATAMENTO DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS
COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da saúde, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Barbosa Pinheiro
Co-orientador: Fernando Pires Sampaio

Salvador
2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me manteve sempre forte para
vencer todos os obstáculos

Aos meus pais, Luiz Magno Queiroz Neves e Nailza Ribeiro Campos Neves, pelo
apoio incondicional, incentivo constante e por serem exemplos de caráter e amor
ao próximo, sempre mostrando que o estudo é o meio mais gratificante para
vitória.

A minha esposa, Imara Nunes de Queiroz Silva, por ser meu porto-seguro, minha
companheira, enxugando minhas lágrimas e vibrando com minhas vitórias,
sempre ao meu lado.

Ao meu filho, Pedro Queiroz Silva Campos Neves, razão do meu viver e que faz
ser um pai e ser humano melhor a cada dia.

Aos meus irmãos, Samuel Rodrigues Neves Neto e Emily Vitoria Lima Santos,
pelos conselhos e risadas nos momentos que mais precisei, pela oportunidade de
convívio e amor nesta vida, que se repita eternamente.

A minha segunda mãe, Maricelia Lima, por todo cuidado e carinho em todos os
momentos.

A minha madrinha, Simone Queiroz, exemplo de mulher que sempre me ensinou
que a educação sempre será o melhor caminho.

Ao meu sogro e minha sogra, Siderlon Oliveira da Silva e Maria Claudia de
Queiroz Nunes, pelo apoio diário, sempre me dando força e acolhimento.

Aos meus cunhados, Joana Carolina e Siderlon Junior, pelas risadas e apoio em
todos os momentos dessa trajetória.

Ao meu grande exemplo, Dr. Fernando Sampaio Pires, que me acolheu como
aprendiz e amigo, se tornando um parceiro e alicerce de todas as horas,
conselheiro fiel, amigo para a vida toda.

Ao meu orientador, Prof. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, que confiou em mim
como aluno e orientado, sempre disponível e com grandes soluções.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Aparecida Marques, Suzana Sampaio e Fabiola Carvalho, pelo apoio, por me acolher como aluno desde o primeiro dia que nos conhecemos.

Ao Prof. Pedro , pela ajuda na construção e execução deste trabalho, sempre disponível e atencioso.

Ao colega., Iago, sempre disponível para acrescentar nas nossas pesquisas, com sua experiência e aconselhamento, nos momentos de maior necessidade.

Ao Prof. e amigo Luiz Guilherme pelo incentivo desde a graduação e por sempre se colocar disponível para somar.

Àos meus colegas, obrigado por todos os momentos vividos, em especial a Amanda Santos e Anna Paula Lima, pelo companheirismo e parceria, amigas que levo para toda a vida.

Aos estagiários do Centro de Biofotônica da FOUFBA, em especial Ellen Ribeiro, pela imensa colaboração e apoio, imprescindíveis à realização das atividades.

A todos os professores do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, que colaboraram para minha formação acadêmica e profissional.

Aos funcionários da FOUFBA, que de maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho, em especial Dona Maria, Jaci e Leninha.

Ao CNPq pela colaboração científica e financeira, apoiando às atividades acadêmicas e o desenvolvimento de profissionais cada vez mais capacitados.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Muito Obrigado

NEVES, Bruno Luiz Ribeiro Campos. AVALIAÇÃO DA TFDa ASSOCIANDO A LUZ LASER VERMELHO (660nm) AO COMPOSTO FENOTIAZINICO AZUL DE TAYLOR PARA O TRATAMENTO DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS COM *Enterococcus faecalis*. Orientador: Antonio Luiz Barbosa Pinheiro. Co-orientador: Fernando Pires Sampaio. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciência da Saude, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2022.

Resumo

O *Enterococcus faecalis* é o principal patógeno responsável pelos insucessos nos tratamentos endodônticos na clínica odontológica. A sua capacidade de penetrar nos canalículos dentinários, resistir a grandes variações de pH do meio, alta capacidade de produzir biofilme, apresentar genes de resistência, bombas de efluxo o torna altamente resistente às farmacoterapias convencionais e aos tratamentos endodônticos clássicos. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica *in vitro* utilizando o azul de Taylor nas nanocontrações de 332 ng/mL e 689,9 ng/mL associados ao laser vermelho acoplado á fibra optica ($\lambda 660 \text{ nm}$) nos tempos de pré irradiação de 5 e 10 minutos sobre o biofilme integro do *E. faecalis* em canais radiculares. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados utilizaram o teste estatístico ANOVA com comparação múltipla de Tukey e pós-teste o software GraphPad Prism® 6.0. A TFDa foi executada em dois protocolos 1 e 2, que apresentaram reduções significativa da carga microbiana ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle positivo. O percentual de redução microbiana da cultura do biofilme integro do *E. faecalis* intracanal nestes grupos foram de 90% no protocolo 1 e 90,3% no protocolo 2. Conclusão, os achados demonstraram que a TFDa se mostrou promissora, quando utilizada contra o biofilme integro do *E. faecalis* no canal radicular, tornando-se uma alternativa terapêutica, viável, para uso na odontologia, pois é eficiente, pode ser modulada de acordo com a necessidade do tratamento, e não existem provas de indução de cepas resistentes do microrganismo.

Palavra Chave: *Enterococcus faecalis*. Endodontia. Terapia Fotodinâmica. Laser

NEVES, Bruno Luiz Ribeiro Campos. EVALUATION OF TFDa ASSOCIATING RED LASER LIGHT (660nm) WITH TAYLOR BLUE PHENOTHIAZIN Compounds FOR THE TREATMENT OF RADICAL CANALS INFECTED WITH *Enterococcus faecalis*. Advisor: Antonio Luiz Barbosa Pinheiro. Co-Supervisor: Fernando Pires Sampaio. Dissertation (Master in Biotechnology) - Institute of Health Science, School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, 2022

Abstract

Enterococcus faecalis is the main pathogen responsible for failures in endodontic treatments in clinical dentistry. Its ability to penetrate dentinal canaliculi, resist to large variations in pH, high capacity to produce biofilm, resistance genes and efflux pumps makes it highly resistant to conventional pharmacotherapies and classical endodontic treatments. The aim of this study was to evaluate the efficacy of in vitro photodynamic therapy using Taylor blue in nanocontractions of 332 $\eta\text{g/mL}$ and 689.9 $\eta\text{g/mL}$ associated with red laser coupled to optical fiber ($\lambda 660 \text{ nm}$) in pre-irradiation times of 5 and 10 minutes on the entire biofilm of *E. faecalis* in root canals. All experiments were performed in triplicate and the results used the ANOVA statistical test with Tukey's multiple comparison and post-test the GraphPad Prism® 6.0 software. TFDa was performed in two protocols 1 and 2, which showed significant reductions in microbial load ($p < 0.001$ and $p < 0.01$) when compared to the positive control group. The percentage of microbial reduction of intracanal *E. faecalis* whole biofilm culture in these groups were 90% in protocol 1 and 90.3% in protocol 2. Conclusion, the findings demonstrated that TFDa showed promise when used against *E. faecalis* whole biofilm in the root canal, making it a viable, therapeutic alternative for use in dentistry because it is efficient, can be modulated according to the need for treatment, and there is no evidence of induction of resistant strains of the microorganism.

Key words: *Enterococcus faecalis*. Endodontics. Photodynamic Therapy. Laser

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - (A) Cavidade de acesso coronal e padronização do comprimento radicular em 16 mm; (B) Dispositivo (tubo tipo penicilina acoplado ao Eppendorf); (C) dispositivo completo com a raiz.

Figura 02 - (A) Lavagem do canal; (B) Dispositivos em placas de 24 poços no período de pré-irradiação (5 minutos e 10 minutos); (C) Emissor laser acoplado à fibra óptica irradiando a raiz; (D) Raspagem do biofilme intra radicular com lima 50 K-file.

Figura 03 – (A) Comprimento da raiz inicial, (B) Marcações na raiz a cada 1mm, (C) Power Meter e a raiz fixada no suporte, (D) laser com a fibra acionado no interior do canal radicular.

Figura 04 – (A) Forma, tamanho e arranjos da bactéria; (B) Teste de Gram.

Figura 05 – Avaliação do crescimento bacteriano com virada de cor do meio por mudança da coloração púrpura para o amarelo em 48 horas.

Figura 06 – Avaliação da proliferação microbiana do biofilme de *E. faecalis* exposto a diferentes concentrações do composto fenotiazínico DMMB.

Figura 07 - Resultados do modelo experimental dos protocolos 1 e 2, as análises estatísticas do $\log_{10}^{UFC/mL}$ em relação ao biofilme de *E. faecalis* em 60 dias e os valores de *= P<0,05, **=P<0,01, ***=P<0,001.

Figura 08- Gráfico da relação entre Irradiância e comprimento do canal radicular.

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Referenciais Teóricos.....	11
3. Objetivos	14
3.1 Geral	14
3.2 Específicos.....	14
4. Materiais e método	15
4.1 Fonte de luz	17
4.2 Cultura Bacteriana <i>Enterococcus faecalis</i>	17
4.3 Preparação do dente	18
4.4 Preparo do meio de cultura e desenvolvimento do biofilme.....	19
4.5 Inoculação dos canais radiculares	19
4.6 Análise do crescimento microbiano.....	20
4.7 Determinação do IC ₅₀	20
4.8 Protocolos de descontaminação dos canais radiculares	21
4.8.1 Grupos Experimentais	21
4.8.2 Protocolos de Tratamento.....	21
4.9 Preparo dos dentes para o teste da atividade antimicrobiana	22
4.10 Análise e comportamento da luz LASER.....	20
4.11 Análise estatística.....	21
5. Resultados	24
6. Discussão.....	29
7. Conclusão	33
8. Referências Bibliográficas.....	34

1- Introdução.

A terapia fotodinâmica antibacteriana consiste na irradiação das bactérias por uma luz laser ou LED de comprimento de onda complementar, ocorrendo à absorção de fótons pelo corante, que é convertido para um estado excitado, pois a energia transferida no processo pode resultar na formação de moléculas reativas como o oxigênio singlete, íons superóxidos, radicais hidroxílicos e outros radicais livres que podem danificar e/ou matar as células bacterianas (BHATTI et al., 1997; DOBSON; WILSON, 1992; SPIKES; JORI, 1987; MACROBERT et al., 1989; MALIK et al., 1990; WILSON et al., 1993a).

A escolha da TFD como parte do tratamento de lesões endodônticas associadas ao *E. faecalis* é uma alternativa terapêutica viável, pois o processo apresentou um potencial de inibição bacteriana de 99,999998% em cultura planctônica do microrganismo utilizando as luzes laser e LED vermelhos. (SAMPAIO, 2018). O *E. faecalis* é a espécie mais frequente detectada nos casos de falha na terapia endodôntica, com uma prevalência que varia de 29 a 77% (WANG et al., 2011).

O *E. faecalis* se destaca pelo alto potencial patogênico e habilidade em formar biofilme como uma característica importante de virulência (DONELLI e GUAGLIANONE, 2004). O biofilme é um complexo multicelular caracterizado por colônias aderentes circundadas por uma matriz exopolissacarídica que protege as bactérias contra agentes antimicrobianos e fagócitos, permitindo sua sobrevivência em ambientes hostis (GEORGE et al., 2005, CHAI et al., 2007).

O ideal para a terapia fotodinâmica antimicrobiana é que o fotossensibilizador seja utilizado na menor concentração possível e que seu efeito antimicrobiano seja potencializado pela ação da luz (DEMIDOVA e HAMBLIN 2011). A melhor densidade energética sugerida para ser utilizada em futuros protocolos *in vivo* na odontologia com a luz laser é de 18 J/cm² em associação com o fotossensibilizador azul de Taylor (SAMPAIO, 2018).

Os compostos fenotiazínicos exibem um largo espectro antibacteriano, descritos como efetivos fotossensibilizadores contra patógenos intracelulares; cuja as

doses necessárias para uso fotodinâmico são consideravelmente menores que as necessárias para tratamento sem ativação pela luz (O'RIORDAN et al., 2005). A escolha do fotossensibilizador azul de Taylor na concentração de até 1500 $\eta\text{g/mL}$ é seguro e incapaz de gerar pigmentação na estrutura dental. Além disso, a utilização do fotossensibilizador em nano gramas, permiti utilizar frações menores do produto, estando cerca de cinco vezes abaixo da concentração descrita como máxima para uso protocolar, garantindo assim alta seletividade e segurança na sua aplicação terapêutica (SAMPAIO, 2018).

O meio de cultura BHI suplementado com sorbitol (meio LABEM) como fonte de energia para à fermentação da cultura do *E. faecalis* traz um carboidrato de cadeia mais curta, que consegue participar com maior eficiência nos processos metabólicos bacterianos e cujo processo catabólico demandaria menor gasto energético da bactéria. O indicador púrpura de bromocresol é um reagente adequado para esse modelo de estudo, pois indica o crescimento bacteriano (turvação do meio) com viragem de cor do meio de púrpura para amarelo no intervalo de pH entre 6.8 a 5.2 tornando o processo mais sensível e eficiente (SAMPAIO,2018).

A escolha desse protocolo de estudo utilizando a luz laser vermelha ($\lambda 660 \text{ nm}$) e o fotossensibilizador azul de Taylor na concentração de 332 $\eta\text{g/mL}$, talvez seja a oportunidade terapêutica, capaz de solucionar, os casos clínicos dos dentes com lesões endodônticas, ocasionadas pelo *E. faecalis*, e cujo o emprego das terapias convencionais se mostram falhos, limitados no controle desse microrganismo gerando assim; um índice de insucessos nos tratamentos endodônticos executados diariamente na clínica odontológica.

Os resultados alcançados por esse estudo demostram que a TFDa utilizando o fotossensibilizador azul de Taylor nas nanoconcentrações de 332 $\eta\text{g/mL}$ e 698,9 $\eta\text{g/mL}$ em associação com a luz laser vermelho acoplado a fibra óptica ($\lambda 660 \text{ nm}$) com a densidade energética de 18 J/cm^2 , se mostrou efetiva no controle do biofilme bacteriano integro no canal radicular contaminado pelo *E. faecalis*.

2 Referenciais Teóricos:

2.1 Biotecnologia e fototerapia.

Descrito no início do século XX, muitos estudos foram publicados a respeito da TFD, porém, apenas no final de 1980, essa tecnologia foi aplicada de maneira eficaz na área da saúde humana, inicialmente no tratamento de tumores malignos superficiais e, posteriormente no tratamento de infecções locais, fúngicas e bacterianas (LONGO et al., 2010). Além de matar a célula alvo o processo apresenta um efeito positivo secundário ou indireto da terapia, pois essa é capaz de promover estímulos adicionais da microcirculação e trofismo celular (KARU, 1987).

A inovação nos processos biológicos vem se aprimorando a cada avanço da biotecnologia; envolvendo diversos setores: alimentício, farmacêutico, cosmético, agricultura e saúde. A utilização da luz como ferramenta terapêutica para tratamento de inúmeras doenças vem ganhando espaço na biotecnologia principalmente nas áreas de saúde (ALTMAN e HASEGAWA, 2012).

2.2 Laser.

Os primeiros estudos descritos desde sua descoberta por Einstein, em 1917, se multiplicaram em trabalhos que confirmam a possibilidade de utilização dessa tecnologia na odontologia devido aos efeitos benéficos produzidos sobre os tecidos irradiados. O laser de baixa potência emite radiação, sem potencial destrutivo, não tendo como característica o aumento da temperatura. (GENOVESE, 2000; ZANIN e BRUGNERA, 2007; MAROTTI et al., 2008).

A principal característica física da luz laser como uma energia radiante produzida por todos os estados físicos da matéria que apresenta um comprimento de onda específico, coerente, colimado, monocromático e polarizado (PINHEIRO et al., 2010).

2.3 *Enterococcus faecalis*.

O *E. faecalis* se destaca pelo alto potencial patogênico e habilidade em formar biofilme como uma importante característica de virulência (DONELLI e GUAGLIANONE, 2004). A resistência aos antimicrobianos comumente empregados na terapêutica médica; seja pela aquisição de genes de resistência em plasmídeos ou transposons de outros microrganismos, ou ainda por mutações cromossomas espontâneos é característico do gênero (SALYERS e AMÁBILE-CUEVAS, 1997; FURTADO et al., 2005).

Os microrganismos desse gênero são aerotolerantes que apresentam crescimento ótimo a 35°C, entretanto se desenvolvem em ampla variedade de temperaturas entre 10 e 45°C e podem sobreviver durante 30 minutos a 60°C, bem como suportar amplas variações de ph. Essas bactérias caracterizam-se por serem cocos Gram positivos que podem apresentar-se sozinhos, aos pares ou ainda na forma de pequenas cadeias. (SCHLEIFER e KLIPPERBÄLZ, 1984; FRANZ et al. 1999; CORRÊA et al., 2005).

2.4 Fenotiazínicos.

São compostos fotossensibilizantes com grande propensão à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e considerados hidrofílicos (WAINWRIGHT et al., 1998). A eficácia dos fotossensibilizadores é avaliada a partir das propriedades foto físicas e fotoquímicas de seus monômeros (USACHEVA, TEICHERT e BIEL, 2003).

O local de ação intracelular do fotossensibilizador varia e depende da linhagem celular e da estrutura do fotossensibilizador, principalmente dos grupos periféricos ligado ao cromóforo. O padrão de localização do derivado metilado do Taylor poderia ser diferente do azul de metileno, isso explica sua maior lipofilicidade, maior rendimento quântico de oxigênio singleto, menores taxas de redução da sua forma leuco, maior cito e fototoxicidade (WAINWRIGHT, 1997). Portanto, o azul de Taylor se liga com maior eficiência as membranas se comparado ao azul de metileno (BACELLAR, 2014).

2.5 Terapia Fotodinâmica Antibacteriana (TFD).

A luz no espectro visível nem sempre é absorvida por bactérias e para sua utilização se faz necessário a presença de um cromóforo exógeno não tóxico que se fixe à parede bacteriana atraindo para si a luz laser ou LED no momento da irradiação é essencial para que os lasers não ablativos tenham ação antimicrobiana (WILSON et al., 1992; WILSON, 1993). Assim as células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem se tornar sensíveis à luz se forem coradas com fotossensibilizadores ou agentes cromóforos exógenos como o azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO), azul de taylor (DMMB), rosa de bengala, eosina e hematoporfirinas (WILSON, 1993).

O efeito fotodinâmico baseia-se a Terapia Fotodinâmica Antibacteriana, atua sobre os microrganismos de diferentes formas. Quando a molécula do fotossensibilizador absorve um fóton, então ela sai do seu estado fundamental e vai para o estado excitado singleto. Este estado do Oxigênio é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações em cadeia com componentes da célula tais como DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, etc., tendo como resultado a morte da célula (WAINWRIGHT, 1998). Os produtos dessas reações fotoquímicas podem então danificar componentes essenciais das células como a membrana citoplasmática por ruptura ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível, resultando na morte bacteriana (BHATTI et al., 1997; MALIK et al., 1990; SPIKES JORI, 1987).

3.Objetivos

3.1 Geral

Avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica antibacteriana utilizando o azul de Taylor associados ao laser vermelho acoplado a fibra óptica ($\lambda 660 \text{ nm}$) em dentes com canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

3.2 Específicos

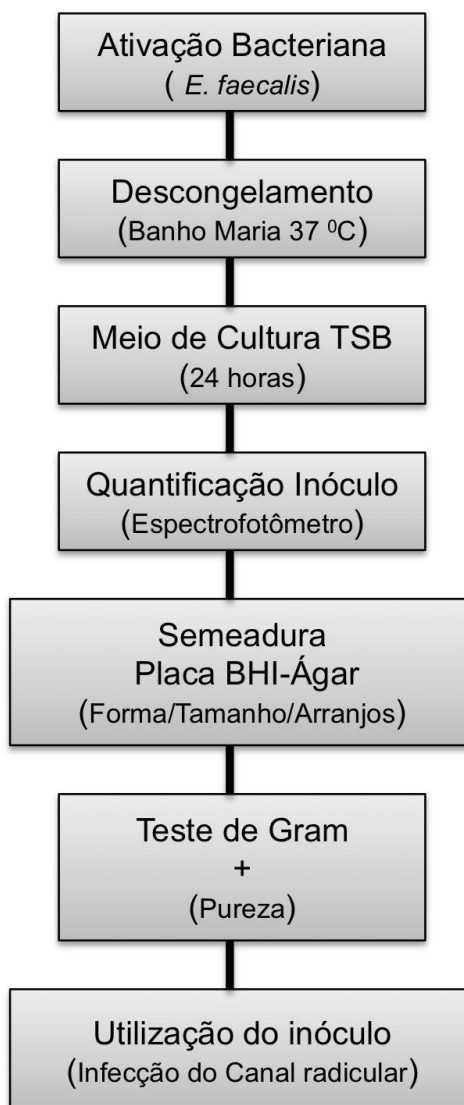
Determinar o IC_{50} do fotossensibilizador azul de Taylor (DMMB) em relação a cultura do biofilme do *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica Antibacteriana com a luz laser na densidade energética de 18 J/cm^2 associada ao composto fenotiazínico azul de Taylor nas nanoconcentrações de 332 ng/mL e $698,9 \text{ ng/mL}$ em dentes com canal radicular infectado com *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

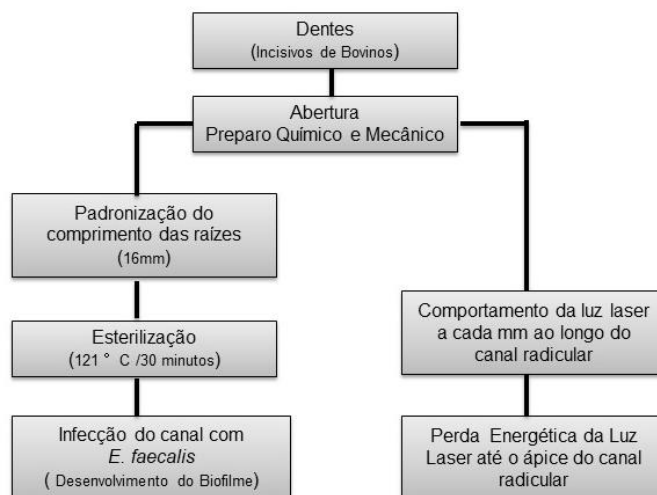
4 Metodologia

4.1 Fluxogramas

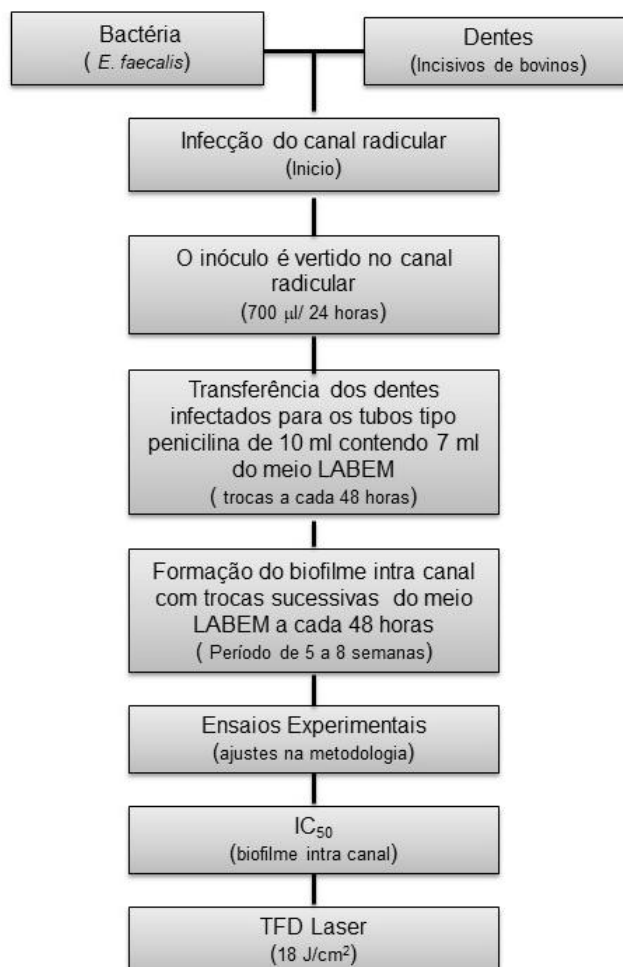
4.1.1 Ativação Bacteriana (*E. faecalis*)



4.1.2 Padronização Dentes bovinos (Incisivos)



4.1.3 Formação Biofilme (*E. faecalis* /canal radicular)



4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de ética local para uso de animais sob o número 121/2017 (CEUA/ICS- UFBA, Bahia, Brasil).

4.1 - CULTURA BACTERIANA DE *Enterococcus faecalis*.

A cepa microbiana utilizada nesse estudo foi o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), e para todas as etapas desse trabalho seguimos o mesmo protocolo laboratorial; durante os procedimentos experimentais 5 mL do inóculo bacteriano foi deixado em banho maria a 37°C (316-1D®, Nova Ética, Brasil) até o descongelamento e imediata inoculação em Erlenmeyer vertido com 45 ml de caldo TSB® (Merck, Alemanha) e incubada em estufa a 37 °C (TE-391/1®TECNAL, Brasil) por 24 horas.

A determinação da concentração microbiana do inóculo foi feita no espectrofotômetro SpectraMax® 190 (Molecular Device, California, EUA) com leitura em 620 nm. A leitura foi correlacionada à escala de McFarland para determinar a concentração do inóculo na pré incubação. O método de coloração de Gram foi utilizado para identificar cultura microbiana e o resultado obtido como gram-positivo. A semeadura foi feita diretamente na placa com alça calibrada descartável do tipo (Loop), sobre o TSB® (Merck, Alemanha) preparado de acordo com as instruções do fabricante e incubado à 37°C (TE-391/1®, TECNAL, Brasil), por 24 horas, para observação da forma, tamanho e arranjos.

4.2 FONTE DE LUZ

A fonte de luz utilizada neste estudo para irradiar as amostras foi o Laser vermelho $\lambda 660$ nm (Duo® MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), acoplado à fibra óptica MM Optics (38mm de comprimento, diâmetro inicial 1mm e na ponta 0,3mm), cujos parâmetros estão na tabela 1.

TABELA 1 : Parâmetros da luz laser utilizadas no estudo

Parâmetros	Duo Laser	Duo Laser com Fibra
Comprimento de Onda (ηm)	660	660
Modo	Contínuo	Contínuo
Potência (mW)	100	20

4.3 PREPARO DOS DENTES

Foram utilizados dentes bovinos unirradiculares extraídos com cimento íntegro e mantidos em uma solução de Timol a 0,2% até o início dos experimentos. Os dentes foram retirados do armazenamento da solução de timol 0,2% e imersos em hipoclorito de sódio a 5% (Cromoline, Diadema, São Paulo, Brasil) por 30 minutos para remoção de tecidos orgânicos remanescentes.

As cavidades de acesso seguem o padrão clínico corrente (Figura 1A), e os dentes foram preparados até a lima tamanho 50 K-File (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) 1 mm aquém do forame apical, utilizando uma técnica de preparação no sentido “coroa-ápice”. Durante a instrumentação, os canais radiculares foram irrigados com 3 mL de NaClO a 1% (Cromoline, Diadema, São Paulo, Brasil) após cada troca da lima. Posteriormente, as coroas foram removidas e o comprimento da raiz padronizado em 16 mm do ápice radicular para a borda coronal (Figura 1A). Os canais radiculares foram secos e preenchidos com EDTA Iodotosul[®] (Souza&Leonardi Ltda, RS, Brasil) a 17% (pH 7,2) por 3 minutos para remoção da lama dentinária. Essa rotina foi repetida duas vezes e em seguida os dentes foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 30 minutos.

As raízes foram acopladas aos tubos de polipropileno do tipo Eppendorf de 1,5 mL (Cral, São Paulo, SP, Brasil) preparados para que o ápice radicular se mantivesse em contato direto com meio de cultura (Figura 1C).



FIGURA 1 : (A) Cavidade de acesso coronal e padronização do comprimento radicular em 16 mm; (B) Dispositivo (tubo tipo penicilina acoplado ao Eppendorf); (C) dispositivo completo com a raiz. (PPGBIOTEC/2022)

4.4 PREPARO DO MEIO DE CULTURA

O caldo LABEM, meio de cultura escolhido para esse estudo, foi preparado com os seguintes reagentes: BHI® (Sigma-Aldrich, Índia) suplementado com Sorbitol como fonte de carbono (Farmácia Erva Doce, Salvador, Ba) e o indicador de pH Púrpura de Bromocresol® (Merck, Alemanha). O preparo do sorbitol utilizou uma alíquota de 32,4 mL da solução que foi diluída em 450 ml de água destilada, estéril e com passagem em um filtro de 0,22 µm (Kasvi, Itália). Para o preparo do indicador foi utilizado 1,6 g do produto, diluído em 100 mL de álcool etanol a 95%. O preparo do caldo BHI® foi utilizado 22,5 g do produto para 900 mL de água destilada e adicionado 1 mL do indicador de pH e a esterilização do meio em autoclave a 121°C, durante 15 minutos e a suplementação com sorbitol ocorreu dentro da capela de fluxo laminar com o caldo LABEM e a relação meio e suplementação é da ordem de 2:1.

4.5 INOCULAÇÃO NOS CANAIS RADICULARES E DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME

Os dispositivos completos (raízes mais tubos tipo Eppendorf) (Figura 2C), foram imersos em NaClO a 5% (Cromoline, Diadema, São Paulo, Brasil) durante trinta minutos e enxaguados com 10 mL água estéril e esterilizados em autoclave a 121 °C durante trinta minutos. Os tubos penicilinas padrão apresentam um volume total de 10mL e em seguida verteu-se 7 mL do caldo LABEM no tubo e incubados a 37 °C por 24 horas, a fim de garantir a esterilidade do dispositivo e observar se haveria mudança de cor do meio de purpura (estéril) para amarelo (contaminado).

O dispositivo foi montado para que o inoculo bacteriano; permanecesse com porção radicular do dente conectada à extremidade cortada de um tubo de polipropileno tipo Eppendorf de 1,5 mL (Cral, São Paulo, SP, Brasil) fixado com adesivo de cianoacrilato (Super Bonder, Itapevi, SP, Brasil) e resina epóxi (Durepoxi, São Paulo, SP, Brasil). As conexões do dente e tubo foram revestidas inteiramente com as duas camadas de esmalte de unha Risqué® (Ikesaki Cosméticos, São Paulo, SP, Brasil). Foi vertido 0,7 mL do inóculo nos canais dos dentes com ápice lacrado e postos em estufa a 37 °C por 24 horas. Após esse período foi removido o lacre apical e a unidade foi introduzida em um tubo tipo penicilina contendo 7 mL de caldo LABEM com o ápice das unidades imersos no caldo e levados à estufa a 37 °C. Durante 60 dias e a cada 48 horas, os frascos tipo penicilina foram trocados, em condições assépticas, por outro idêntico com novo caldo LABEM em decorrência da necessidade de renovar a fonte de carbono que a bactéria utiliza nos seus processos metabólicos.

4.6 ANÁLISE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano foi verificado por colorimetria através do meio de cultura LABEM, observando-se a mudança da cor púrpura (estéril) para amarelo (contaminado) após viragem da cor do meio incubados a 37 °C durante 48 horas. A coloração de Gram foi utilizada para confirmar o inoculo como gram-positiva, característica da *E. faecalis*. Um controle negativo foi utilizado para testar a esterilidade e um outro como controle positivo utilizado para verificar a viabilidade bacteriana ao longo do experimento. Portanto, durante o período de 60 dias de desenvolvimento do biofilme nos canais radiculares, três dentes não inoculados foram mantidos incubados a 37 °C, como controle asséptico, e três dentes inoculados com *E. faecalis*, incubados e analisados em condições idênticas.

4.7 DETERMINAÇÃO DO IC₅₀ DO FOTOSSENSIBILIZADOR DMMB EM RELAÇÃO A CULTURA DO BIOFILME DO *E. faecalis*.

Foram utilizados 18 dentes bovinos, unirradulares divididos em seis diferentes grupos e em triplicata. O IC₅₀ foi determinado pelo método de plaqueamento e unidade

formadora de colônia (UFC) com as concentrações do fotossensibilizador DMMB com: 15,6 ng/mL; 62,5 ng/mL; 250 ng/mL; 1000 ng/mL; 4000 ng/mL e um grupo controle. O inóculo e suas respectivas concentrações passaram por diluições seriadas em solução de PBS Gibco® (Life Technology, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) até 10^{-7} e semeados em placas com ágar BHI, em triplicata, e incubados 24 horas em estufa à 37 °C (TE-391/1® TECNAL, Brasil).

4.8 PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES

4.8.1 Grupos Experimentais

Os dentes foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais e dois controles de acordo com os protocolos propostos na tabela 2.

TABELA 2: Grupos experimentais e protocolos utilizados

		Protocolo 1		Protocolo 2	
Grupo 1	Controle positivo	Dentes inoculados com <i>E. faecalis</i>		Dentes inoculados com <i>E. faecalis</i>	
Grupo 2	Controle negativo	Dentes não inoculados		Dentes não inoculados	
Grupo 3	Fotossensibilizador (Concentração + TPI)	332 ng/mL + 5 minutos		689,9 ng/mL + 10 minutos	
Grupo 4	Laser (Densidade Energética)	18 J/cm ² com a fibra		18 J/cm ² com a fibra	
Grupo 5	TFD (Concentração+TPI+DensidadeEnergética)	332ng/mL + 5 minutos + 18 J/cm ² com a fibra		698,9ng/mL+10 minutos + 18 J/cm ² com a fibra	

4.8.2 Protocolos de Tratamento

- Os grupos 1 e 2 foram os controles positivo e negativo respectivamente.

- O grupo 3, o canal foi irrigado com água destilada estéril e seco com cones de papel e preenchido apenas pelo fotossensibilizador azul de Taylor nas concentrações de 332 ng/mL e 689,9 ng/mL (Sigma-Aldrich, EUA) durante 5 minutos e 10 minutos respectivamente (tempo de pré-irradiação).
- O grupo 4, o canal foi irrigado com água destilada estéril e seco com cones de papel, em seguida o emissor laser acoplado a fibra óptica foi introduzido no canal (Figura 6C), posicionada 1 mm aquém do ápice radicular e procedida a irradiação com uma densidade de energia de 18 J/cm², realizando movimentos helicoidais ao longo do canal radicular.
- O grupo 5, o canal radicular foi irrigado com água destilada estéril e seco com cones de papel, colocado fotossensibilizador azul de Taylor nas concentrações de 332 ng/mL e 689,9 ng/mL por 5 minutos e 10 minutos respectivamente e em seguida feita a irradiação com luz laser seguindo os mesmos parâmetros descritos no grupo 4.

Todos os grupos testados foram feitas as triplicatas com diluições seriadas em solução de PBS Gibco® (Life Technology, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) de 10⁻¹ a 10⁻⁷ em placas de Ágar BHI® (Sigma-Aldrich, Índia).

4.9 PREPARO DOS DENTES PARA O TESTE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Expirado o prazo dos 60 dias, cada dente foi retirado do dispositivo, em condições assépticas, e irrigados com 5 mL de água destilada estéril com seringa estéril (Figura 2A). Os canais radiculares foram secos com cones de papel tamanho 50 (Tanari, Tanariman IND. Ltda., Manacaru, AM, Brasil), passaram por raspagem interna do biofilme com a lima número 50 K-File (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e foram preenchidos com 2 mL de PBS Gibco® (Life Technology, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) estéril e vertidos em placas de 24 poços (KASVI, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) (Figura 2D), seguidos com diluições seriadas com PBS Gibco® (Life Technology, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) de 10⁻¹ a 10⁻⁷ e semeados em placas com Ágar BHI® (Sigma-Aldrich, Alemanha), com 200 µL do inóculo do biofilme, incubados em estufa a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, as colônias bacterianas foram contadas e calculadas por UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro).

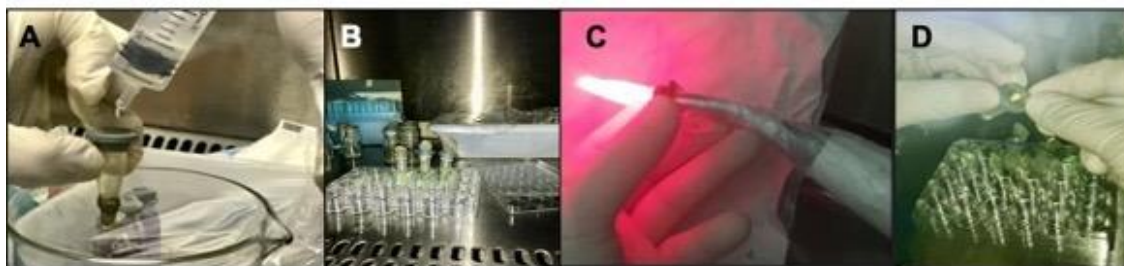


FIGURA 2: (A) Lavagem do canal; (B) Dispositivos em placas de 24 poços no período de pré-irradiação (5 minutos e 10 minutos); (C) Emissor laser acoplado à fibra óptica irradiando a raiz; (D) Raspagem do biofilme intra radicular com lima 50 K-file. (PPGBIOTEC/2022)

4.10 ANÁLISE E COMPORTAMENTO DA LUZ LASER COM A FIBRA ÓTICA AO LONGO DO COMPRIMENTO DO CANAL RADICULAR.

Inicialmente foi aferida a potência do emissor laser Duo com e sem a presença da fibra óptica acoplada ao dispositivo: o aparelho foi posicionado perpendicularmente no centro do sensor óptico do power meter (Thorlabs PM30, Newton, NJ, USA) a uma distancia de aproximadamente ± 1 mm do dispositivo e o processo foi repetido com a ponta da fibra óptica acoplada ao emissor (Tabela 1).

Um dente foi especialmente preparado com a remoção da sua coroa e a raiz deixada no comprimento de 23,41mm (Figura 3A), que passou por cortes sucessivos, a cada 1mm do seu tamanho até atingir 16,41mm (3B); a raiz foi posicionada no centro do sensor óptico do power meter (3C) e a fibra óptica introduzida no interior do canal radicular posicionada perpendicularmente ao sensor óptico e a cerca de ± 1 mm aquém do forame radicular; as leituras ocorreram a cada milímetro removido da raiz original até atingir o comprimento de 16,41mm, tamanho padrão escolhido para o desenvolvimento das demais etapas desse estudo. Atingido o comprimento de 16,41 mm da raiz a fibra óptica (Figura 3D) foi reposicionada como descrito anteriormente e mensurou-se a quantidade de energia que atravessava as paredes laterais da raiz radicular até atingir o sensor óptico, acoplado ao ICEL MB 6700® (ICEL Manaus, AM, Brasil) e feitas as leituras a cada dez graus de rotação do dispositivo no entorno da raiz.



FIGURA 3: (A) Comprimento da raiz inicial, (B) Marcações na raiz a cada 1mm, (C) Power Meter e a raiz fixada no suporte, (D) laser com a fibra acionado no interior do canal radicular. (PPGBIOTEC/2022)

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nesse estudo utilizaram o teste estatístico ANOVA com comparação múltipla de Tukey e pós-teste o software GraphPad Prism® 6.0 (San Diego-CA, EUA)

5.RESULTADOS

5.1 BACTÉRIA

A concentração do inóculo, pré-incubação, foi de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL aferida pelo espectrofotômetro no comprimento de 620 nm e levada a escala de Mc Farland.

A caracterização do inóculo foi feita pelo método de coloração de Gram, confirmado como bactéria Gram positiva (Figura 4B).

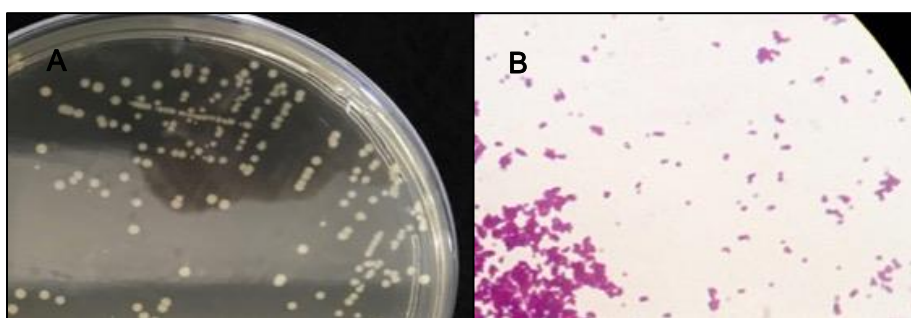


FIGURA 4: (A) Forma, tamanho e arranjos da bactéria; (B) Teste de Gram. (PPGBIOTEC/2022)

5.2 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

O crescimento bacteriano foi comprovado pela virada do meio (mudança de cor) do meio LABEM de púrpura (estéril) para amarelo (crescimento bacteriano) após 48 horas de incubação(Figura 5).

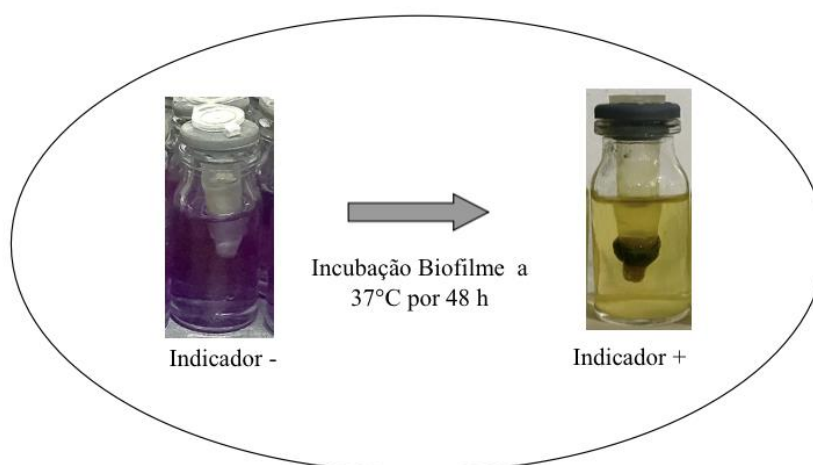


FIGURA 5: Avaliação do crescimento bacteriano com virada de cor do meio por mudança da coloração púrpura para o amarelo em 48 horas. (PPGBIOTEC/2022)

5.3 DETERMINAÇÃO DO IC₅₀ DO FOTOSENSIBILIZADOR DMMB EM RELAÇÃO A CULTURA DO BIOFILME DO *E. faecalis*.

A concentração inibitória média (IC₅₀) do composto DMMB foi de 689,9 ng/mL. (figura 6)

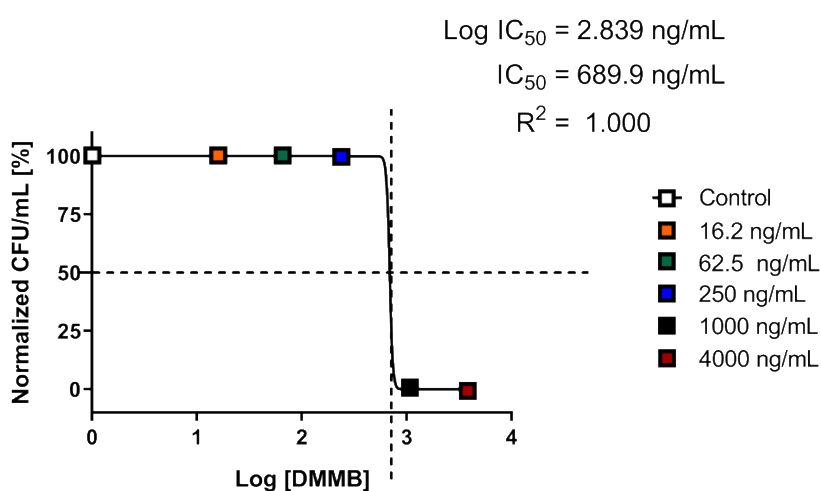


FIGURA 6: Avaliação da proliferação microbiana do biofilme de *E. faecalis* exposto a diferentes concentrações do composto fenotiazínico DMMB.

5.4 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.4.1 Laser

O laser isoladamente nesse modelo experimental não apresentou capacidade de gerar efeitos microbiostáticos com significância estatística sobre a cultura do biofilme intrarradicular de *E. faecalis* em relação ao grupo controle nos dois protocolos (Figura 7).

5.4.2 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador isoladamente nesse modelo experimental não apresentou capacidade de gerar efeitos microbiostáticos com significância estatística sobre a cultura do biofilme intrarradicular de *E. faecalis* em relação ao grupo controle nos dois protocolos (Figura 7).

5.4.3TFD Laser

O protocolo 1 da TFDa laser obteve uma redução microbiana de $p < 0,05$ em relação ao grupo laser e fotossensibilizador; o grupo controle a redução microbiana maior de $p < 0,001$ e a eficiência da terapia foi de 90% em relação a cultura do biofilme do *E. faecalis* intracanal (Figura 7).

O protocolo 2 da TFDa laser obteve uma redução microbiana de $p < 0,05$ em relação aos grupos laser e fotossensibilizador; o grupo controle a redução microbiana maior de $p < 0,01$ e a eficiência da terapia foi de 90,3% em relação a cultura do biofilme do *E. faecalis* intracanal (Figura 7).

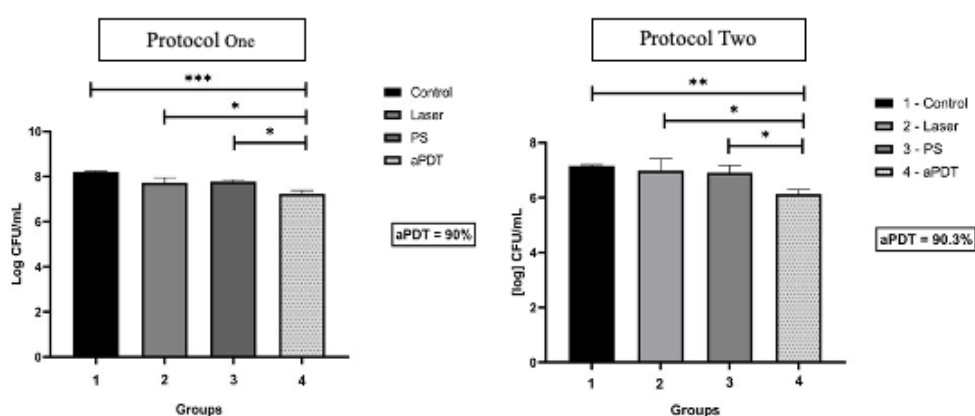


FIGURA 7: Resultados do modelo experimental dos protocolos 1 e 2, as análises estatísticas do $\log_{10}^{UFC/mL}$ em relação ao biofilme de *E. faecalis* em 60 dias e os valores de * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$. (PPGBIOTEC/2022)

5.5 ANÁLISE E COMPORTAMENTO DA LUZ LASER COM A FIBRA ÓTICA AO LONGO DO COMPRIMENTO DO CANAL RADICULAR.

A utilização da fibra óptica no emissor laser Duo, gera uma perda de eficiência energética do aparelho em torno de 80% se comparado ao emissor sem a fibra óptica (Tabela1).

É maior a quantidade de energia que se perde à medida que a luz percorre todo comprimento do canal radicular até chegar ao forame (Figura 8).

Foi verificado que cerca de 10% da energia depositada na região do ápice radicular consegue atravessar as paredes laterais e atingir a área externa do dente.

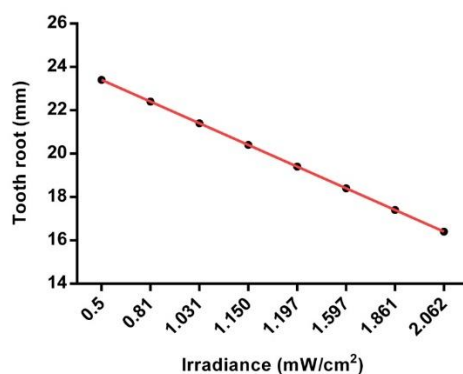


FIGURA 8:Gráfico da relação entre Irradiância e comprimento do canal radicular. (PPGBIOTEC/2022)

6- DISCUSSÃO

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDa) tem sido proposta como uma estratégia complementar à terapia endodôntica clássica; apresentando resultados promissores na desinfecção do sistema de canais radiculares em decorrência das limitações com as técnicas tradicionais, que não conseguem ser totalmente efetivas no controle bacteriano (RÔCAS e SIQUEIRA, 2011; PRADA et al., 2019; PLOTINO e GRANDE, 2019).

O *Enterococcus faecalis* apresenta uma relevante habilidade em formar biofilme e um alto potencial patogênico, que o destaca como uma característica de virulência importante (DONELLI e GUAGLIANONE, 2004). O biofilme se caracteriza por apresentar uma comunidade de células sésseis aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, na qual existem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (GEORGE et al.,2005; COSTA et al.,2014; RAN et al.,2015). Além disso, é frequentemente encontrado em canais obturados, exibindo também sinais de periodontite apical crônica (SIQUEIRA JR. e RÔÇAS, 2004).

SAMPAIO et al. (2019) descreve que a concentração inibitória média da cultura planctônica de *E. faecalis* (IC₅₀: 73,26 ng/mL) e esse estudo com o biofilme da mesma cultura revela uma concentração inibitória média (IC₅₀: 689,9 ng/mL) bem mais elevada que a planctônica, utilizando o fotossensibilizador azul de Taylor (DMMB- 1.9-Dimethyl-Metthylene Blue) como agente químico comum e utilizando-se em nano concentrações. Portanto, são comunidades complexas mono ou multiespécies embebidas em uma matriz constituída de exopolissacarídeos (EPS); que atuam nos processos de adesão do microrganismo, agindo como barreira física, impedindo a ação eficiente dos quimioterápicos e agentes sanitizantes (PRAŽMO et al.,2017). Os resultados alcançados nesse estudo ratificam os dados disponíveis na literatura e realçam o desafio, que novos protocolos de terapia fotodinâmica terão atuando contra o biofilme intracanal do *E. faecalis*.

Os fenotiazínicos são um grupo de fotossensibilizadores mais comumente utilizados nos protocolos de TFDa (PLOTINO et al.,2019). Dentre esses, o azul de metileno (MB) e o azul de toluidina (TBO) se destacam em muitas publicações

(CARVALHO et al., 2011; SOARES et al., 2018). Contudo, uma preocupação recorrente quanto ao uso dos fotossensibilizadores é o risco de pigmentação da estrutura dentária, especialmente em regiões estéticas (COSTA et al.,2016; RAMALHO et al.,2017). Logo fica demonstrado nesse modelo experimental, que o azul de Taylor (DMMB) em concentrações de até 1500 η g/mL não pigmenta a estrutura dental e se revela o mais indicado para uso na odontologia, pois em nano concentrações é seletivo, eficaz e estar sendo utilizado numa concentração inferior ao limite de citotoxicidade (SAMPAIO et al., 2019).

Martins et al. (2019) descreve que o DMMB é capaz de se ligar de forma mais eficiente às membranas e se inserir profundamente na bicamada lipídica dos microrganismos, podendo se acumular em mitocôndrias, lisossomos provocando morte celular, mesmo quando o fotossensibilizador for utilizado em nano concentrações. Além disso, a sua presença desencadeia efeitos de fotoindução da imunidade, fotoautofagia; pois continua a promover o estresse oxidativo, efeito muito comum aos demais fenotiazínicos, ampliando os benefícios terapêuticos gerados pela sua presença e potencializando a ação dos protocolos de TFDa sobre o biofilme intracanal do *E. faecalis*.

A utilização da fibra óptica acoplada ao emissor laser nos protocolos de TFDa permitem uma distribuição mais uniforme da luz ao longo do canal radicular e melhora sua dispersão através dos túbulos dentinários (WAINWRIGHT, 2009). Kim e Darafisheh (2020) descrevem que a perda de energia transmitida na fibra é insignificante, especialmente para as fibras de vidro. Para os protocolos endodônticos de TFDa, o uso da fibra óptica é necessário para uma melhor execução do tratamento intracanal (WAINWRIGHT, 2009). Contudo, esse estudo demonstrou que as fibras ópticas acopladas ao emissor nativo, podem degradar a eficiência energética do aparelho em cerca de 80%, ao calcularmos a densidade energética do protocolo utilizando o diâmetro do *spot* na ponta da fibra óptica e consequente elevação do tempo clínico de aplicação da terapia (Figura 8).

Demidova e Hamblin (2004) afirmam que o ideal para a TFDa é que o fotossensibilizador seja utilizado na menor concentração possível e que seu efeito antimicrobiano seja potencializado pela ação da luz. A literatura descreve que corantes em altas concentrações, limitam a penetração da luz por um fenômeno

denominado blindagem óptica (GEORGE, 2007). Nesse estudo, o fato do protocolo 2 apresentar o dobro da concentração do fotossensibilizador e o dobro do TPI em relação ao protocolo 1, mantido a mesma densidade energética não promoveu uma maximização dos efeitos da terapia.

Os diversos protocolos descritos na literatura apresentam uma enorme variação em relação ao uso dos fotossensibilizadores (tipo e concentração ideal) e aos parâmetros das fontes de luz (laser ou LED) com ou sem fibra óptica (potência do aparelho e densidade de energia). Essa falta de unidade paramétrica, dificulta a prospecção de dados estatísticos mais confiáveis dos efeitos gerados pela terapia fotodinâmica, impedindo que haja um consenso sobre um possível protocolo, padronizado, de TFDa para uso nos tratamentos clínicos *in vivo* (QUAH et al., 2012). Os protocolos apresentados nesse estudo com a concentração do fotossensibilizador em 332 ng/mL e 689,9 ng/mL, tempo de pré-irradiação de cinco minutos e dez minutos, respectivamente, e energia de 18J; apresentaram padrões rigorosos de segurança citotóxica, seletividade, tempo de irradiação aceitável para execução da terapia, tornando-se assim factível sua inclusão na prática clínica dos profissionais da odontologia (O'RIORDAN et al., 2005)

A associação de diferentes métodos de desinfecção pode trazer resultados ainda melhores, especialmente nos casos de infecções endodônticas persistentes (CARVALHO et al., 2011 e da SILVA et al., 2018). Embora o tratamento convencional reduza a carga bacteriana do canal, a desinfecção efetiva é difícil quando está atuando sobre o biofilme bacteriano (BYSTRÖM e SUNDQVIST, 1985). Visto que a utilização de desinfetantes de superfície como hipoclorito de sódio e clorexidina (SVENSATER e BERGENHOLTZ, 2004); os quais utilizados na irrigação do canal radicular durante o tratamento endodôntico, falham em penetrar completamente nos canalículos dentinários e profundamente nos biofilmes (ZAURA-ARITE et al., 2001 e VAN DER WAAL et al., 2015). É importante salientar que a terapia fotodinâmica é um método de descontaminação complementar e não deve substituir o tratamento endodôntico convencional (POURHAJIBAGHER et al., 2018).

A eficácia alcançada nos protocolos 1 com 90% e o protocolo 2 com 90,3% contra a cultura do biofilme intracanal do *E. faecalis* estão próximos aos resultados descritos na literatura para essa bactéria. Entretanto, esse estudo, particularmente,

apresenta protocolos, que podem ser utilizados *in vivo*, sem restrições citotóxicas, não apresenta riscos de pigmentação a estrutura dental, utilizou-se de amostras da cultura do biofilme maduro do *E. faecalis* no estudo e não houve desagregação da matriz desse biofilme endodôntico intra canal para aplicações da TFDa, condições severas que não são observadas nos tratamentos clínicos convencionais ou descritos em qualquer outra terapêutica alternativa. De fato, outros estudos recentes, apresentaram resultados mais efetivos com 95% (POURHAJIBAGHER et al.,2018), 96% (YUAN et al.,2019) e acima de 99% (PRAŽMO et al.,2017) de eficácia sobre a cultura do *E. faecalis*, porém nenhum desses apresentou protocolos de TFDa factíveis para uso clínico, alguns utilizaram cultura planctônica ou biofilme muito jovem da bactéria no seu modelo de estudo, outro apresenta alguma restrição citotóxica e potencial de gerar reações alérgicas, e riscos de pigmentação do dente. Enfim, efeitos indesejáveis da terapia apresentados nos modelos de estudo que inviabilizam a sua implementação clínica na odontologia.

Independente dos protocolos utilizados e todas as descrições publicadas em revisões de literaturas sobre o tema (POURHAJIBAGHER e BAHADOR,2019; VENDRAMINI et al.,2020), é visto como positivo introduzir a TFDa no tratamento endodôntico, de forma complementar, uma vez que as terapias convencionais clássicas podem falhar (da SILVA et al., 2018). Devido ao seu mecanismo de ação inespecífico, é possível repeti-la muitas vezes sem correr o risco de gerar resistência bacteriana (KIM e DARAFSHEH, 2020). Desse modo, se constitui uma terapia minimamente invasiva e altamente seletiva, sendo restrita a área de aplicação do corante e da luz matando a célula alvo (WAINWRIGHT, 2009). Além disso, o processo apresenta um efeito positivo secundário ou indireto da terapia, pois essa é capaz de promover estímulos adicionais da microcirculação e trofismo celular (ONISZCZUK et al., 2016).

A terapia fotodinâmica antibacteriana tem demonstrado resultados positivos nas pesquisas *in vitro*, a sua utilização se mostra viável, possível, no tratamento de patologias orais não havendo riscos de pigmentar dentes, tecidos moles, melhorando prognósticos, reduzindo tempo clínico e as perdas dentárias, devolvendo a saúde ao paciente sem ampliar os riscos de selecionar ou produzir cepas bacterianas mais virulentas. (SAMPAIO,2018).

7. CONCLUSÃO

A concentração inibitória média do composto fenotiazínico DMMB em relação a cultura do biofilme do *E. faecalis* em sessenta dias foi de 689,9 ng/mL.

O protocolo 1 apresentou 90% e o protocolo 2 apresentou 90,3% de eficácia na inibição da cultura do biofilme intrarradicular do *E. faecalis*.

É necessário que novos materiais possam ser utilizados, testados, na confecção das fibras de transporte da luz laser, a fim de melhorar a eficiência energética da terapia ao longo do canal radicular, diminuindo o tempo de aplicação clínica dos protocolos terapêuticos.

A TFDa é eficaz quando atua sobre o biofilme bacteriano no canal radicular, quando exposta a condições severas, atuando fora dos padrões clínicos clássicos, mesmo preservando a integridade do seu biofilme bacteriano do *E. faecalis*, e demonstrou que pode ser aplicada com segurança em futuros protocolos clínicos *in vivo* na odontologia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL,R.R.; et al. Terapia fotodinâmica na endodontia - revisão de literatura. **RFO**, Passo Fundo, v. 15, n.2,207-211, maio/ago, 2010.

AKAO, R.T. Terapia fotodinâmica - Um recurso terapêutico na clínica endodôntica. **Monografia de especialização em Endodontia**, Santo André, 2013.

BACELLAR,I.O.L.;PAVANNI,C.;SALES,E.M;ITRI,R.;WAINWRIGHT,M.;BAPTISTA,M. S. Membrane Damage Efficiency of Phenothiazinium Photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**,2014.

BHATTI, M. et al. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethalphotosensitization of Porphyromonas gingivalis in vitro. **Photochem Photobiol**,Lawrence,Jun. v.65, n.6,1026- 31,1997.

CHAI, Y.; CHU, F.; KOLTER, R.; LOSICK, R. Bistability and biofilm formation in Bacillus subtilis. **Mol. Microbiol.** 67:254-263,2007.

CORRÊA, A.A.;FUENTEFRÍA,D.B.;CORÇÃO,G. Resistência a antimicrobianos em enterococos isolados de amostras de fezes de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, 33(2): 155- 159,2005.

DAI, T.; TEGOS, G.P.; ZHIYENTAYEV, T.; MYLONAKIS, E.; HAMBLIN,M.R. Photodynamic therapy for methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in a mouse skin abrasion model. **Lasers Surg Med** 42(1):38, 2010.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol** 17(3):245–254, 2011.

DONELLI, G.; GUAGLIANONE, E. Emerging role of Enterococcus spp. in catheter related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. **J. Vasc.** 5:3- 9,2004.

DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low- power laser. **Arch Oral Biol.** Nov;37(11):883-7, 1992.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **Int J Food Microbiol** 47, 1–24, 1999.

GENOVESE, W. J. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em Odontologia. São Paulo: **Lovise**; 2000.

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, K.P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.** 31:867-72, 2005.

GIUSTI, J.S.M.; SANTOS-PINTO, L.; PIZZOLITO, A.C.; HELMERSON, K.; CARVALHO-FILHO, E.; KURACHI, C.; et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. **Photomedicine Laser Surg.** 26(4):281-7, 2008.

HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci** 3:436–50, 2004

HECHT, E. **Óptica 2a Ed.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE J Quant Electr** QE- 23, v.10, p.1703-1717, 1987.

LONGO, F.P.J.; et al. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Rev. Clín. Pesq. Odontol.**, Curitiba.set./dez., v. 6 (3):249-257, 2010.

MACROBERT, A.J.; et al. What are the ideal properties of a photosensitizer? In: Photosensitizing Compounds: their chemistry, biology and clinical use. **Chichester: Wiley**, 4- 16, 1989.

MALIK, Z.; et al. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, May, v.5, n.3-4, 281-93, 1990.

MAROTTI, J., PIGOZZO M.N., NAKAMAE, A.E.M.; TORTAMANO, N. P.; LAGANÁ,

D.C.; CAMPOS, T.N.; Terapia fotodinâmica no tratamento da peri-implantite. **Rev ImplantNews**, 5;4;401-5,2008.

O'RIORDAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T. The potencial for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2:247-262,2005.

PINHEIRO, A.L.B.; BRUGNERA JR, A.; ZANIN, F.A.A. **Aplicação do Laser na Odontologia**. São Paulo:Santos, cap.1,3-15.2010

PARADELLA, T.C.; et al. Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**; 36(2): 163-68,2007.

SAMPAIO, F.J.P. **Eficácia da Terapia Fotodinâmica Antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* Utilizando Derivados Fenotiazínicos Associados ao Laser e Led Vermelhos**, Tese Doutorado em Biotecnologia em Saúde (Universidade Federal da Bahia-RENORBIO), Instituto de Ciências da Saúde,Salvador: Bahia,46-52,2018.

SANTOS,N.F.; **Relação entre estresse oxidativo e fotoinduzido e morte celular autofágica**, Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímica (Universidade de São Paulo),São Paulo:SP,2014.

SCHASTAK, S.; ZIGANSHYNA, S.; GITTER, B.; WIEDEMANN, P.; CLAUDEPIERRE, T. Efficient photodynamic therapy against gram-positive and gram-negative bacteria using THPTS, a cationic photosensitizer excited by infrared wavelength. **PloS one** 5(7): e11674 1-8, 2010.

SCHLEIFER,K.K.; KILPPER-BALZ ,R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, Jan, V34, N1, 31-34,1984.

SILVA, E.F.; SERPA, C.; DABROWSKI, J.M.; et al. Mechanisms of singlet-oxygen and superoxide-ion generation by porphyrins and bacteriochlorins and their implications in photodynamic therapy. *Chemistry*, 16:9273–86,2010.

SIQUEIRA, J.F. JR.; RÔÇAS, I.N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** ;97:85–94,2004.

SPIKES, J.D.; JORI, G. Photodynamic Therapy of Tumours and Others Diseases Using Porphyrins. **Lasers Med Sci**, Sidcup Kent, v.2,3-15,1987.

TARASZKIEWICZ,A, FILA.G.; GRINHOLC,M., AND NAKONIECZNA, J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **Biomed. Res. Int.** : 150653. doi: 10.1155/2013/150653,2013.

TARDIVO, J.P.; DEL GIGLIO, A.; DE OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.;JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagn Photodyn Ther.** 2(3):175- 91,2005.

TUNER, J.; HODE, L.**Laser Therapy - Handbook**. Sweeden: Prima,140,589,2004.

USACHEVA, M.; TEICHERT, M.; BIEL, M. The interaction of lipo- polysaccharides with phenothiazine dyes. **Lasers Surg Med.**; 33(5):311-9,2003.

WAINWRIGHT,M.;PHOENIX,D.A.;RICE,L.;BURROW,S.M.;WARING,J.J.Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blueseries via chromophore methylation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biological**,40,233-239,1997.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT). **Antimicrob Chemother.** v.42, n.1, p.13-28,1998.

WANG,L.; et al. **Journal of Endodontics**,31,631-636,2011.

WILSON, M. et al. Sensitization of Streptococcus sanguinis to Killing by Low-Power Laser Light. **Lasers Med Sci**, Sidcup Kent, v.8, 69-73,1993.

ZANIN, I.C.J.; BRUGNERA JUNIOR, A. Terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal. **Rev Perionews**; 1(1):79-85,2007.

ZHANG, C.; DU, J.; PENG, Z. Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared whit Primary Intraradicular Infection: A

Systematic Review. **J Endod.** 2015 Aug;41(8):1207-13. doi:
10.1016/j.joen.2015.04.008. Epub 2015 May 23. PMID: 26015157.

