



UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



MATHEUS FRANCO DA FROTA

**Terapia fotodinâmica em dentes contaminados
com *Enterococcus faecalis* utilizando a curcumina
como fotossensibilizador.**

Araraquara

2013



MATHEUS FRANCO DA FROTA



**Terapia fotodinâmica em dentes contaminados
com *Enterococcus faecalis* utilizando a curcumina
como fotossensibilizador.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz C. V. Berbert

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2013

Frota, Matheus Franco da.

Terapia fotodinâmica em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* utilizando a curcumina como fotossensibilizador / Matheus Franco da Frota. – Araraquara: [s.n.], 2013.

60 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert.

Co-orientador: Profª. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru.

1. Endodontia 2. *Enterococcus faecalis* 3. Fotoquimioterapia 4. Curcumina. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, CRB-8/4612, Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

MATHEUS FRANCO DA FROTA

**TERAPIA FOTODINÂMICA EM DENTES CONTAMINADOS COM
ENTEROCOCCUS FAECALIS UTILIZANDO A CURCUMINA COMO
FOTOSENSIBILIZADOR.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

2º Examinador: Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho

3º Examinador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

Araraquara, 01 de Março de 2013.

DADOS CURRICULARES

MATHEUS FRANCO DA FROTA

NASCIMENTO	18.10.1988 – Ponta Porã-MS
FILIAÇÃO	Antônio César da Frota Nímia Eloisa Franco
2006 – 2010	Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP).
2009 – 2009	Curso de Capacitação em Endodontia na Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia (FAEPO).
2011 – 2012	Curso de Especialização em Endodontia na Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas – regional de Araraquara.
2011 – 2013	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Endodontia, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOAr/UNESP)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Nímia Eloisa Franco** e **Antônio César da Frota** que, apesar de todas as dificuldades, sempre me apoiaram incondicionalmente para a realização do meu mestrado. Muito Obrigado, se hoje sou formado e pós-graduado devo em grande parte a vocês. Vocês são meus exemplos de caráter e honestidade. Amo muito vocês!

Ao meu irmão e companheiro de profissão, **André Augusto Franco Marques**, por toda a amizade e palavras de incentivo na grande Arte da Endodontia. Tenho certeza que temos muito a conquistar.

Ao meu irmão **Fabício Franco Marques**, por todo o carinho e amizade durante todos esses anos, sempre me apoiando na escolha da minha profissão. Pode ter certeza que você foi muito importante para mim, principalmente em meu ensino médio. Hoje sou graduado e pós-graduado em uma das melhores Faculdades do Brasil.

À minha avó, **Jacira Pissini**, que foi muito importante durante minha alfabetização. Muito obrigado por me ajudar e me passar todos os ensinamentos desde criança.

Ao meu avô, **Ramón Franco (*in memorian*)**. Aquele menino, que você tinha tanto orgulho, hoje recebe o título de Mestre. Eu lamento muito por você não estar presente entre nós, mas sei que estará orgulhoso onde quer que esteja.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert por possibilitar a realização deste estudo. Agradeço pela confiança depositada em mim e pela paciência em me ajudar a desenvolver esta dissertação.

À minha co-orientadora Profa Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru por me ajudar na realização da parte experimental deste estudo. Obrigado pelos ensinamentos nestes dois anos de mestrado.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa de sua diretora Profa. Dra. Andréia Affonso Barreto Montandon e vice-diretora Profa. Dra. Elaine Maria Sgaviolli Massucato.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert e vice-chefe Edson Alves de Campos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, coordenado pelo Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho. Agradeço o conhecimento passado para mim e a ajuda para o desenvolvimento deste trabalho. Você é um exemplo de pesquisador a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho pelo conhecimento passado a mim durante meus quatro anos na Endodontia, desde a iniciação científica até os trabalhos paralelos desenvolvidos durante o curso de Mestrado.

Aos demais professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Profa. Dra. Gisele Faria, Prof. Dr. Renato Toledo Leonardo.

Aos colegas de Pós-Graduação (Nível Mestrado), Camila Espir, Camila Nascimento, Letícia, Gissele, Natália, Tiago, Adinael, Ana Carolina, Kátia, Fernando e Miriam.

Aos colegas de Pós-Graduação (Nível Doutorado), Adriana, Alana, Ana Livia, Carol, Érica, Guilherme, Paula, Raqueli, Roberta e Rodrigo. Obrigado pela amizade durante o curso de Mestrado, sentirei falta de cada um, dos nossos programas gastronômicos. Mostraram que a soma é mais importante que a divisão.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara pela atenção e educação.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP pela ajuda e atenção sempre que precisei.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP pela ajuda na organização desta dissertação.

Ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP), em especial, ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e equipe, por produzirem o LED usado no estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de Mestrado. O apoio financeiro concedido foi fundamental para a realização deste curso.

À todos os meus amigos que estão presentes em minha vida até hoje. Podem ter certeza que tem uma parcela muito importante na conquista deste título.

A todos os familiares por todo apoio e carinho dado a mim durante toda a minha vida.

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”*

Anatole France (1844-1924)
Escritor francês, Nobel de Literatura de 1921.

RESUMO

Frota MF. Terapia fotodinâmica em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* utilizando a curcumina como fotossensibilizador [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

RESUMO

O estudo avaliou a eficácia antibacteriana da terapia fotodinâmica (TFD) em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*, utilizando o LED como fonte de luz e a curcumina como agente fotossensibilizador (FS) em diferentes tempos de irradiação. Oitenta raízes de dentes humanos unirradiculados foram fixados em placas de 24 poços. Todos os espécimes foram submetidos ao preparo biomecânico utilizando o sistema Protaper Universal® (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) na sequência técnica preconizada pelo fabricante até o instrumento F4, sendo, a seguir, esterilizados e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos e sub-grupos (n=10): GIa: TFD (curcumina com 5 minutos de pré-irradiação + 5 minutos de irradiação); GIb: TFD (Curcumina com 5 minutos de pré-irradiação + 10 minutos de irradiação); GIIa: Curcumina com 5 minutos de pré-irradiação + 5 minutos sem irradiação; GIIb: Curcumina 5 minutos + 10 minutos sem irradiação; GIIIa: Soro fisiológico + Luz por 5 minutos; GIIIb: Soro fisiológico + luz 10 minutos; Grupos controle positivo e negativo. As coletas deram-se aos 21 dias da contaminação, pós- tratamento e 7 dias pós-tratamento. Os dados obtidos (UFC/mL) foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram redução bacteriana nos grupos GIa e GIb de forma significativa em relação aos demais grupos no pós tratamento e, aos 7 dias, somente em relação ao GIIIa (P<0,05). A TFD não foi eficaz na eliminação de *E. faecalis* dos canais radiculares. O tempo de irradiação de 10 minutos foi irrelevante em relação ao efeito da TFD.

Palavras-chave: Endodontia; *Enterococcus faecalis*; Fotoquimioterapia; curcumina.

ABSTRACT

Frota MF. Photodynamic therapy on teeth contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

ABSTRACT

The study evaluated the antibacterial efficacy of photodynamic therapy (PDT) in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*, using LED as light source and curcumin as photosensitizer agent (FS) at different irradiation times. Eighty single-rooted and single-canal human extracted teeth were selected for this study that were fixed in 24 well plates and contaminated by suspensions of *E. faecalis* for 21 days. All specimens were subjected to biomechanical preparation using Protaper Universal[®] (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) system following the technique recommended by the manufacturer to the F4 instrument, and, then, sterilized and randomly divided into the following groups and sub-groups (n = 10): GIa: PDT (curcumin with 5 minutes of pre-irradiation time + 5 min of irradiation); GIb: PDT (curcumin with 5 minutes of pre-irradiation + 10 min irradiation); GIIA: 5 minutes with curcumin pre-irradiation + 5 minutes without irradiation; GIIB: Curcumin 5 minutes + 10 minutes without irradiation; GIIIa: saline + light for 5 minutes; GIIIb: saline + light 10 minutes; positive and negative control groups. The collected times of samples were after 21 days of infection, post-treatment and 7 days after treatment. The data (CFU mL⁻¹) were submitted to ANOVA and Tukey test. Results showed bacterial reduction only in the group GIa and GIb significantly in relation to other groups in post-treatment (P <0.05). PDT was not effective in eliminating *E. faecalis* from root canals. The irradiation time of 10 minutes did not improve the effect of PDT.

Key-words: Endodontics, *Enterococcus faecalis*, photodynamic therapy, curcumin

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
PROPOSIÇÃO.....	22
CAPÍTULO 1.....	24
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICES.....	57

INTRODUÇÃO

INTRIODUÇÃO

Em casos de necrose pulpar, a finalidade do tratamento endodôntico é eliminar a contaminação bacteriana do sistema de canais radiculares e permitir a reparação periapical⁴⁵. O sucesso deste tratamento depende de uma série de procedimentos que estão intimamente relacionados, partindo da fase de acesso cirúrgico o qual permite que o instrumento alcance as paredes do canal radicular, passando pela fase de sua modelagem e sanificação, e culminando com a obturação do mesmo, de modo que promova adequado vedamento do sistema de canais radiculares³⁵.

Enquanto o debridamento mecânico, juntamente com a irrigação química remove parte do aglomerado bacteriano, a contaminação bacteriana residual permanece em aproximadamente um quarto no sistema de canais radiculares após o preparo biomecânico⁷. É amplamente conhecido que esta contaminação residual em canais radiculares é um dos principais motivos do fracasso do tratamento endodôntico²⁰. Problemas operatórios como inadequada instrumentação ou restauração inadequada também contribuem para o insucesso do tratamento endodôntico⁵⁰. Além disso, a complexidade anatômica interna do sistema de canais radiculares torna a completa remoção bacteriana praticamente impossível mesmo quando o preparo biomecânico é realizado com os mais elevados padrões técnicos⁴⁴.

Dentre as bactérias residuais citadas, destacamos o *Enterococcus faecalis*. Este representa um importante agente patogênico no insucesso da terapia endodôntica. Conforme Kayaoglu²⁶ (2004), além de se organizarem em biofilme, estes micro-organismos possuem diversos fatores de virulência, como, por exemplo, a produção de superóxidos, enzimas líticas, substâncias agregadoras, adesinas de superfície, entre outros. Estes são frequentemente encontrados em reações periapicais crônicas que, apesar de serem gram-positivos facultativos, fazem parte da microbiota inicial que posteriormente será dominada por bactérias gram-negativas^{33,30}.

Segundo Leonardo²⁸ (2008), o preparo biomecânico representa uma das mais importantes fases da terapia endodôntica, englobando meios químicos (soluções irrigadoras), físicos (irrigação e aspiração) e mecânicos

(instrumentação). Entretanto, sabemos que por si só, o preparo biomecânico não é capaz de eliminar completamente a contaminação residual. Assim, o modo de ação e eficácia de uma ampla variedade de soluções irrigadoras como hipoclorito de sódio, clorexidina, EDTA, peróxido de hidrogênio, halogênios e ozônio têm sido estudados^{5,34} assim como diversas técnicas de irrigação endodôntica². Além destas soluções irrigadoras, novos procedimentos para otimizar a desinfecção do sistema de canais radiculares vêm sendo estudados, dentre eles o uso de LASER de baixa intensidade ou de um diodo emissor de luz (LED) na terapia fotodinâmica^{6,15,41}.

Com a finalidade de otimizar a eliminação bacteriana, evitando assim as bactérias residuais, há uma técnica que vem sendo utilizada, denominada Terapia Fotodinâmica (TFD) originada do termo em inglês Photodynamic Therapy (PDT). O conceito desta terapia foi introduzido por Oscar Raab, em 1900. Três anos depois, em 1903, Von Tappeiner e Albert Jesionek avaliaram o tratamento de carcinomas pela aplicação de eosina a 5% em solução aquosa e exposição à luz branca ou à luz solar⁵¹. Assim, estes autores sugeriram o termo *Photodynamische Wirkung* (Efeito fotodinâmico) a todas as reações fotobiológicas envolve a aplicação da luz sobre um corante ocorrendo a geração de radicais livres e conseqüentemente à morte celular.

A era moderna da terapia fotodinâmica iniciou-se na década de 60 com os estudos de Lipson, Olsen apud Ackroyd et al.¹ em 1964, os quais mostraram haver fluorescência em lesões neoplásicas pela injeção de hematoporfirina, proporcionando melhor observação das lesões durante as cirurgias⁵¹. A partir daí, iniciaram-se diversos estudos para entender a eficácia e os mecanismos destes processos.

Esta terapia é baseada no uso de uma fonte de luz e de uma substância fotossensibilizadora. A fonte de luz utilizada pode ser um LASER (abreviação de Light Amplified by Stimulated Emission Radiation) ou um diodo emissor de luz (LED). A literatura descreve o emprego de diferentes sistemas de *LASERS*, com potências altas e baixas⁵⁶. O LASER é a principal fonte de luz utilizada para ativar os fotossensibilizadores²¹ na terapia fotodinâmica (TFD).

O LASER começou a ser utilizado comercialmente em 1960, e suas diversas indicações estimularam à realização de um número crescente de estudos. A utilização do LASER e outras fontes de luz nas áreas da saúde

baseiam-se em uma grande variedade de fenômenos associados pela interação da luz com tecidos biológicos³.

Diversos estudos vem sendo realizados utilizando o principio da terapia fotodinâmica aplicada no combate a células tumorais e para inativar micro-organismos. Basicamente, a terapia fotodinâmica envolve o uso de um agente fotossensibilizador com afinidade por células malignas, fungos ou bactérias, de uma fonte de luz para excitação e a presença de oxigênio. As moléculas do fotossensibilizador são ativadas pela luz e começa um processo de troca de energia com as moléculas de oxigênio, produzindo oxigênio altamente reativo: o oxigênio singleto³⁶. Esta espécie reativa promove oxidação de forma rápida e eficaz de quase todos os substratos biológicos próximos ao seu local de formação.

Em 1976, Weishaupt et al.³⁶ avaliaram que o oxigênio singleto é o principal agente citotóxico responsável pela morte do micro-organismo. Em resumo, o fotossensibilizador absorve a luz proveniente da fonte emissora de luz, saindo de seu estado fundamental e alcançando o estado excitado, emitindo elétrons que reagem com o oxigênio formando as espécies reativas de oxigênio. O oxigênio singleto altamente reativo inicia uma série de reações oxidativas em um ambiente fechado, como a parede celular bacteriana, membrana lipídica, enzimas ou ácidos nucléicos.

É um processo rápido e seguro de matar células. Na presença do oxigênio singleto ou mesmo de outras espécies reativas de oxigênio produzidas pela excitação do fotossensibilizador, promove eficiente redução microbiana²⁷.

Uma importante vantagem desta técnica que deve ser ressaltada é o fato de poder ser aplicada inúmeras vezes, sem qualquer tipo de efeito colateral. Isto evita reações sistêmicas a certos tipos de drogas. Em muitos casos em que é necessário uma ação local e rápido controle de micro-organismos, a terapia fotodinâmica parece ser bastante adequada. E finalmente, está o custo final deste tratamento, pois com o desenvolvimento de fotossensibilizadores e fontes de luz de baixo custo econômico, a terapia fotodinâmica passou a ser algo economicamente viável⁵¹.

Na década de 90, iniciou-se o desenvolvimento dos diodos emissores de luz (LEDs). Os LEDs funcionam por um processo diferente da emissão de luz comum. Em um material semiconductor devidamente preparado, a passagem da

corrente elétrica produz a recombinação de elétrons, e nesta recombinação ocorre a emissão de luz. Os LEDs são convenientes de serem utilizados e têm um tempo útil de vida muito longo. O uso do LED como fonte de luz na terapia fotodinâmica tem sido discutido em estudos recentes¹⁹ e, quando comparados aos sistemas de LASERs disponíveis, os LEDs apresentam vantagens como menor custo, são portáteis, consomem pouca energia elétrica e ainda possuem um tempo de vida maior.

Em 2009, Haukvik²¹ utilizou um LED para realizar a terapia fotodinâmica em biofilmes mono espécies de *E. faecalis* e *Streptococcus intermedius*. O estudo mostrou haver redução bacteriana significativa do fotossensibilizador utilizado associado à luz LED. Um ano depois, Hegge et al.²² também avaliaram o efeito do LED como fonte de luz para a terapia fotodinâmica em biofilmes de *Escherichia coli* utilizando a curcumina como fotossensibilizador. O estudo mostrou que a terapia fotodinâmica com LED reduziu cerca de 81% o número de bactérias.

Os fotossensibilizadores são imprescindíveis quando nos referimos à terapia fotodinâmica. No processo de fotossensibilização, a aplicação somente da luz ou, normalmente, apenas do fotossensibilizador não é tóxica, uma vez que o oxigênio não pode ser excitado diretamente pela luz, tornando o processo dependente da intermediação do fotossensibilizador³. De forma geral, os mecanismos que promovem a fotoinativação dos vários tipos de células microbianas são similares. No entanto, a susceptibilidade dos diferentes microorganismos à terapia fotodinâmica pode variar. As bactérias gram-positivas como, por exemplo, o *E. faecalis*, são mais susceptíveis à terapia fotodinâmica quando comparadas às bactérias gram-negativas¹⁸. Esse comportamento é atribuído às diferenças estruturais na parede celular, uma vez que as bactérias gram-negativas apresentam uma parede celular mais complexa que as bactérias gram-positivas.

Na seleção do agente fotossensibilizador, deve ser considerada sua capacidade de absorver a luz no comprimento de onda utilizado na irradiação, seu potencial em produzir espécies reativas e sua seletividade às células microbianas, de modo que não haja efeitos deletérios ao tecido adjacente durante a irradiação²¹. Para a realização da terapia fotodinâmica antibacteriana, as concentrações dos agentes fotossensibilizadores utilizados

são consideradas baixas, não promovendo efeito citotóxico ao hospedeiro. Os agentes fotossensibilizadores podem ser de origem natural ou sintética. A hematoporfirina foi um dos primeiros fotossensibilizadores naturais a serem descobertos, no início da década de 50. A hematoporfirina foi capaz de acumular-se em tumores (células displásicas), os quais foram implantados em ratos e camundongos, e, quando sensibilizada pela luz, promovia a regressão da doença¹. Com o resultado desses estudos, na década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher portadora de câncer de mama com a utilização de hematoporfirina, irradiando a luz seletivamente no tumor, marcando o início da terapia fotodinâmica e dos estudos de diferentes fotossensibilizadores⁵¹.

Como exemplo de fotossensibilizadores naturais, podemos citar as hematoporfirinas, que são derivadas de componentes do sangue, e a curcumina, derivada de um corante alimentar natural conhecido como curcuma. Outros corantes, como o azul de metileno e o azul de toluidina, são alguns exemplos de fotossensibilizadores de origem sintética que podem ser utilizados para a terapia fotodinâmica²¹.

O local de ação do fotossensibilizador na bactéria pode variar de acordo com a morfologia da espécie microbiana e com o tempo pré-irradiação. Um agente fotossensibilizador incorporado lentamente ao micro-organismo pode causar dano na parede celular após a exposição de luz, enquanto um tempo maior de exposição do agente fotossensibilizador ao micro-organismo (tempo pré-irradiação) pode resultar num efeito diferente, como a ruptura de ácidos nucleicos¹¹. A terapia fotodinâmica pode alterar vários sítios e organelas celulares, dependendo da distribuição do fotossensibilizador utilizado. O nível de alteração em cada sítio depende da concentração do fotossensibilizador, o qual varia de acordo, também, com a natureza do transporte da membrana e com o metabolismo celular⁴⁰. Upadya, Kishen⁵², em 2010, avaliaram, através da microscopia eletrônica de varredura, a interação do fotossensibilizador com a bactéria *E. faecalis*. Estes mostraram que, em tempos superiores a 5 minutos de exposição do micro-organismo ao corante, já seria suficiente para o mesmo aglomerar nas paredes bacterianas e invadir o citoplasma bacteriano ligando-se a organelas como a mitocôndria e ácidos nucleicos.

Em 2008, Rios et al.³⁹ avaliaram a terapia fotodinâmica com o LED em canais radiculares contaminados com *E. faecalis* utilizando como agente fotossensibilizador o azul de toluidina. O estudo mostrou que a terapia fotodinâmica reduziu em 90% a contaminação do canal radicular em comparação ao grupo Controle. Este resultado aproximou-se do resultado apresentado por Fonseca et al.¹⁵ (2008), que utilizaram um laser de baixa intensidade e o azul de toluidina contra *E. faecalis* em canais radiculares contaminados. A redução na viabilidade bacteriana foi de 99,9% após a terapia fotodinâmica.

A curcumina é um agente fotossensibilizador de origem natural composto de coloração amarelada conseguida por meio da extração do rizoma da planta *Curcuma longa L* (açafrão) e atualmente vem sendo estudada na terapia fotodinâmica para combate de células displásicas^{8,9,23,55} e como agente antifúngico e antibacteriano²¹. Este corante tem mostrado ser atóxico a uma série de culturas de células, além de mostrar-se bactericida em concentrações muito elevadas e, quando submetida à terapia fotodinâmica, apresentar potentes efeitos citotóxicos em concentrações micromolares. Também apresenta afinidade por bactérias gram-positivas mostrando maior efetividade na eliminação destas bactérias, quando comparadas às bactérias gram-negativas⁴⁰.

Além da escolha da substância a ser utilizada como agente fotossensibilizador, outro fator de relevância para o sucesso da terapia fotodinâmica é a concentração do mesmo. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, a concentração escolhida não deve produzir danos ao tecido alvo sem a ativação pela luz. As concentrações utilizadas variam de um fotossensibilizador para outro, de acordo com as características químicas de cada composto e de sua toxicidade. As concentrações típicas utilizadas na terapia fotodinâmica, independente do fotossensibilizador, são da ordem de μM ou $\mu\text{g/mL}$ ^{23,55}. A interação do agente fotossensibilizador com o micro-organismo também é outro ponto crítico para o sucesso da terapia, uma vez que, se o fotossensibilizador não estiver interagindo com o micro-organismo, sua ativação pela fonte de energia resultará na formação de radicais livres sem a atuação na bactéria^{47,48}. O tempo pré-irradiação, o qual compreende o tempo entre a colocação do agente fotossensibilizador na área de interesse e sua

ativação pela fonte de luz, varia de acordo com a interação desejada. Os tempos de pré-irradiação utilizados na terapia fotodinâmica antimicrobiana vão de um a dez minutos¹⁴.

Em estudo recente de Dovigo et al.¹³ (2011), foi avaliada a ação da curcumina como agente fotossensibilizador em diversas concentrações e um LED como fonte de luz. O experimento foi realizado em biofilmes de *Candida albicans* com tempo pré-irradiação de 20 minutos. Os resultados mostraram haver redução de 86% na viabilidade destes fungos após a terapia fotodinâmica. Estes resultados foram semelhantes aos mostrados por Martins et al.³¹ (2011) e Pinto et al.³⁷ (2011) os quais avaliaram a terapia fotodinâmica em biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Candida dubliniensis*, respectivamente, utilizando também um LED como fonte de luz. Os resultados mostraram haver redução de 99% na viabilidade bacteriana e de 90% na viabilidade fúngica também utilizando a solução de curcumina em concentração de 20 µM.

Na Endodontia, há escassez de trabalhos mostrando a eficácia da terapia fotodinâmica em canais radiculares quando utilizada a curcumina como agente fotossensibilizador e o LED, como dispositivo emissor de luz.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a atividade antibacteriana promovida pela terapia fotodinâmica com LED em canais radiculares contaminados com *E. faecalis* utilizando uma solução de curcumina na concentração de 20 μM como agente fotossensibilizador;
- Avaliar o efeito de 5 e 10 minutos como tempos de irradiação com um LED na eficácia da terapia fotodinâmica.

CAPÍTULO 1

*Artigo escrito segundo as normas do periódico *International Endodontic Journal*.

Terapia fotodinâmica em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* utilizando a curcumina como fotossensibilizador.

M. F. Da Frota¹, J. M. Guerreiro-Tanomaru¹, M. Tanomaru-Filho¹, V. S. Bagnato², F. L. C. Berbert¹.

¹Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; ²Departamento de Ótica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Objetivos: Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* empregando o LED como fonte de luz e a solução de curcumina como fotossensibilizador em diferentes tempos de irradiação. **Metodologia:** Neste estudo, foram selecionadas 80 raízes de dentes humanos unirradiculados cujos canais radiculares foram submetidos ao preparo biomecânico utilizando o sistema rotatório Protaper Universal (Dentsply-Maillefer). As amostras receberam a contaminação de suspensão de *Enterococcus faecalis* por 21 dias. A terapia fotodinâmica (TFD) foi realizada com luz LED e a solução de curcumina como fotossensibilizador (FS). Os grupos foram os seguintes (n=10): GIa, que recebeu a TFD (Curcumina com 5 minutos de pré-irradiação + 5 minutos de irradiação); GIb, TFD (Curcumina com 5 minutos de pré-irradiação + 10 minutos de irradiação); GIIa (Curcumina com 5 minutos de pré-irradiação + 5 minutos sem irradiação); GIIb, (Curcumina com 5 minutos de pré-irradiação + 10 minutos de irradiação); GIIIa, recebeu a adição de soro fisiológico e irradiação por 5 minutos e GIIIb, com soro fisiológico e luz por 10 minutos; Grupos controle positivo e negativo. As coletas deram-se inicialmente aos 21 dias após o início da contaminação, imediatamente após o tratamento das amostras e 7 dias após o tratamento. As coletas foram agitadas, diluídas seriadamente e semeadas em placas de petri com meio Tryptic Soy agar sendo, após 48 horas, submetidas à contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL⁻¹). Os dados foram transformados em log₁₀ e submetidos aos testes estatísticos de ANOVA e comparação múltipla de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados: Na coleta imediata pós-tratamento, os grupos Gla e Glb mostraram haver redução bacteriana significativa em relação aos grupos GIIa, GIIb, GIIIa, GIIIb e controle positivo ($P < 0,05$). No pós-tratamento de 7 dias, o grupo Gla mostrou redução bacteriana significativa somente em relação ao grupo GIIIa ($P < 0,05$).

Conclusão: A TFD, empregando a luz LED e a solução de curcumina como FS, não foi eficaz na eliminação de *Enterococcus faecalis*. O efeito do tempo de irradiação foi irrelevante na eficácia da TFD para uso endodôntico.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; *Enterococcus faecalis*; LED; curcumina.

INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende da erradicação da microbiota presente no sistema de canais radiculares. É bem estabelecido que a completa eliminação bacteriana seja praticamente impossível, tendo em vista a complexa anatomia interna do sistema de canais radiculares (Bystrom et al 1983; Bonsor et al 2006). Até mesmo após cuidadoso preparo biomecânico, utilizando soluções irrigadoras bactericidas, ainda ocorre a presença de dentina contaminada (Bahcall et al 2000, Sedgley et al 2004, Siqueira et al 2007).

Em relação à contaminação residual, devemos destacar o micro-organismo *Enterococcus faecalis*. Esta bactéria gram-positiva aeróbia facultativa corresponde à espécie encontrada com mais frequência quando associada aos casos de insucesso do tratamento endodôntico (Stuart et al 2006).

Novas técnicas para otimizar a desinfecção do sistema de canais radiculares após o preparo biomecânico, evitando a reinfecção e consequente insucesso do tratamento endodôntico, tem sido estudadas (Wainwright et al. 1998; Hambling et al. 2004). Estas técnicas baseiam-se no uso de uma fonte emissora de luz, podendo ser um LASER ou um LED de baixa potência, e de

uma substância fotossensibilizadora (FS), recebendo o nome de terapia fotodinâmica (TFD) (Wainwright et al 1998). Apesar do LASER ser a fonte de luz mais utilizada na TFD, o LED vem sendo utilizado com sucesso em diversos estudos (Giusti et al. 2008, Dovigo et al. 2011, Rios et al. 2011,) mostrando que também pode ser uma fonte de luz alternativa ao LASER, apresentando menor consumo de energia elétrica e tempo de vida maior.

A TFD usa a luz em um comprimento específico de onda, para ativar um corante (FS), que não deve ser tóxico, na presença de oxigênio. A transferência de energia do FS ativado para o oxigênio gera a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como, por exemplo, o oxigênio singleto e outros radicais livres, os quais podem eliminar os micro-organismos pelo dano causado em proteínas, membrana celular e organelas (Konopka et al 2007).

Como agente fotossensibilizador, o azul de metileno e o azul de toluidina são comumente utilizados em estudos na Endodontia. Outros corantes podem ser utilizados, como a curcumina. A curcumina é um agente fotossensibilizador de origem natural composto de coloração amarelada conseguida por meio da extração do rizoma da planta *Curcuma longa L* (açafrão) e atualmente vem sendo estudada na terapia fotodinâmica para combate de células displásicas Huang et al, 1988; Dahl et al, 1989; Chai et al, 2005) e como agente antifúngico e antibacteriano (Dovigo et al, 2011). Este corante tem mostrado ser atóxico a uma série de culturas de células, além de mostrar-se bactericida em concentrações muito elevadas e, quando submetida à terapia fotodinâmica, apresentar potentes efeitos citotóxicos em concentrações micromolares. Também apresenta afinidade por bactérias gram-positivas mostrando maior efetividade na eliminação destas bactérias, quando comparadas às bactérias gram-negativas.

Diversos estudos *in vivo* (Garcez et al 2008, Bonsor et al 2006) e *in vitro* (Soukos et al 2006, Williams et al 2006, Garcez et al 2007, Bargmans et al 2008, Fonseca et al 2008) tem mostrado que a TFD tem potencial em reduzir a contaminação residual do sistema de canais radiculares.

Em nosso estudo, avaliamos a eficácia da terapia fotodinâmica na eliminação de *E. faecalis* em canais radiculares contaminados aplicando diferentes tempos de irradiação.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e Padronização dos espécimes utilizados

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Foram utilizados 80 dentes humanos unirradiculados superiores extraídos, doados do banco de dentes humanos desta faculdade. Foram selecionados dentes com canais retos, sem obturação endodôntica, sem fratura, reabsorções internas ou externas. Após a seleção dos espécimes, estes tiveram as coroas seccionadas por máquina de precisão de corte Isomet 1000 (Buehler Ltda, Lake Bluff, IL, EUA), padronizando o comprimento dos mesmos em 15 mm. Todos os dentes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

O preparo biomecânico foi iniciado pela exploração do canal radicular com uma lima tipo K #10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) até que esta fosse visualizada no forame apical para, então, recuarmos 1 mm obtendo assim o comprimento real de trabalho (CRT). Os espécimes foram instrumentados utilizando o sistema rotatório Protaper Universal[®] (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) seguindo a sequencia técnica preconizada pelo fabricante: Sx,S1,S2,F1,F2,F3 e F4. A confecção do batente apical foi concluída com o instrumento F4, cujo diâmetro da ponta corresponde a 0,40 mm. A cada troca de instrumento foi realizada a irrigação, aspiração e inundação com hipoclorito de sódio a 2,5% por meio de pontas NaviTip[®] (Ultradent, South Jordan, UT, EUA) utilizando Kit de irrigação-aspiração Ultradent[®] (Ultradent, South Jordan, UT, EUA). Terminada a instrumentação, o canal foi inundado com EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) agitado por 3 minutos, sendo por fim irrigado com 5 mL de soro fisiológico. Os dentes

foram mantidos em soro fisiológico estéril com trocas diárias durante 5 dias para remoção de hipoclorito de sódio residual.

Após este período, todos os espécimes foram submetidos ao vedamento apical com resina composta fotopolimerizável Opallis[®] (FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e impermeabilizados externamente com uma camada de adesivo epóxi Araldite[®] (Brascola Ltda, Taboão da Serra, SP, Brasil), exceto na região cervical. Em seguida, os espécimes foram fixados verticalmente em microplacas de cultura celular por resina acrílica (Apêndice 1, Figura 1).

As placas de 24-poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) foram embaladas e submetidas à esterilização por óxido etileno pela empresa Acecil (Campinas, SP, Brasil).

Metodologia para formação de biofilme de *Enterococcus faecalis*

Nos grupos experimentais, a formação do biofilme foi realizada após os espécimes terem sido fixados e esterilizados como já descrito anteriormente. Estes foram inoculados pela aplicação da suspensão bacteriana pura de *E. faecalis* (ATCC 29212) em meio de cultura TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) até preencher completamente o canal radicular utilizando seringa descartável de 0,5mL (Becton Dickinson, Campinas, SP, Brasil). A cada 48 horas e durante 21 dias, o meio de cultura foi repostado nos espécimes para formação do biofilme. A cada reposição do meio de cultura, foi colocada uma bolinha de algodão estéril embebida em meio na entrada do canal radicular. Todas as microplacas foram mantidas fechadas em ambiente microaerófilo e em estufa a 37° C.

Distribuição dos grupos experimentais e sub-grupos.

Os espécimes fixados nas microplacas foram divididos aleatoriamente em três grupos (Grupo I, Grupo II e Grupo III) e sub-divididos em outros 2 sub-grupos [Sub-grupos I (a), I (b), II (a), II (b), III (a) e III(b)], além dos grupos Controle positivo e negativo. Em todos os grupos experimentais, os espécimes foram submetidos ao tempo pré-irradiação de 5 minutos antes do tratamento da amostra, seguindo as seguintes condições experimentais (n=10):

- Grupo Ia: Curcumina por 5 minutos (pré-irradiação) + Luz por 5 minutos;
- Grupo Ib : Curcumina por 5 minutos (pré-irradiação) + Luz por 10 minutos;
- Grupo IIa: Apenas a aplicação da curcumina por 10 minutos (5 minutos de pré-irradiação + 5 minutos);
- Grupo IIb: Apenas a aplicação da curcumina por 15 minutos (5 minutos de pré-irradiação + 10 minutos);
- Grupo IIIa: Soro fisiológico por 5 minutos(pré-irradiação) + luz por 5 minutos;
- Grupos IIIb: Soro fisiológico por 5 minuto (pré-irradiação) + luz por 10 minutos.

Grupos Controle

Foram separados dois grupos controle, um grupo Controle positivo e outro grupo Controle negativo. No Controle positivo (n=10), os espécimes receberam apenas a contaminação pela suspensão de *E. faecalis*. Já no Controle negativo (n=10), os espécimes receberam apenas meio de cultura estéril.

Metodologia de aplicação da luz

Uma lima tipo K #40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi introduzida até o comprimento de trabalho e realizada a irrigação com 5 mL de soro fisiológico e posterior aspiração do canal radicular. Estes procedimentos foram realizados para retirarmos o excesso de meio de cultura. Então, o canal

radicular era seco por três cones de papel absorvente #40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) para receber a solução de curcumina.

Com o LED acionado, a fibra ótica foi inserida dentro do canal radicular e realizados movimentos nos sentidos cervico-apicais e ápico-cervicais até o comprimento de trabalho, com frequência de aproximadamente 10 movimentos por minuto, pelo mesmo operador. A cada troca de espécime para irradiação da luz, a fibra ótica era descontaminada com álcool 70%.

Coletas e análise microbiológica

Em todos os grupos foram realizadas três coletas dos espécimes para avaliação microbiológica. A primeira coleta foi realizada antes do tratamento da amostra, a segunda coleta imediatamente após o tratamento da mesma e a terceira, 7 dias após a segunda coleta. As coletas foram realizadas utilizando dois cones de papel absorvente estéril #40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) após os canais radiculares terem sido previamente preenchidos com solução salina estéril. Este procedimento foi realizado nas três coletas. Os cones utilizados foram transferidos para tubos com 1 mL de solução salina estéril e agitados (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) durante 1 minuto, sendo, posteriormente, realizadas diluições decimais seriadas e semeadas em placas de petri com meio TSA (Difco, Detroit, MI, EUA) em triplicata. As placas foram incubadas em microaerofilia a 37° C durante 48 horas.

Após a segunda coleta, os canais radiculares foram preenchidos com soro fisiológico e mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente, com a finalidade de recuperação de bactérias provenientes dos túbulos dentinários.

Os resultados foram obtidos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL⁻¹).

Fonte emissora de luz, tempo pré-irradiação e agente fotossensibilizador.

Para a realização da terapia fotodinâmica, foi utilizado como recurso fotodinâmico um diodo emissor de luz (LED) produzido pelo Instituto de Física

de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP), o qual foi calibrado numa potência de saída de 100 mW/cm² com comprimento de onda de 450 nm, correspondendo à luz azul visível. Com o objetivo de permitir a difusão da luz por toda a extensão do canal radicular, foi acoplada ao dispositivo, uma fibra ótica de 50 mm de comprimento com diâmetro da ponta de 0,30 mm e conicidade de 0,02 mm/mm (Apêndice 1, Figura 2).

A fibra ótica foi introduzida dentro do canal radicular, com o LED acionado e sob movimentos helicoidais, tanto no sentido cervico-apical até o comprimento real de trabalho, como ápico-cervical, com uma frequência de aproximadamente 10 introduções/retiradas por minuto, sendo todos realizados por um mesmo operador (Apêndice 2, Figura 3)

Como agente fotossensibilizador, foi utilizada a curcumina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) em solução de DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) a 10% numa concentração de 20 µM e tempo pré-irradiação de 5 minutos em todos os espécimes.

Cultura de *Enterococcus faecalis*

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em ambiente asséptico, dentro da câmara de fluxo laminar. Culturas puras de *E. faecalis* foram reativadas em *Tryptic Soy Broth* – TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) por 48 horas. As bactérias foram inoculadas em placas de *Tryptic Soy Agar* – TSA (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas. Uma suspensão bacteriana foi preparada em solução fisiológica esterilizada, com concentração equivalente a 10⁸ bactérias/mililitro. O ajuste da densidade óptica da suspensão foi realizado em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm.

Análise estatística

Os dados obtidos da contagem das unidades formadoras de colônias foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 e analisados por meio do programa GraphPad Prisme 3.0 (San Diego, CA, EUA). Na

comparação entre os grupos experimentais, foram aplicados o teste de ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey com significância de 5%.

RESULTADOS

A contaminação das amostras deste estudo foi comprovada com a coleta inicial de todos os espécimes, 21 dias após inoculação, resultando em contagens de UFC mL⁻¹ semelhantes em todos os grupos, servindo de parâmetro comparativo com o resultado das coletas pós-tratamento e 7 dias após esta, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação entre grupos em uma mesma coleta: inicial, pós-tratamento e final (média e desvio-padrão de UFC mL⁻¹).

Grupos/Sub-grupos	Coleta inicial	Coleta pós-tratamento	Coleta final
Gla	6,16 ± 0,45 ^a	3,64 ± 0,18 ^a	4,23 ± 0,45 ^a
Glb	5,96 ± 0,03 ^a	4,34 ± 0,55 ^a	4,65 ± 0,43 ^a
GIIa	6,30 ± 0,22 ^a	5,14 ± 1,05 ^b	4,47 ± 0,75 ^a
GIIb	6,06 ± 0,15 ^a	4,76 ± 0,88 ^b	4,78 ± 0,18 ^a
GIIIa	6,02 ± 0,10 ^a	4,89 ± 0,78 ^b	5,01 ± 0,42 ^b
GIIIb	6,00 ± 0,09 ^a	5,22 ± 0,47 ^b	4,54 ± 0,32 ^a
Controle Positivo	5,98 ± 0,17 ^a	5,98 ± 0,17* ^b	4,60 ± 0,83 ^a

*Grupo controle positivo repetindo a média e desvio-padrão da coleta inicial, pois não houve a coleta pós-tratamento.

^{a,b} Letras diferentes em uma única coluna representam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

Na coleta realizada imediatamente após o tratamento das amostras, o grupo Gla, cujos espécimes receberam a terapia fotodinâmica com 5 minutos de irradiação da luz, apresentou maior redução microbiana (P<0,05) quando comparado aos Grupos GIIa (redução de 30%) e GIIb (24%), os quais

receberam apenas a aplicação da curcumina (5 e 10 minutos respectivamente), aos grupos GIIa (26%) e GIIb (31%) que receberam a aplicação de soro fisiológico e da luz nos tempos de 5 e 10 minutos, e também ao grupo Controle positivo.

A coleta final, realizada sete dias após o tratamento das amostras, mostrou haver a recontaminação do canal radicular, como mostrado na Figura 4. Na comparação entre coletas de um mesmo grupo em termos percentuais, o grupo GIa apresentou redução significativa entre a coleta inicial e a pós-tratamento, reduzindo a viabilidade bacteriana em aproximadamente 41%. Já a relação entre a coleta inicial e final, a redução bacteriana foi de 32%.

Já os outros grupos, não mostraram redução bacteriana significativa entre as coletas, mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação entre coletas nas coletas inicial, pós-tratamento e final (média e desvio-padrão de UFC mL⁻¹).

Coleta	GIa	GIb	GIIa	GIIb	GIIIa	GIIIb	Controle +
Inicial	6,16 ± 0,45 ^a	5,96 ± 0,03 ^a	6,30 ± 0,22 ^a	6,06 ± 0,15 ^a	6,02 ± 0,10 ^a	6,00 ± 0,09 ^a	5,98 ± 0,17 ^a
Pós-tratamento	3,64 ± 0,18 ^b	4,34 ± 0,55 ^a	5,14 ± 1,05 ^a	4,76 ± 0,88 ^a	4,89 ± 0,78 ^a	5,22 ± 0,47 ^a	-----
Final	4,23 ± 0,45 ^b	4,65 ± 0,43 ^a	4,47 ± 0,75 ^a	4,78 ± 0,18 ^a	5,01 ± 0,42 ^a	4,54 ± 0,32 ^a	4,60 ± 0,83 ^a

^{a,b} Letras diferentes em única coluna representam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

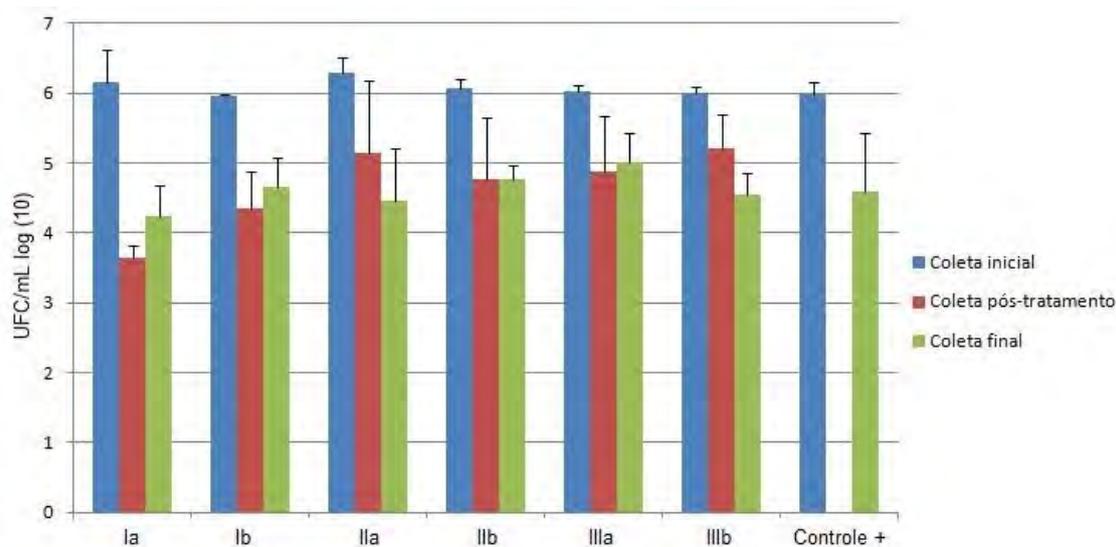


Figura 4 – Comparação entre as coletas inicial, pós-tratamento e final de cada grupo (média de UFC mL⁻¹ em log (10)).

DISCUSSÃO

Várias metodologias são empregadas para avaliar o efeito da terapia fotodinâmica nos micro-organismos. Há modelos experimentais que utilizam suspensões bacterianas mono ou multiespécies (Upadya et al 2010), discos ou blocos de dentina padronizados após a formação de biofilme bacteriano (Upadya et al 2010; Panhóca 2011) e pela contaminação de dentes humanos extraídos (Fonseca et al 2008; Souza et al 2010). Em nosso estudo, foi escolhida a contaminação de canais radiculares de dentes humanos unirradiculados extraídos, por suspensão pura de *Enterococcus faecalis*.

O micro-organismo *E. faecalis* está presente em diversos estudos devido a sua importância na Endodontia (Aranda-Garcia et al 2012, Delgado et al 2010, Garcez et al 2006, Wang et al 2012). O *E. faecalis* é encontrado na maioria de dentes com lesões periapicais relacionadas ao insucesso do tratamento endodôntico (Zhang et al 2012). O tempo de contaminação dos dentes utilizados foi de 21 dias, repondo meio de cultura a cada 2 dias para manutenção ideal do crescimento bacteriano, favorecendo a penetração bacteriana pelos túbulos dentinários, simulando um caso de um dente com lesão periapical em que há a completa contaminação do sistema de canais radiculares.

Antes da contaminação, os dentes foram submetidos ao preparo biomecânico com a irrigação por hipoclorito de sódio a 2,5%. A instrumentação, com o objetivo de padronizar o preparo, foi realizada com o sistema rotatório Protaper Universal (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) até o instrumento F4. Realizado o preparo biomecânico, todos os espécimes receberam como irrigação final a solução de EDTA trissódico a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) por 3 minutos, para completa remoção do *smear layer* e consequente penetração dos micro-organismos, em seguida os dentes foram mantidos em soro fisiológico esterilizado com trocas diárias durante 5 dias com a finalidade de remoção de hipoclorito de sódio residual.

A coleta microbiológica foi realizada em três tempos diferentes. Uma coleta inicial, antes do tratamento das amostras para verificação da contaminação dos espécimes; a segunda coleta imediatamente após o tratamento das amostras e a terceira 7 dias após o experimento para verificar se houve recontaminação dos espécimes e a redução bacteriana (Dametto et al. 2005, Menezes et al. 2004). O método da coleta foi realizado com a utilização de dois cones de papel absorvente de mesmo diâmetro do instrumento memória (#40) e transferidos para um *ependorf* contendo 1 mL de solução salina estéril para posterior semeadura das placas com TSa (Difco, Detroit, MI, EUA).

Para a realização da terapia fotodinâmica, é imprescindível o uso de uma fonte emissora de luz e um fotossensibilizador (FS). A fonte de luz utilizada foi um diodo emissor de luz (LED) elaborado pelo Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP). O comprimento de onda da luz desta fonte é de 450 nm correspondendo à luz azul visível. Tal comprimento de onda está relacionado diretamente à banda de absorção do corante utilizado em nosso trabalho, no caso, a curcumina. Este corante é sensibilizado especificamente por este comprimento de luz como mostrado em outros estudos (Hegge et al. 2011, Dujic et al. 2009, Martins et al. 2011).

Para que a luz atingisse toda a extensão do canal radicular, foi necessário acoplar ao LED uma fibra ótica, uma vez que apenas a difusão de luz na entrada do canal radicular não é suficiente para a eficácia da terapia fotodinâmica como mostrado por Garcez et al (2012). A aplicação da luz foi realizada introduzindo a fibra ótica já iluminada com movimentos helicoidais,

tanto no sentido cervico-apical como no sentido ápico-cervical até o comprimento de trabalho, sendo este movimento repetido numa frequência de aproximadamente 10 movimentos por minuto por um mesmo operador, como preconizado por Souza et al. (2010) e Garcez et al. (2012). Estes movimentos são necessários devido a irradiação da fibra ótica ocorrer apenas na ponta.

Como agente fotossensibilizador, utilizamos a solução de curcumina em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. O DMSO é um composto químico orgânico com elevada capacidade higroscópica decorrente da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água. Essa peculiaridade relaciona-se com várias propriedades da droga (Lima et al. 2006) e com sua capacidade solvente, sendo fundamental para a dissolução do pó de curcumina, além de permitir a estabilidade da solução, visto que esta é extremamente instável em temperatura ambiente, podendo influenciar no seu potencial de geração de radicais livres. Estes fatores foram demonstrados por Shen et al. (2005), os quais mostraram que o DMSO é um bom veículo para a curcumina, além de aumentar a produção de radicais livres após a sensibilização pela luz.

A curcumina é um composto orgânico obtido a partir da raiz da planta *Curcuma longa* a qual é muito usada em temperos (açafrão). A curcumina tem mostrado efeitos antibacterianos e antifúngicos (Martins et al. 2011, Pinto et al. 2011) e, inclusive, no combate à células displásicas (Dahl 1989). Vale lembrar que não há estudos com curcumina em canais radiculares, apenas em suspensões e em biofilmes, e, os trabalhos que apresentam contaminação de canais radiculares, utilizam outros corantes como azul de toluidina e azul de metileno. Neste estudo, optamos pela solução de curcumina em concentração de 20 µM como fotossensibilizador, uma vez que Pinto et al. (2011), Dovigo et al. (2011) e Martins et al. (2011) mostraram a eficácia da terapia fotodinâmica nesta concentração.

O tempo pré-irradiação, ou seja, o tempo em que o canal radicular ficou inundado pela solução de curcumina foi de 5 minutos como utilizado por Garcez et al. (2006) e Souza et al. (2010). Este tempo torna-se necessário por permitir a penetração da curcumina através dos túbulos dentinários e sua interação com a parede bacteriana (Upadya & Kishen 2010). Os tempos de irradiação foram de 5 e 10 minutos como utilizados por Souza et al. (2010) e

Garcez et al. (2008). Nosso estudo demonstrou que os tempos de irradiação não apresentaram diferença na redução da viabilidade bacteriana quando comparados entre si.

Em relação aos grupos experimentais, optamos por inserir um grupo (Grupo II) cujos espécimes receberam apenas a solução de curcumina. Os resultados nos confirmaram que apenas o fotossensibilizador na concentração utilizada, não foi capaz de eliminar os micro-organismos, comprovando a necessidade da sensibilização por uma fonte de luz.

Nossos resultados mostraram que apenas o Grupo Ia mostrou redução significativa ($P < 0,05$) de 41% na viabilidade bacteriana entre a coleta inicial e pós-tratamento. Na comparação entre a coleta inicial e final deste mesmo grupo, esta redução foi de 32%. Já os outros grupos não mostraram haver diferença estatística significativa entre as coletas. Estes resultados comprovam a redução dos micro-organismos dentro do canal radicular pela terapia fotodinâmica com 5 minutos de irradiação, assemelhando-se aos resultados encontrados por Silbert et al. (2000), Souza et al. (2010) e Upadya, Kishen (2010). Em contrapartida, a redução na viabilidade bacteriana foi bastante inferior ao mostrado por Fimple et al. (2008) e Garcez et al. (2006), os quais mostraram redução de 95 a 99% de *E. faecalis*. Todos os autores citados utilizaram azul de metileno ou azul de toluidina como agente fotossensibilizador, em canais radiculares contaminados. Já o grupo experimental que recebeu a terapia fotodinâmica com irradiação por 10 minutos (Glb), não apresentou redução bacteriana significativa entre nenhuma coleta.

A terceira coleta, a qual foi realizada sete dias após o tratamento das amostras, nos mostrou que houve a recontaminação do sistema de canais radiculares mesmo após a terapia fotodinâmica. O grupo Ia, o qual foi o único grupo a apresentar redução bacteriana significativa, apresentou um aumento da viabilidade bacteriana do canal radicular em 14 % quando comparadas as coletas pós-tratamento e final.

Assim, podemos concluir com base em nosso estudo, que a terapia fotodinâmica, nas condições experimentais testadas, apesar de reduzir a viabilidade bacteriana, não elimina significativamente a contaminação bacteriana por *E. faecalis*, independente do tempo de irradiação utilizado e na concentração de 20 μ M, reforçando a importância do uso de curativo de

demora entre sessões em casos de necrose pulpar, principalmente na ocorrência de lesão periapical.

CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica não foi eficaz na eliminação de *E. faecalis* quando utilizada a solução de curcumina a 20 µM como agente fotossensibilizador, independente do tempo de irradiação utilizado (5 ou 10 minutos).

REFERÊNCIAS

Aranda-Garcia AR, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Chavez-Andrade GM, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I. Antibacterial effectiveness of several irrigating solutions and the Endox Plus system - an ex vivo study. *Int Endod J*. 2012 Apr 18.

Bahcall JK, Barss JT. Understanding and evaluating the endodontic file. *Gen Dent* 2000;48:690–2.

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, et al. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2008;41:227–39.

Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J* 2006; 200:337-41.

Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55:307-12.

Chai H, Yan S, Lin P, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Curcumin block HIV protease inhibitor ritonavir-induced vascular dysfunction in porcine coronary arteries, 2005. *J. Am. Coll. Surg.*, 200: 820-830.

Dahl T.A. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch. Microbiol.* 1989; 151(2):183-5.

Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. 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* 2005; 99:768-72.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; 36(8):1389-1393.

Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:245–54.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CAS et al. Investigation of the Photodynamic Effects of Curcumin Against *Candida albicans* *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87: 895–903.

Dujic JS, Kippenberger A, Ramirez-Bosca J, Diaz-Alperi J, Bereiter-Hahn R, Kaufmann A, and M. Hofmann M. (2009) Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int. J. Cancer* 124, 1422–1428.

Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod* 2008; 34(6): 728–734.

Fonseca MB, Junior PO, Pallota RC, Filho HF, Denardin OVP et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg* 2008; 26:209–13.

Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. J Endod 2008; 34:138-42.

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, 2012.

Garcez AS, Nunez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, 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 2006; 102:93-98.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. Lasers Surg Med 2007;39:59–66.

Giusti JSM, Pinto LS, Pizzolito AC, Helmersson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, Bagnato VS. Antimicrobial photodynamic action on dentin using light-emitting diode light source. Photomed Laser Sur., 2008. 26 (4): 281-7. 2008.

Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? Photochem Photobiol Sci 2004;3:436–50.

Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Formulation and Bacterial Phototoxicity of Curcumin Loaded Alginate Foams for Wound Treatment Applications: Studies on Curcumin and Curcuminoides XLII. J Pharm Sci 100:174–185, 2011.

Huang MJ, Smart RC, Wong CQ, Convey AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Res. 1988, 48: 5941-46.

Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007; 86:694–707.

Lima AKF, Silva AR, Santos RR, Salles DM, Evangelista AF, Figueiredo JR, Silva LDM. Cryopreservation of preantral ovarian follicles *in situ* from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology* 2006, 66: 1664–6.

Martins CR. Avaliação *in vitro* da efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de *Staphylococcus aureus*. [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, 2011.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004; 37:311-9.

Panhóca VH. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre *Streptococcus mutans* em biofilme dental “*in situ*”. [Dissertação de Mestrado]. São Carlos: Instituto de Física de São Carlos da USP, 2011.

Pinto GCS. Efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana da curcumina na inativação de biofilmes de *Candida dubliniensis*. [Dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, 2011.

Rios J, 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; 37:856–859.

Sedgley C. Root canal irrigation—a historical perspective. *J Hist Dent* 2004; 52:61–5.

Shen, L., H. F. Ji and H. Y. Zhang (2005) A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photosensitizing mechanisms of the pigment. *Chem Phys Lett* 2005; 409, 300–303.

Silbert T, Bird PS, Milburn GJ, Walsh LJ. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization. *J Dental Res* 2000; 79:56-9.

Siqueira-Junior JF , Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod* 2007; 33:667–72.

Soukos NS, Chen PS, Morris JT, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006;32:979–84.

Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR, Roças N, Siqueira-Junior JF. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; 36:292–296.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, et al. *Enterococcus faecalis*: its role in root Canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32:93–8.

Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *Int Endod J.* 43:978-987,2010.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:13–28.

Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. International Journal of Oral Science 2012; 4:19-23.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection (PAD) used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. J Dent 2006;34:363–71.

Zhang C, Hou BX, Zhao HY, Sun Z. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth Chin Med J 2012;125(6):1163-8.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo propôs eliminar uma espécie bacteriana específica levando em conta sua importância na etiologia de doenças pulpares e periapicais^{25,49}, além de estarem relacionadas diretamente ao insucesso da terapia endodôntica^{29,43}. O estudo dos mecanismos de ação e dos efeitos de novos recursos técnicos é bastante válido, tendo-se em vista o objetivo de se aumentar o índice de sucesso do tratamento endodôntico. Pesquisas relacionadas com nosso tema, em que houve a aplicação da terapia fotodinâmica em biofilme formado por diferentes micro-organismos e em suspensões, mostraram haver redução significativa na redução desta microbiota^{46,52}.

A terapia fotodinâmica tem sido estudada utilizando como principais agentes fotossensibilizadores o azul de toluidina e o azul de metileno^{17,52}. Souza et al.⁴⁸ (2010) avaliaram os dois corantes, usando a terapia fotodinâmica como terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico. Entretanto, nenhum dos fotossensibilizadores mostrou a completa eliminação de *Enterococcus faecalis*. Em nosso estudo, propusemos a utilização de um fotossensibilizador natural, a curcumina, a qual vem sendo utilizada em estudos de diversas áreas da Odontologia^{31,37}. Ainda não há trabalhos com este fotossensibilizador quando utilizado em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. Por ser um trabalho inédito, devemos desenvolver outras pesquisas com este corante, principalmente atuando após o preparo biomecânico.

Há um consenso na literatura em que a curcumina apresenta efeitos antibacterianos, antifúngicos e em células displásicas^{8,21,23} quando ativada por uma fonte de luz de 450 nm (luz azul visível). Porém, estes trabalhos utilizaram suspensões de micro-organismos ou biofilmes formados em discos/blocos de dentina^{19,52}. Normalmente, a fonte de luz usada é um LASER. Em nosso trabalho, utilizamos um LED fabricado especialmente para o estudo. O LED apresenta algumas características vantajosas quando comparados ao LASER, como menor custo, são portáteis, consomem pouca energia elétrica e tempo de vida maior, não geram calor excessivo¹², sendo, por estes motivos, uma forma

alternativa interessante ao LASER, podendo ser utilizado em outros estudos futuros.

Já em canais radiculares contaminados, nossos resultados estão de acordo com outros estudos como os de Souza et al.⁴⁸ (2010) e Bonsor et al.⁶ (2006) os quais aplicaram a terapia fotodinâmica em canais radiculares, não encontrando redução significativa da viabilidade bacteriana, apesar de utilizarem diferentes fotossensibilizadores.

A concentração do corante também é fator importante na eliminação bacteriana. A concentração de 20 μM foi utilizada conforme os resultados apresentados por Martins et al.³¹ (2011), Pinto et al.³⁷ (2011) e Dovigo et al.⁴⁶ (2011). Nestes três estudos, esta concentração eliminou de forma significativa fungos (*Candida albicans* e *Candida dubliniensis*) e bactérias (*Staphylococcus aureus*), porém, realizados em biofilmes formados em microplacas. No estudo citado de Dovigo et al.¹³, os autores utilizaram diversas concentrações da solução de curcumina. Estas concentrações partiram de 0,05 μM até 20 μM . Os resultados mostraram que a completa inviabilização dos fungos ocorreu apenas após a aplicação da última concentração, semelhante à que utilizamos em nosso estudo. Em relação ao veículo utilizado, o dimetilsulfóxido (DMSO) foi avaliado por Haukvik et al.²¹, em biofilmes de *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus intermedius* utilizando a curcumina como fotossensibilizador em solução por três veículos diferentes sendo eles, o DMSO e o polietilenoglicol. O estudo mostrou que a terapia fotodinâmica reduziu cerca de 80% o número de bactérias, mostrando que o dimetilsulfóxido é um bom veículo para o corante. Nossos resultados apresentaram diminuição imediata do *E. faecalis* após a terapia fotodinâmica, havendo recolonização 7 dias após o tratamento. Novos estudos devem ser realizados com concentrações diferentes deste corante, pela diferença de metodologia empregada nos estudos citados, os quais não representam a realidade clínica do endodontista por se tratarem apenas de experimentos em biofilmes e não em canais radiculares.

Outro fator importante é o tempo de irradiação utilizado. O tempo de 5 minutos foi o mesmo utilizado Souza et al.⁴⁸ (2010), Meire et al.³² (2009) e Upadya, Kishen⁵² (2010). Em nosso estudo, inserimos dois grupos experimentais que utilizaram os tempos de irradiação de 5 e 10 minutos. Nossos resultados mostraram que o tempo de 5 minutos reduziu maior

quantidade de *E. faecalis* que o de 10 minutos. Devemos lembrar que a curcumina é altamente instável, e, provavelmente, após 5 minutos, a mesma já deveria estar totalmente degradada ⁴².

Nossos resultados demonstraram que a terapia fotodinâmica, nas condições experimentais do estudo, reduziu significativamente a viabilidade bacteriana após o tratamento das amostras. Entretanto, sete dias após a terapia fotodinâmica, constatamos o aumento da colonização bacteriana do canal principal, provavelmente pelas bactérias residuais provenientes dos túbulos dentinários e ramificações o que permite concluirmos que esta técnica não foi capaz de erradicar o *E. faecalis* do sistema de canais radiculares.

Estes dados reforçam a importância da aplicação do curativo de demora entre sessões, atuando na dentina, nas ramificações do canal principal e deltas apicais, ou seja, em áreas fora do alcance da terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS *

1. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2001; 74(5): 656-69.
2. Ahlquist M, Henningsson D, Hultenby K, Ohlin J. The effectiveness of manual and rotary techniques in the cleaning of root canals: a scanning microscopy survey. *Int Endod J.* 2001; 34(7): 533–7.
3. American Welding Society. *Welding handbook*. 8. ed. Miami: American Welding Society; 1987. v.2, cap. 22.
4. Aranda-Garcia AR, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Chavez-Andrade GM, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M, et al. Antibacterial effectiveness of several irrigating solutions and the Endox Plus system - an ex vivo study. *Int Endod J.* 2012; 45(12): 1091-6.
5. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res.* 2000; 34(6): 498–501.
6. Bonsor SJ, Nichol R, Seid TMS, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An *in vivo* study). *Br Dent J.* 2006; 200 (6): 337-41.
7. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983; 55(3): 307–12.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

8. Chai H, Yan S, Lin P, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. Curcumin block HIV protease inhibitor ritonavir-induced vascular dysfunction in porcine coronary arteries. *J Am Coll Surg*. 2005; 200(6): 820-30.
9. Dahl TA, McGowan WM, Shand MA, Srinivasan VS. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol*. 1989; 151(2): 183-5.
10. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010; 36(8): 1389-93.
11. Deminova TN; Hamblim MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(6): 2329-35.
12. Dickers B, Lamard L, Peremans A, Geerts S, Lamy M, Limme M, et al. Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(1): 81–5.
13. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CAS, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol*. 2011; 87(4): 895–903.
14. Dujic JS, Kippenberger A, Bosca JR, Alperi JD, Hahn RB, Kaufmann A, et al. Curcumin in combination with visible light inhibits tumor growth in a xenograft tumor model. *Int J Cancer*. 2009; 124(6): 1422–8.
15. Fonseca MB, Júnior POT, Pallota RC, Filho HF, Denardin OVP, Rapoport A, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg*. 2008; 26(3): 209-13.

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

17.Garcez AS, Nunez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, 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.* 2006; 102(4): 93-8.

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

19.Giusti JSM, Pinto LS, Pizzolito AC, Helmerson K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using light-emitting diode light source. *Photomed Laser Sur.* 2008;26(4): 281-7.

20.Hancock H., Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5): 579–86.

21.Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tonnensen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparation studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. *Pharmazie.* 2009; 64(10): 666-73.

22.Hegge AB, Andersen T, Melvik JE, Bruzell E, Kristensen S, Tonnesen HH. Formulation and bacterial phototoxicity of curcumin loaded alginate foams for wound treatment applications: studies on curcumin and curcuminoides XLII. *J Pharm Sci.* 2011; 100(1): 174–85.

- 23.Huang MJ, Smart RC, Wong CQ, Convey AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res.* 1988; 48(21): 5941-46.
- 24.Kalka, K; MERK, H.; Mukhtar, H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42(3): 389-413.
- 25.Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod.* 1965; 20(12): 340-9.
- 26.Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(5): 308-20.
- 27.Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(11): 694-707.
- 28.Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005. 1491 p.
- 29.Lin LM, Skribner JE, Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod.* 1992; 18(12): 625-7.
- 30.Love RM. *Enterococcus faecalis*-a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34(5): 399-405.
- 31.Martins CR. Avaliação *in vitro* da efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na inativação de *Staphylococcus aureus*. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.
- 32.Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *Int Endod J.* 2009; 42(4): 351-9.

33. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998; 31(1): 1-7.
34. Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *J Endod*. 1993; 19(10): 498-500.
35. Paiva JG e Antoniazzi JH. *Endodontia bases para a prática clínica*. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas; 1988.
36. Weishaupt KR, Dougherty TJ, Potter WR, inventors; Photofrin Medical Inc., assignee. Purified hematoporphyrin derivative for diagnosis and treatment of tumors, and method. England patent EP0120054. 1990 May 30.
37. Pinto GCS. Efetividade da terapia fotodinâmica antimicrobiana da curcumina na inativação de biofilmes de *Candida dubliniensis*. [Dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.
38. Ribeiro MS, Groth EB, Yamada AM, Garcez AS, Suzuki LC, Prates RA. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Aplicações na odontologia. In: Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo: Atualização em clínica odontológica, 25., 2007 Jan 27-31, São Paulo, SP. São Paulo: Artes Médicas; 2007.
39. Rios J, 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; 37(6): 856–9.
40. Rousset N, Vonarx V, Eleouet S, Carre J, Bourre L, Lajat Y, et al. Cellular distribution and phototoxicity of benzoporphyrin derivative and Photofrin *Res Exp Med*. 2000; 199(6): 341-57.
41. Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite

irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. Int Endod J. 2002; 35(3): 268-74.

42. Shen, L, Ji HF, Zhang HY. A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photosensitizing mechanisms of the pigment. Chem Phys Lett. 2005; 409(2): 300–3.

43. Siqueira-Junior JF. Etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J. 2001; 34(1): 1-10.

44. Siqueira-Junior JF, Araújo MCP, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. J Endod. 1997; 23(8): 499–502.

45. 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; 30(5): 297–306.

46. Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonca RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, et al. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. J Endod. 2010; 36(5): 894-8.

47. Soukus NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. J Endod. 2006; 32(10): 979-84.

48. Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR, 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(2): 292–6.

49. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps [dissertation]. Umea,(Sweden): Umea University Odontological; 1976.

50.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 Endod.* 1998; 85(1): 86–93.

51.Tedesco AC. Processos fotodinâmicos: a “Luz” de uma nova terapia aplicada à saúde humana. *J Bras Laser.* 2007; 1(4): 32-41.

52.Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *Int Endod J.* 2010; 43(11): 978-87

53.Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998; 42(1): 13-28.

54.Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2012; 4(1): 19-23.

55.Weber WN, Hunsaker LA, Abcouwer SF, Deck LM, Vander JDL. Antioxidant activities of curcumin and related enones. *Bioorg Med Chem.* 2005. 13(11): 3811-20.

56.Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue on *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 2003; 37(3): 190-3.

57.Zhang C, Hou BX, Zhao HY, Sun Z. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. *Chinese Med J.* 2012; 125(6): 1163-8.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Figura A1 – Espécimes fixados em placa de 24 poços

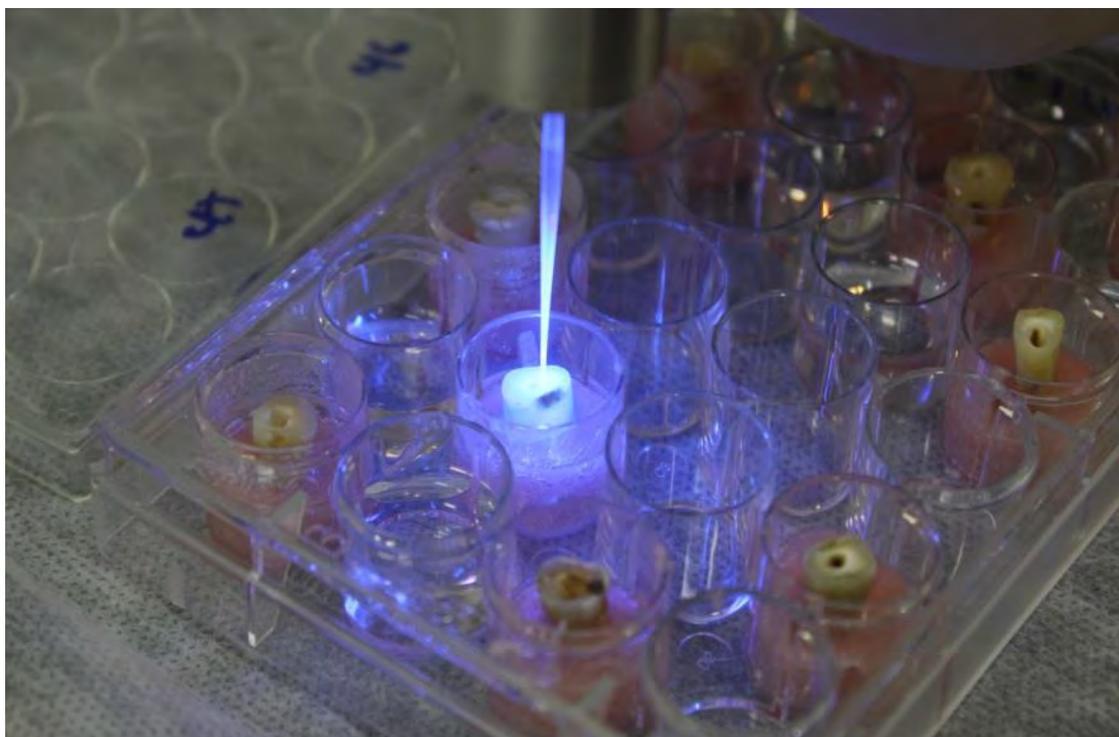


Figura A2 – Detalhe do LED utilizado no Estudo.



APÊNDICE 2

Figura A3 – Detalhe da fibra ótica ativada dentro do canal radicular.



Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 01 de março de 2013.

MATHEUS FRANCO DA FROTA