



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

JAQUELINE MIDORI NAKAO

**Citotoxicidade da terapia fotodinâmica
e soluções irrigadoras**

**Araçatuba – SP
2017**

JAQUELINE MIDORI NAKAO

**Citotoxicidade da terapia fotodinâmica
e soluções irrigadoras**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo

Coorientadora: Prof^a. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira

**Araçatuba – SP
2017**

Dedicatória

Dedico este trabalho

Ao meu pai, **Edson Takayuki Nakao** (*in memoriam*), pelo amor imensurável, por toda a sua dedicação, paciência, apoio e carinho. Por não ter me desamparado no momento em que mais precisei, por ter acreditado que eu seria capaz de vencer e, principalmente, por ter feito o possível e o impossível pela minha felicidade. Por sempre estar presente, mesmo não estando mais entre nós, por ter me ensinado tudo o que sei hoje, pelas broncas, pelos abraços, enfim, por tudo que você foi e é na minha vida. Essa conquista é nossa e sei que, daí de cima, você está comemorando junto comigo. Não existem palavras que consigam expressar meu sentimento de gratidão e amor. Te amo além da vida!!

A minha mãe, **Mirian Kazumi Fujihara Nakao**, que esteve sempre comigo ao longo de toda a caminhada até aqui, me fornecendo apoio, sendo minha base, compartilhando comigo momentos bons e ruins e, principalmente, me dando muito amor, carinho, incentivo e o suporte necessário para que eu chegasse até esta importante etapa da minha vida. Grande parte desta conquista eu devo a você e não tenho palavras que possam descrever meu amor e gratidão. Te amo!

A minha irmã, **Rafaela Mitie Nakao**, por sempre estar presente em minha vida, por compartilhar comigo as melhores risadas, por me ensinar tanto, por ser minha grande companheira e por me proporcionar dias melhores e mais leves! Te amo!

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, primeiramente, por sempre me dar forças para seguir em frente e por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos, permitindo que eu chegasse até aqui.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Prof. Tit. Wilson Roberto Poi** e do vice-diretor **Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho**.

Ao **Prof. Ass. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo**, meu orientador, pela confiança e incentivo nesses três últimos anos e pelo apoio e atenção durante todo o desenvolvimento deste trabalho, contribuindo muito para o meu conhecimento e aprendizado científico.

À **Profª. Adj. Sandra Helena Penha de Oliveira**, minha coorientadora, além de ótima professora, pela dedicação e apoio, permitindo a realização da pesquisa no Laboratório de Farmacologia e, assim, a conclusão deste trabalho.

À **Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP (PROPe)**, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa, edital nº 07/2016-PROPE.

À Pós Doutoranda da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Aline Satie Takamiya**, pela paciência enorme que teve comigo, me ensinando todo o processo de cultura de células. Obrigada pelo suporte, pela ajuda, por ter sido tão atenciosa, por ter me socorrido mesmo nos finais de semana, enfim, obrigada por tudo, você foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho. Toda sua dedicação e empenho pelo que faz demonstram a excelente profissional e pessoa que você é. Muito Obrigada!

Ao aluno de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba **Henrico Badaoui Strazzi Sahyon**, pela dedicação, empenho, ajuda, paciência e por ter se desdobrado para que o segundo projeto de pesquisa fosse concluído. Muito obrigada pela atenção que sempre teve e pela disponibilidade do seu tempo.

À **Patrícia Zambon da Silva**, por toda dedicação, apoio e disponibilidade para nos ajudar a desenvolver os experimentos. Além disso, muito obrigada por se tornar uma grande amiga.

À aluna de graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Paloma Pereira da Silva**, pela ajuda, pelos ensinamentos e por ter sido minha companheira de Iniciação Científica, compartilhando comigo momentos bons e outros não tão bons no laboratório.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, principalmente aos **Profs. Drs. da Disciplina de Endodontia: João Eduardo Gomes Filho, Eloi Dezan Junior, Luciano Tavares Angelo Cintra, Rogério de Castilho Jacinto e Gustavo Sivieri de Araújo**.

Ao Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, muito obrigada pelos ensinamentos, pela atenção, competência, ajuda, paciência, dedicação e confiança.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, muito obrigada pelo amparo, suporte, pela disponibilidade e dedicação que sempre tiveram.

Aos meus avós, por serem tão amorosos, por toda a dedicação, apoio, e por não medirem esforços para me verem bem. Obrigada por terem se desdobrado nos momentos difíceis, por serem tão presentes, por fazerem o impossível para satisfazer minhas vontades e por estarem sempre esbanjando alegria. Quero, um dia, ser metade do que vocês representam para mim. Amo muito vocês!

Aos meus tios, por todo o apoio, amor e carinho. Por sempre estarem presentes em minha vida, me ajudando, amparando e, também, compartilhando momentos felizes. Obrigada pelos conselhos e por todo o suporte nos momentos difíceis. Amo vocês!

Aos meus amigos de Mirandópolis, **Francielli, Gabriella, Julia, Matheus, Mustafa, Natália, Renato e Rita**, pelo companheirismo, pelas risadas, pelos reencontros maravilhosos, pelo apoio de sempre e por estarem sempre disponíveis quando eu preciso. Obrigada por essa amizade que, mesmo com a distância, ainda permanece igual. Amo todos!

Ao meu quinteto que a 59 me proporcionou, agradeço vocês, meninas (**Amanda, Carol, Geovana, e Lohana**), por esses 5 anos maravilhosos, por todos os momentos felizes, por todas as festas, trabalhos em grupo, pelas duplas das

clínicas, pelos churrascos, enfim, por tudo que vivemos juntas. Obrigada pela amizade, por serem tão companheiras, confidentes e pelo apoio de sempre. Vocês fizeram a diferença nesses 5 anos e vão fazer muita falta daqui pra frente. Vou levar vocês no meu coração para o resto da vida! Amo todas demais!

Agradeço todas as minhas duplas de clínicas (**Afonso, Amanda, Carol, Gabriel, Geovana, Heitor, Iana, Jéssica Coelho, Jéssica Cordeiro, Jéssica Galbiati, Juliana, Lohana, Luiza e Pedro**) pela paciência, por dividirem comigo as melhores experiências, por compartilharem seus conhecimentos, por dividirmos as broncas, pelo companheirismo e pela união. Desculpem por qualquer coisa e muito obrigada por tudo!

Agradeço também os meus amigos, **Érika, Cássio, Laís, Larissa, Leonardo, Lucas, Lumi, Ronaldo, Sandy, Vinícius e Willian**, pela amizade, pelos divertidos momentos nas clínicas, nas festas e por todos esses 5 anos.

Agradeço a minha turma, a **Turma 59**, pela amizade, pela união, pelo carinho e acolhimento. Não poderia ter entrado numa turma melhor que essa. Sempre me lembrarei de cada um de vocês com muito carinho e com recordações muito boas.

Muito Obrigada!

Επίγραφε

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

Resumo

NAKAO, J.N. **Citotoxicidade da terapia fotodinâmica e soluções irrigadoras.** 2017. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) corresponde a um conjunto de procedimentos físicos, químicos e biológicos, que ocorre quando um fotossensibilizador (FS) é ativado por meio de luz de comprimento de onda específico (Laser ou Led), para inativar a célula-alvo e/ou micro-organismos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade da TFD e das soluções irrigadoras. Foram utilizadas células de linhagem de fibroblastos de camundongos L-929. As culturas foram mantidas sob condições padrão de cultivo celular (37°C com 5% de CO₂). As soluções foram distribuídas em grupos: G1-Meio de Cultura DMEM (Controle); G2-Cloreto de Sódio 0,9%; G3-Hipoclorito de Sódio 2,5%; G4-Hipoclorito de Sódio 5%; G5-TFD (FS curcumina 1000 mg/L + Led azul λ 480 nm, fluência de 75 J/cm², por 4 minutos); G6-TFD (FS curcumina 750 mg/L + Led azul λ 480 nm, fluência de 75 J/cm², por 4 minutos). Depois de 6h, 24h e 48h, foi realizada a análise dos resultados da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT, por 4h a 37°C em 5% de CO₂. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA com correção de Bonferroni ($p < 0,05$). O grupo controle apresentou diferença estatística significativa com todas as soluções testadas ($p < 0,05$) em todos os períodos testados. Houve diferença estatisticamente significativa do grupo de cloreto de sódio 0,9% com o hipoclorito de sódio (5%) e TFD curcumina (1000mg/L e 750 mg/L) no período de 6h ($p < 0,05$); com o hipoclorito de sódio (2,5% e 5%) e TFD curcumina (1000mg/L e 750 mg/L) no período de 24h ($p < 0,05$); e com TFD curcumina (1000mg/L) em 48h ($p < 0,05$). O hipoclorito de sódio 2,5% apresentou menos tóxico que o hipoclorito de sódio 5%, curcumina 1000 mg/L e 750 mg/L em todos os períodos experimentais. O hipoclorito de sódio 5%, TFD curcumina 1000 mg/L e 750 mg/L, foram as soluções mais citotóxicas ($p > 0,05$) em todos os tempos. Não houve diferença estatística significativa entre TFD curcumina 1000 mg/L e 750 mg/L ($p > 0,05$). Concluimos que a TFD com curcumina 1000 mg/L foi citotóxica em cultura de fibroblastos L-929. A

solução de cloreto de sódio 0,9%, a TFD com curcumina 750 mg/L e hipoclorito de sódio (2,5% e 5%) reduziram a viabilidade celular.

Palavras-chave: Tratamento do canal radicular. Solução irrigadora. Terapia fotodinâmica. Citotoxicidade.

NAKAO, J.N. **Cytotoxicity of photodynamic therapy and irrigating solutions.** 2017. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a group of physical, chemical and biological procedures, which occurs after the use of a photosensitizer (PS) activated by light of a specific wavelength (Laser or Led), to destroy the target cell and / or micro-organisms. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of PDT and the irrigating solutions. L-929 mouse lineage fibroblasts cells were used in this study. The cultures were maintained under standard cell culture conditions (37 °C and 5% CO₂). The solutions were distributed in groups as follow: G1 – Culture medium DMEM (control); G2 – Sodium chloride 0.9%; G3 – 2.5% NaOCl; G4 – 5% NaOCl; G5 – TFD (PS curcumin 1000 mg/L + blue Led λ 480 nm, fluency of 75 J/cm², for 4 minutes); G6 – TFD (PS curcumin 750 mg/L + blue Led λ 480 nm, fluency of 75 J/cm², for 4 minutes). After 6h, 24h and 48h, viable cells were stained with formazan dye MTT, at 37 °C, 5% CO₂ for 4h. The results were statistically analyzed by ANOVA with Bonferroni correction (p<0.05). The control group showed statistically significant difference (p<0.05) with all tested solutions, in all tested periods. There was statistically significant difference about the group of sodium chloride 0.9% with NaOCl 5% and PDT curcumin (1000 mg/L and 750 mg/L) in the period of 6h (p<0.05); with NaOCl (2.5% and 5%) and PDT curcumin (1000 mg/L and 750 mg/L) in the period of 24h (p<0.05); and with PDT curcumin (1000 mg/L) 48h (p<0.05). The NaOCl 2.5% showed less cytotoxic than NaOCl 5% and curcumin 1000 mg/L and 750 mg/L in all experimental periods. The NaOCl 5%, PDT curcumin 1000 mg/L and 750 mg/L were the most cytotoxic solutions (p>0.05) in all periods. There was not statistically significant difference between PDT curcumin 1000 mg/L and 750 mg/L (p>0.05). Conclude that PDT curcumin 1000 mg/L was cytotoxic in L-929 fibroblasts culture. The sodium chloride solution 0.9%, PDT curcumin 750 mg/L, NaOCl (2.5% and 5%) reduced cell viability.

Keywords: Root canal treatment. Irrigating solution. Photodynamic therapy. Cytotoxicity.

Lista de quadro e gráfico

LISTA DE QUADRO E GRÁFICO

Quadro 1 – Distribuição dos grupos, em função da solução empregada.....32

Gráfico 1 – Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e soluções irrigadoras nos períodos de 6h, 24h e 48h.....39

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Cultura de células. A – Células de linhagem L-929 mantidas em garrafas de cultura com meio DMEM. B – Fotografia de microscopia de fibroblastos de camundongo de linhagem L-929.....31
- Figura 2** – Diluição das soluções irrigadoras em meio de cultura DMEM.....32
- Figura 3** – A – Remoção do meio de cultura dos poços. B – Preenchimento dos poços com as soluções testadas.....33
- Figura 4** – A – FS curcumina sendo adicionada nos poços. B – FS curcumina ativado por Led azul.....34
- Figura 5** – MTT nos poços após período de incubação de 4 horas.....34
- Figura 6** – A – Álcool adicionado às células. B – Placa colocada na mesa de agitação. C – Placa de 96 poços para realização da leitura.....35

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

UNESP	Universidade Estadual Paulista
SP	São Paulo
Prof.	Professor
Prof ^a .	Professora
Ass.	Assistente
Dr.	Doutor
Adj.	Adjunto
Tit.	Titular
PROPe	Pró-Reitoria de Pesquisa da UNESP
Nº	Número
TFD	Terapia Fotodinâmica
PDT	Photodynamic therapy
FS	Fotossensibilizador
PS	Photosensitizer
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
Led	Light-Emitting Diode
°C	Grau Celsius
CO ₂	Gás Carbônico
G	Grupo
NaOCl	Hipoclorito de sódio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
%	Porcentagem
mg	Miligrama
L	Litro
λ	Comprimento de onda
nm	Nanômetro
J	Joule
cm ²	Centímetro quadrado
h	Hora
MTT	3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
SCR	Sistema de canais radiculares

PBM	Preparo biomecânico
MO	Micro-organismos
CEPOF	Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
USP	Universidade de São Paulo
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
C	Concentração
V	Volume
Et al.	E outros
mW	Miliwatt
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
μ m	Micrômetro

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVO.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Cultura de Fibroblastos.....	31
3.2 Soluções Irrigadoras e Divisão em Grupos.....	31
3.3 Teste de Citotoxicidade.....	32
3.4 Terapia Fotodinâmica.....	33
3.5 Análise da Viabilidade Celular.....	34
4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	37
5 RESULTADOS.....	39
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	46

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O papel do tratamento endodôntico é de fundamental importância para controlar a infecção presente em dentes que apresentam necrose pulpar. O sucesso deste tratamento depende: da eliminação eficiente da infecção no sistema de canais radiculares (SCR) e o correto selamento do canal radicular por meio da obturação¹. Portanto, nestes casos, a Endodontia é realizada com intuito de promover o reparo tecidual pós-tratamento e consequentemente conduzir à remissão da lesão periapical crônica¹⁻³.

O preparo biomecânico (PBM) do canal radicular é a etapa de limpeza e modelagem dos canais radiculares realizada para reduzir e/ou eliminar a população de microrganismos (MO) e seus produtos tóxicos, como endotoxinas, presentes na infecção endodôntica^{4,5}. A utilização de substâncias irrigadoras que auxiliem na descontaminação nesta fase é essencial para potencializar a limpeza durante o PBM^{6,7}.

Dentre as substâncias químicas auxiliares utilizadas, as soluções de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, são as mais empregadas e mundialmente aceitas pelas suas propriedades de clarificação, dissolução de tecido orgânico, saponificação, transformação de aminas em cloraminas, desodorização e ação antimicrobiana⁶⁻⁸.

Embora a erradicação completa da infecção no SCR consista em um objetivo primordial, estudos revelaram que o PBM, mesmo com a utilização dos novos instrumentos endodônticos de Níquel-Titânio aliados às soluções irrigadoras endodônticas como hipoclorito de sódio (2,5% ou 5%), reduz consideravelmente o número de MO presentes no interior SCR, porém é incapaz de deixá-lo totalmente livre das bactérias e seus produtos tóxicos residuais^{9,10}.

Considerando também a complexidade anatômica do SCR, certas áreas podem permanecer inacessíveis ao PBM, sendo assim, o emprego de uma medicação intracanal com ação antimicrobiana, como o hidróxido de cálcio puro ou associado, assume um papel essencial para potencializar a eliminação dos MO ainda presentes no SCR¹¹⁻¹³.

Logo, inovações nas modalidades terapêuticas devem ser investigadas constantemente com a intenção de erradicar as infecções endodônticas.

Com o advento dos aparelhos de Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e Led (*Light-Emitting Diode*), surgiram novas alternativas nos tratamentos médico, odontológico e fisioterápico^{14,15}. Dentre os diferentes empregos destes aparelhos na Área da Saúde, destacamos a terapia fotodinâmica (TFD), em língua inglesa, *Photodynamic Therapy* (PDT), que se baseia em um conjunto de procedimentos físicos, químicos e biológicos, que ocorrem após se administrar um agente fotossensibilizador (FS) exógeno ativado por meio de uma fonte de luz visível (Laser ou Led) de comprimento de onda específico para o FS, com a finalidade de promover necrose celular em um local específico (célula-alvo)^{16,17}. A TFD é utilizada no tratamento contra câncer, doenças não oncológicas e para redução microbiana^{16,17}.

Estudos realizados em diversos Grupos de Pesquisa mundiais, dentre eles o Laboratório de Biofotônica do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF), do Programa CEPID-FAPESP - Grupo de Óptica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC-USP), demonstraram o mecanismo de ação e as propriedades básicas e aplicadas da TFD¹⁸⁻²⁰. O mecanismo básico de ação se dá quando o FS absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado mais estimulado. Na presença de um substrato, como o oxigênio, o FS transfere a energia a este substrato. Ao retornar ao seu estado natural, forma espécies altamente reativas e de vida curta, como o oxigênio singleto, também chamado de oxigênio singleto, que provoca sérios danos a célula alvo, como também, aos MO, via oxidação irreversível de componentes celulares nos patógeno²¹⁻²³.

Na Endodontia, o emprego da TFD foi proposta após realização do PBM e antes da obturação dos canais radiculares, como uma alternativa para aumentar a desinfecção do SCR. Estudos *in vitro*^{24,25} e *in vivo*^{26,27} demonstram que a TFD potencializa a desinfecção do canal radicular, tanto na ausência, quanto na presença da medicação intracanal.

A curcumina, extraída do rizoma da planta *Curcuma longa* L (açafrão), é empregada como FS na TFD. Ela possui efeitos antimicrobianos^{28,29}, anti-inflamatórios³⁰ e imunomoduladores³¹, que são potencializados na presença do Laser ou Led de comprimento de onda específico para ativá-la (Laser azul ou Led azul).

A análise de citotoxicidade nos permite verificar os efeitos de substâncias ou procedimentos em nível celular, além de possibilitar a avaliação do comportamento das células em ambiente controlado, sendo este método simples, rápido e preciso³².

Porém, estudos sobre a citotoxicidade da TFD na Endodontia são escassos. Recentemente realizamos um estudo, em que parte deste, analisamos a citotoxicidade do FS curcumina na concentração de 500 mg/L. A TFD não foi citotóxica e obteve viabilidade de fibroblastos L-929 semelhante ao cloreto de sódio 0,9% e ao meio de cultura, e demonstrou resultados distintos das soluções de hipoclorito de sódio 2,5% e 5%³³. Portanto, de acordo com o resultado deste estudo, despertou-nos um interesse em investigar a concentração do FS curcumina a 1000 mg/L, visto que, nesta concentração, teremos uma maior atividade antimicrobiana com o FS curcumina. Assim, a literatura carece desta resposta. Considerando o emprego atual da TFD, novos estudos são necessários para elucidar a citotoxicidade da TFD com o FS curcumina na Endodontia.

Existem questionamentos que precisam ser bem esclarecidos e necessitam, no presente momento, de respostas com evidências científicas para o emprego das soluções irrigadoras quando associadas à TFD na terapia endodôntica. Embora já existam protocolos clínicos sendo preconizados, os benefícios da TFD na Endodontia ainda não foram bem estabelecidos cientificamente, principalmente quando utilizada no tratamento endodôntico de sessão única.

Objetivo

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade da terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador curcumina e das soluções irrigadoras, em células de linhagem L-929 (fibroblastos de camundongos).

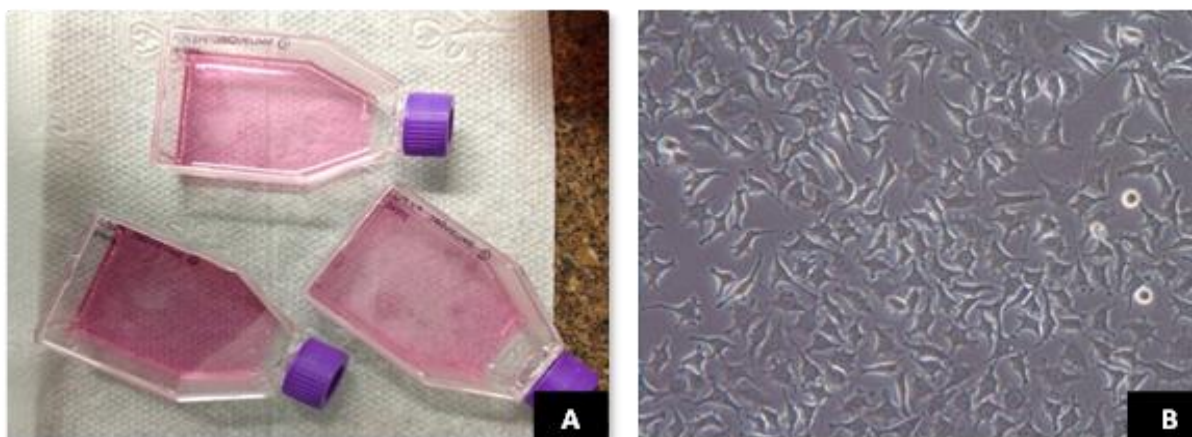
Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de fibroblastos

Foram utilizadas células de linhagem L-929 (fibroblastos de camundongos), mantidas em garrafas de cultura contendo meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM (Gibco BRL, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mL de penicilina/streptomicina, 1 mL de gentamicina, 300 µL de fungisone e 20 mL de glutamina (Figuras 1A e 1B). As culturas foram mantidas sob condições padrão de cultivo celular (37°C, 100% de umidade, 5% de CO₂)^{32,34}, sendo realizadas trocas de meio de cultura DMEM em dias alternados e as garrafas repicadas assim que estas atingiam 100% de confluência celular.

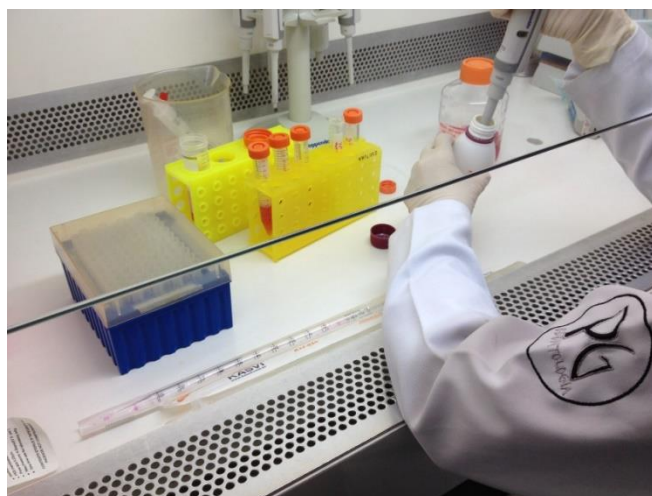
Figura 1 – Cultura de células. A - Células de linhagem L-929 mantidas em garrafas de cultura com meio DMEM; B - Fotografia de microscopia de fibroblastos de camundongo de linhagem L-929.



3.2 Soluções irrigadoras e divisão em grupos

Inicialmente, todas as soluções a serem testadas, estavam em uma concentração superior ao pretendido. Antes de serem utilizadas nos ensaios, elas foram diluídas com o meio de cultura DMEM, de acordo com Malheiros et al. (2005)³⁴ (Figura 2). As soluções foram utilizadas conforme o Quadro 1.

Figura 2 – Diluição das soluções irrigadoras em meio de cultura DMEM.



Quadro 1 – Distribuição dos grupos, em função da solução empregada.

Grupos Experimentais	Soluções Testadas
G1	Meio de Cultura DMEM (Controle)
G2	Cloreto de sódio 0,9%
G3	Hipoclorito de sódio 2,5%
G4	Hipoclorito de sódio 5%
G5	TFD (FS curcumina 1000 mg/L + Led azul)
G6	TFD (FS curcumina 750 mg/L + Led azul)

Fonte: Elaborado pelo Autor

3.3 Teste de citotoxicidade

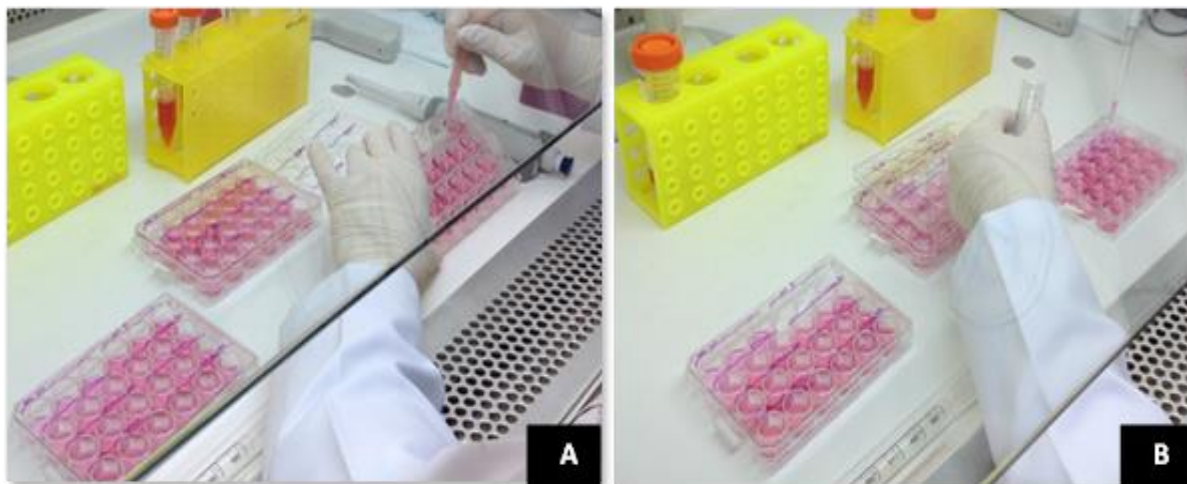
Os fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços e diluídos em meio de cultura DMEM (1×10^4 células/poço). A contagem das células foi realizada com auxílio de uma câmara de Neubauer. Após o período de incubação de 24h, os fibroblastos estavam em condições de confluência celular de 80% e foram utilizados nos ensaios. Três poços foram utilizados para cada solução.

O meio de cultura DMEM, no qual as células estavam imersas, foi retirado dos poços e as soluções diluídas foram adicionadas (Figura 3A).

Os grupos G1, G2, G3 e G4 foram preenchidos com 500 µl de meio de cultura DMEM, cloreto de sódio 0,9%, hipoclorito de sódio 2,5% e hipoclorito de

sódio 5%, respectivamente, e não receberam FS, assim como, não foi realizada a TFD (Figura 3B).

Figura 3 – A - Remoção do meio de cultura dos poços; B - Preenchimento dos poços com as soluções testadas.



A TFD foi realizada nos grupos G5 e G6, conforme será descrito posteriormente e, em seguida, as placas foram mantidas a 37°C, 100% de umidade, 5% de CO₂. Os testes foram realizados nos períodos de 6h, 24h e 48h.

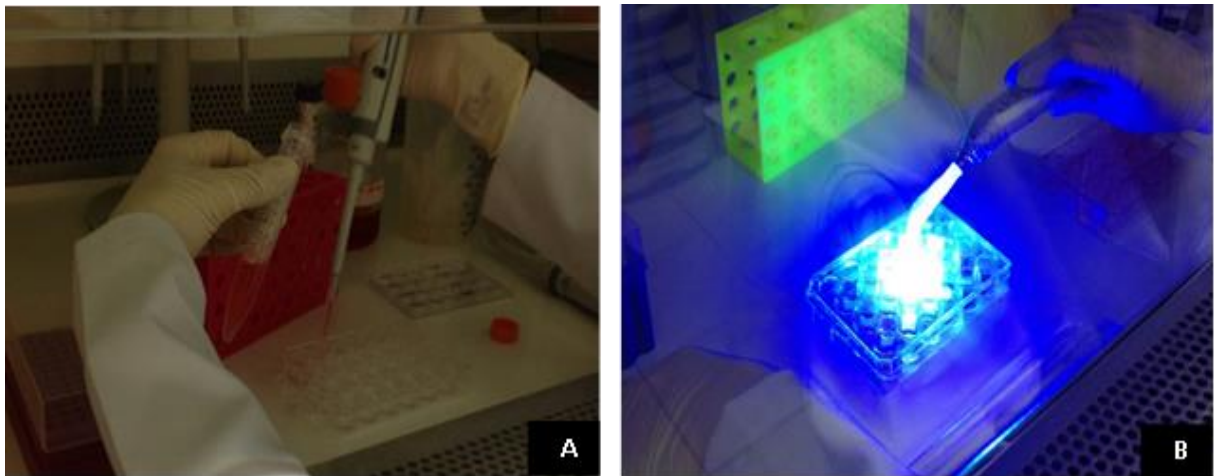
3.4 Terapia fotodinâmica

As soluções do FS curcumina nas concentrações 1000 mg/L e 750 mg/L foram adicionadas nos grupos G5 e G6, respectivamente (Figura 4A). Decorridos 5 minutos (período de pré-irradiação), o FS curcumina foi ativado por luz Led azul de λ de 480 nm, fluência de 75 J/cm², por 4 minutos (Figura 4B).

Antes de iniciar a TFD, foi realizada a aferição da potência emitida em mW/cm² pelo aparelho Led com o Radiômetro VLX365 (Vilbert Lourmat, França), para confirmação da intensidade luminosa.

Durante o período de preenchimento dos poços com o FS, de pré-irradiação e de ativação do Led para realizar a TFD no G5 e G6, a iluminação da câmara de fluxo laminar foi desligada e a luz do ambiente no laboratório foi reduzida, para que não ocorresse algum tipo de degradação do FS curcumina e possíveis interferências nos resultados.

Figura 4 – A – FS curcumina sendo adicionada nos poços. B – FS curcumina ativado por Led azul.



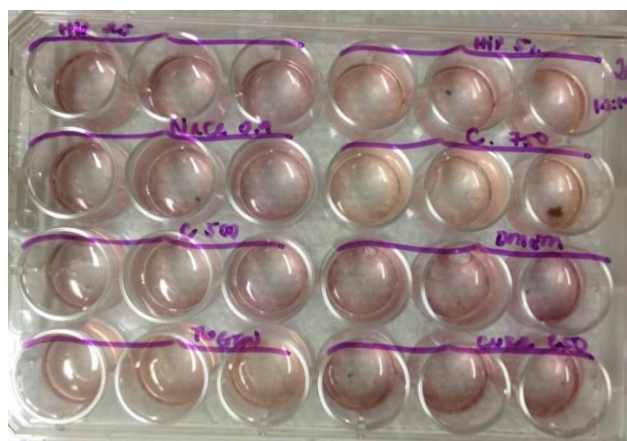
3.5 Análise de viabilidade celular

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico 3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.).

Foram diluídos 5mg de MTT em 1mL de PBS (2,5-difenil brometo de tetrazolium) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.) e filtrados com filtro Millipore 0,22 μm estéril^{32,34}. Posteriormente, 500 μL desta solução de MTT foram diluídos em 4500 μL de meio de cultura DMEM. Então, foram adicionados 200 μL da solução de MTT diluída em meio de cultura nos poços contendo os fibroblastos pós-estímulo.

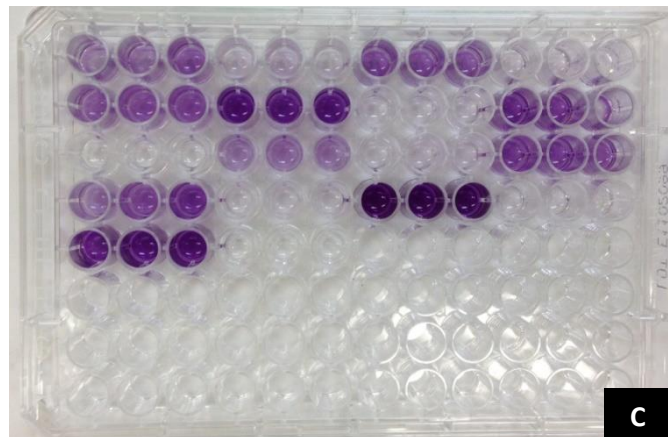
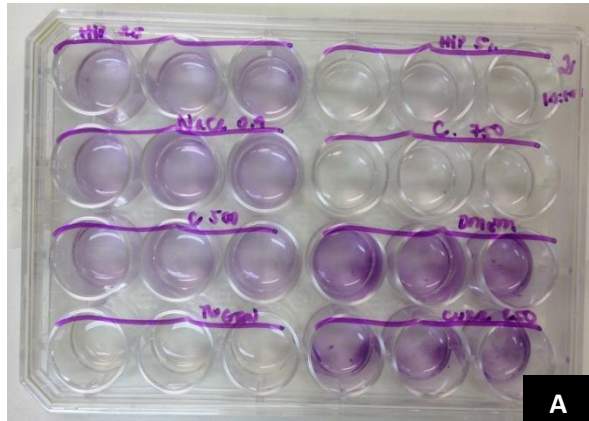
As placas permaneceram incubadas por 4h a 37°C em 5% de CO₂ e, posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada^{32,34} (Figura 5).

Figura 5 – MTT nos poços após período de incubação de 4 horas.



Álcool isopropílico (200 μ L) foi adicionado às células e a placa foi colocada em mesa agitadora, à temperatura ambiente, por 15 minutos para dissolver os cristais azuis (cristais de formazan). A solução azul foi transferida para uma placa de 96 poços (Figura 6A, 6B, 6C) para a leitura da absorbância.

Figura 6 – A – Álcool isopropílico adicionado às células. B – Placa colocada na mesa de agitação. C – Placa de 96 poços para realização da leitura.



Forma de análise
dos resultados

4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

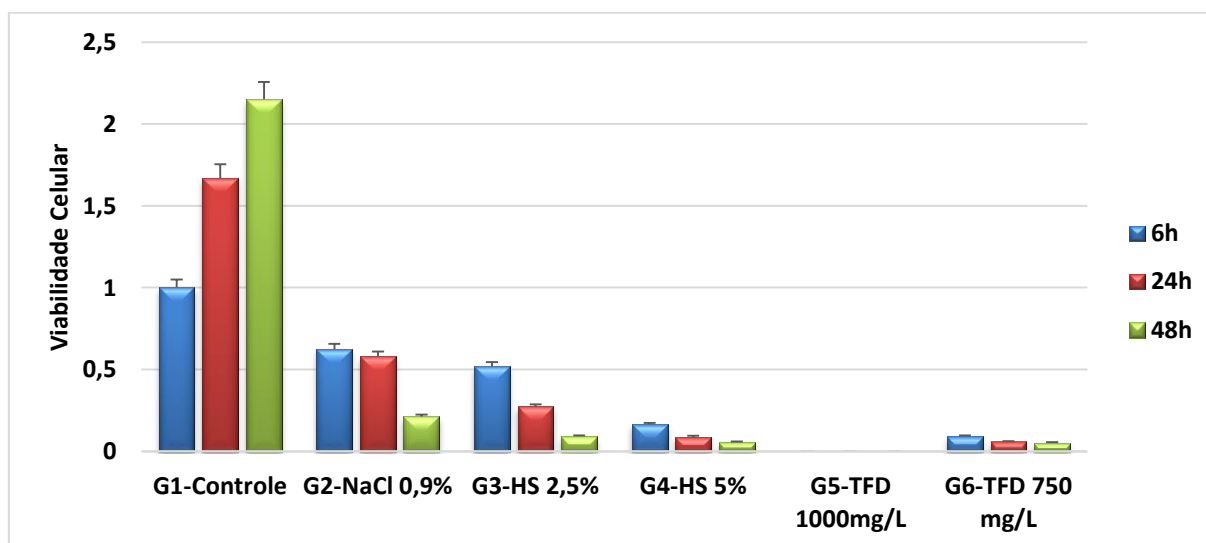
A análise dos resultados da viabilidade das células estimuladas foi feita por espectrofotometria. Foi empregado o espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, EUA) com λ 570 nm para a leitura da absorbância. Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do teste ANOVA, Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA), com correção de BonFerroni ($p < 0,05$).

Resultados

5 RESULTADOS

O grupo controle apresentou diferença estatística significativa com todas as soluções testadas ($p < 0,05$) em todos os períodos de tempo, mostrando-se o grupo menos citotóxico, em relação às demais soluções. Houve diferença estatisticamente significativa do grupo de cloreto de sódio 0,9% com o hipoclorito de sódio 5% e TFD curcumina (1000mg/L e 750 mg/L) no período de 6h ($p < 0,05$), sendo o primeiro menos citotóxico. Assim como, cloreto de sódio 0,9% com o hipoclorito de sódio (2,5% e 5%) e TFD curcumina (1000mg/L e 750 mg/L) no período de 24h ($p < 0,05$) e cloreto de sódio 0,9% com TFD curcumina (1000mg/L) no período de 48h ($p < 0,05$), sendo, em ambos os períodos, o grupo cloreto de sódio 0,9% menos citotóxico também. O hipoclorito de sódio 2,5% apresentou-se menos tóxico que o hipoclorito de sódio 5%, curcumina 1000 mg/L e 750 mg/L em todos os períodos experimentais, entretanto, houve diferença estatística significativa com o hipoclorito de sódio 5% no período de 6h ($p < 0,05$) e curcumina 1000 mg/L e 750 mg/L no período de 24h e 48h ($p < 0,05$). O hipoclorito de sódio 5%, TFD curcumina 1000 mg/L e 750 mg/L foram as soluções mais citotóxicas ($p > 0,05$) em todos os períodos de tempo. Não houve diferença estatística significativa entre TFD curcumina 1000 mg/L e 750 mg/L ($p > 0,05$). (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e soluções irrigadoras nos períodos de 6h, 24h e 48h.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A realização do PBM, juntamente com o uso de soluções irrigadoras, tem por finalidade a limpeza, modelação e descontaminação do SCR⁴⁻⁷. A solução de hipoclorito de sódio é amplamente utilizada para irrigação dos canais radiculares, e possuiu dentre suas propriedades, a capacidade de dissolução de tecidos orgânicos e neutralização de conteúdo tóxico^{6-8,35}. No entanto, a anatomia complexa do SCR dificulta o acesso em certas áreas para realizar o PBM¹¹⁻¹³. Além disso, mesmo com o avanço tecnológico dos instrumentos endodônticos, os MO podem sobreviver mesmo depois do PBM, sendo estes responsáveis pela manutenção da infecção e consequente insucesso do tratamento endodôntico^{36,37}. Logo, inovações nas modalidades terapêuticas devem ser investigadas com a intenção de erradicar as infecções endodônticas.

A terapia fotodinâmica surge na Endodontia como um recurso coadjuvante para potencializar a desinfecção do SCR, principalmente com relação aos MO resistentes ao tratamento endodôntico^{27,38-41}.

Estudos sobre a citotoxicidade da TFD na Endodontia são escassos e são eles que vão nos permitir verificar os efeitos de substâncias ou procedimentos em nível celular, além de possibilitar a avaliação do comportamento das células em ambiente controlado de forma simples, rápida e precisa³². Recentemente, analisamos a citotoxicidade do FS curcumina na concentração de 500 mg/L e o resultado obtido foi que a TFD nesta concentração não foi citotóxica, deixando viáveis as células testadas³³. De acordo com esse resultado, despertou-nos um interesse em investigar uma maior concentração do FS curcumina, em que teremos uma maior atividade antimicrobiana, portanto, a literatura carece desta resposta.

As soluções irrigadoras empregadas foram o hipoclorito de sódio a 2,5% e 5%, além do cloreto de sódio 0,9%, em que realizamos o ensaio MTT com células de linhagem de fibroblastos L-929^{32,42}, em todos os grupos experimentais de acordo com Gomes-Filho et al. (2016)³³.

A escolha do FS curcumina nas concentrações de 1000 mg/L e 750 mg/L teve o intuito de se obter resultados com uma concentração elevada de curcumina, visto que, esta apresenta grande potencial antimicrobiano^{28,29}. Entretanto, os resultados do presente estudo mostraram que a concentração de curcumina de 1000

mg/L foi muito citotóxica, ao ponto de não permitir que houvesse viabilidade celular, e a concentração de 750 mg/L reduziu significativamente o número de células viáveis, diferentemente dos resultados encontrados na concentração de 500 mg/L, que apresentaram viabilidade celular^{33,43}.

As concentrações do FS curcumina de 1000 mg/L e 750 mg/L, seguiram os mesmos protocolos de ativação encontrados na literatura^{33,44}, com Led azul de λ 480 nm por 4 minutos.

Para a realização do efeito fotodinâmico propriamente dito, houve um período de pré-irradiação do FS curcumina de 5 minutos, e posteriormente, 4 minutos de ativação de Led azul, λ 480 nm, fluência de 75 J/cm², nos grupos G5 e G6, de acordo outros estudos^{33,43}.

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstraram que a TFD (G5 e G6), foi citotóxica nos períodos de 6h, 24h, 48h, ($p < 0.05$), principalmente quando comparados aos grupos controle e cloreto de sódio 0,9% (G1 e G2). O G5 apresentou nos resultados a menor a viabilidade celular (muito tóxica), em todos os tempos testados (6h, 24h, 48h). Estes achados divergem de Gomes-Filho et al. (2016)³³, que encontrou viabilidade celular, contudo, com o FS curcumina a 500mg/L.

Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos que comparem as diferentes concentrações do FS curcumina com nossos resultados.

As soluções de hipoclorito de sódio (G3 e G4) foram citotóxicas, concordando estudos anteriores^{33,45}, porém a viabilidade celular foi maior, quando comparadas ao G5 e G6. Estes resultados podem ser explicados devido às propriedades químicas do NaOCl como capacidade de dissolver o tecido orgânico^{46,47} e sua toxicidade devido ao recrutamento do número expressivo de células inflamatórias⁶.

Além disso, os resultados também evidenciaram que a TFD com o FS curcumina 750 mg/L (G6) obteve resultados semelhantes, quando comparada com a solução de hipoclorito de sódio 5% (G4) ($p > 0.05$), em relação à viabilidade celular, nos três períodos experimentais observados.

Embora as concentrações do FS curcumina de 750 mg/L e 1000mg/L apresentem elevado potencial antimicrobiano, estas demonstraram, neste estudo, ter alto grau de citotoxicidade.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos, podemos concluir que a terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador curcumina 1000 mg/L não obteve viabilidade celular em cultura de fibroblastos L-929. A solução de cloreto de sódio 0,9%, a TFD com curcumina 750 mg/L e o hipoclorito de sódio (2,5% e 5%) reduziram a viabilidade celular.

Referências

REFERÊNCIAS

1. HOLLAND, R.; OTOBONI FILHO, J.A.; DE SOUZA, V.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.; DEZAN JUNIOR, E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2003; 29:121-4.
2. WU, M.K.; DUMMER, P.M.; WESSELINK, P.R. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006;39:343-56.
3. LIN, L.M.; RICUCCI, D.; LIN J.; ROSENBERG, P.A. Nonsurgical root canal therapy of large cyst-like inflammatory periapical lesions and inflammatory apical cysts. *J Endod* 2009;35:607-15.
4. GUO, J.; YANG, D.; OKAMURA, H.; TERAMACHI, J.; OCHIAI, K.; QIU, L.; HANEJI, T. Calcium hydroxide suppresses *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide-induced bone destruction. *J Dent Res* 2014;93:508-13.
5. FERREIRA, N.S.; MARTINHO, F.C.; CARDOSO, F.G.; NASCIMENTO, G.G.; CARVALHO, C.A.; VALERA M.C. Microbiological Profile Resistant to Different Intracanal Medications in Primary Endodontic Infections. *J Endod* 2015;41:824-30.
6. GOMES-FILHO, J.E.; AURÉLIO, K.G.; COSTA, M.M.; BERNABÉ, P.F. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci* 2008;16:137-44.
7. TANOMARU FILHO, M.; LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A. Effect of irrigation solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod* 2002; 28:295-9.

8. ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.; DECURCIO, D.A.; HOLLANDA, A.C.; SILVA, J.A. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007; 40:85-93.
9. IQBAL, M.; KURTZ, E.; KOHLI, M. Incidence and factors related to flare-ups in a graduate endodontic programme. *Int Endod J* 2009;42:99-104.
10. DEL CARPIO-PEROCHENA, A.; BRAMANTE, C.M.; ANDRADE, F.B.; MALIZA, A.G.; CAVENAGO, B.C.; MARCIANO, M.A.; AMOROSO-SILVA, P.; DUARTE, M.H. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig* 2015;19:2067-73.
11. SILVA, L.A.B.; NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; PANSANI, C.A. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.
12. RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J.F. Jr.; LOPES, W.S.; VIEIRA, A.R.; RÔÇAS, I.N. Extraradicular infection as the cause of persistent symptoms: a case series. *J Endod* 2015;41:265-73.
13. ANTUNES, H.S.; RÔÇAS, I.N.; ALVES, F.R.; SIQUEIRA, J.F. Jr. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. *J Endod* 2015;41:1037-42.
14. BERBERT, F.L.; SIVIERI-ARAUJO, G.; RAMALHO, L.T.; PEREIRA, S.A.; RODRIGUES, D.B.; DE ARAÚJO, M.S. Quantification of fibrosis and mast cells in the tissue response of endodontic sealer irradiated by low-level laser therapy. *Lasers Med Sci* 2011;26:741-7.
15. SIVIERI-ARAUJO, G.; BERBERT, F.L.C.V.; RAMALHO, L.T.O.; RASTELLI, A.N.S.; CRISCI, F.S.; BONETTI-FILHO, I.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of red and infrared low-level laser therapy in endodontic sealer on subcutaneous tissue. *Laser Phys* 2011; 21:1-7.

16. ALLISON, R.R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24-9.
17. ALVES, E.; FAUSTINO, M.A.; NEVES, M.G.; CUNHA, A.; TOME, J.; ALMEIDA, A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem* 2014;6:141- 64.
18. VOLLET-FILHO, J.D.; MENEZES, P.F.C.; MORIYAMA, L.T.; GRECCO, C.; SIBATA, C.; ALLISON, R.R.; CASTRO-E-SILVA, O.; BAGNATO, V.S. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. *J Appl Phys* 2009;105:1020381-7.
19. BUZZA, H.H.; SILVA, L.V.; MORIYAMA, L.T.; BAGNATO, V.S.; KURACHI, C. Evaluation of vascular effect of Photodynamic Therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 2014;138:1-7.
20. REGO-FILHO, F.G.; DE ARAUJO, M.T.; DE OLIVEIRA, K.T.; BAGNATO, V.S. Validation of Photodynamic Action via Photobleaching of a New Curcumin-Based Composite with Enhanced Water Solubility. *J Fluoresc* 2014;24:1407-13.
21. ALLISON, R.R.; SIBATA, C.H. Photodynamic therapy: mechanism of action and role in the treatment of skin disease. *G Ital Dermatol Venereol* 2010;145:491-507.
22. ALLISON, R.R.; MOGHISSI, K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013;10:331-41.
23. YILDIRIM, C.; KARAARSLAN, E.S.; OZSEVIK, S.; ZER, Y.; SARI, T.; USUMEZ, A. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent* 2013;7:469-73.

24. KOMINE, C.; TSUJIMOTO, Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2013;39:411-4.
25. KLEPAC-CERAJ, V.; PATEL, N.; SONG, X.; HOLEWA, C.; PATEL, C.; KENT, R.; AMIJI, M.M.; SOUKOS, N.S. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers Surg Med* 2011;43:600-6.
26. GARCEZ, A.S.; NUÑEZ, S.C.; HAMBLIM, M.R.; SUZUKI, H.; RIBEIRO, M.S. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod* 2010;36:1463-6.
27. SILVA, L.A.; NOVAES, A.B. Jr.; OLIVEIRA, R.R. et al. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 2012;38:360-6.
28. CHANG, Y.F.; CHUANG, H.Y.; HSU, C.H.; LIU, R.S.; GAMBHIR, S.S.; HWANG, J.J. Immunomodulation of Curcumin on Adoptive Therapy with T Cell Functional Imaging in Mice. *Cancer Prev Res* 2012;5:444-52.
29. SHAHZAD, M.; SHERRY, L.; RAJENDRAN, R.; EDWARDS, C.A.; COMBET, E.; RAMAGE, G. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:269-73.
30. WANG, Z.; ZHANG, Q.; YUAN, L.; WANG, S.; LIU, L.; YANG, X.; LI, G.; LIU, D. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Behav Brain Res* 2014;274:282-90.
31. BRANDI, G.; TAVOLARI, S.; GUARNIERI, T.; DI MARCO, M.; PATERINI, P.; MACCHINI, M.; DI GIROLAMO, S.; PAPI, A.; DE ROSA, F.; BIASCO, G. Antiprotease strategy in pancreatic cancer treatment: emergence from a preclinical study. *Pancreas* 2014;43:53-63.

32. GOMES-FILHO, J.E.; WATANABE, S.; GOMES, A.C.; FARIA, M.D.; LODI, C.S.; PENHA OLIVEIRA, S.H. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod* 2009;35:1577-9.
33. GOMES-FILHO, J.E.; SIVIERI-ARAUJO, G.; SIPERT, C.R.; DA SILVA SANTOS, L.M.; DE AZEVEDO QUEIROZ, I.O.; MEN MARTINS, C.; DO CARMO MAIA, N.K.; CINTRA, L.T.; DEZAN-JUNIOR, E.; BAGNATO, V.S.; CHAVES-NETO, A.H.; DE OLIVEIRA, S.H. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016;13:97-100.
34. MALHEIROS, C.F.; MARQUES, M.M.; GAVINI, G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod* 2005;31:746-8.
35. GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; MORGENTAL, R.D.; FLUMIGNAN, D.L.; GASPARINI, F.; OLIVEIRA, J.E.; TANOMARU-FILHO, M. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:132-5.
36. NAIR, P.N.; HENRY, S.; CANO, V. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99:231-52.
37. NAIR, P.N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39:249-81.
38. SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibiofilm efficacy of photosensitizer-functionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. *J Endod* 2014;40:1604-10.
39. ASNAASHARI, M.; GODINY, M.; AZARI-MARHABI, S.; TABATABAEI, F.S.; BARATI, M. Comparison of the Antibacterial Effect of 810 nm Diode Laser and Photodynamic Therapy in Reducing the Microbial Flora of Root Canal in

Endodontic Retreatment in Patients With Periradicular Lesions. *J Lasers Med Sci* 2016;7:99-104.

40. SIVIERI-ARAUJO, G. Influência de diferentes soluções irrigadoras associadas à terapia fotodinâmica: estudo in vitro e in vivo. [Projeto de Pós-Doutorado - FAPESP]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP; 2012-2014.
41. SIVIERI-ARAUJO, G.; QUEIROZ, I.O.A.; DEL FABBRO, R.; ESTEVES, F.; CINTRA, L.T.A.; DUARTE, P.C.T.; BAGNATO, V.S.; OLIVEIRA, S.H.P.; GOMES-FILHO, J.E. Rat tissue reaction and cytokine production induced by photodynamic therapy and irrigating solutions. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017;18:315-100.
42. GOMES-FILHO, J.E.; GOMES, A.C.; WATANABE, S.; OLIVEIRA, S.H.; BERNABÉ, P.F.; PERCINOTO, C. Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus. *J Appl Oral Sci* 2011;19:329-36.
43. ARAÚJO N.C.; FONTANA, C.R.; GERBI, M.E.M.; BAGNATO, V.S. Overall-mouth disinfection by photodynamic therapy using curcumin. *Photomedicine and Laser Surgery* 2012;30:96-101.
44. PASCHOAL, M.A.; TONON, C.C.; SPOLIDÓRI, D.M.; BAGNATO, V.S.; GIUSTI, J.S.; SANTOS-PINTO, L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013;10:313-9.
45. SIMBULA, G.; DETTORI, C.; CAMBONI, T.; COTTI, E. Comparison of tetraacetylenediamine + sodium perborate and sodium hypochlorite cytotoxicity on L929 fibroblasts. *J Endod* 2010;36:1516-20.
46. HOLLAND, R.; SOARES, I.J.; SOARES. Influence of irrigation and intracanal dressing on the healing process of dogs' teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8:223-9.

47. TARTARI, T.; GUIMARÃES, B.M.; AMORAS, L.S.; DUARTE, M.A.; SILVA E SOUZA, P.A.; BRAMANTE, C.M. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *Int Endod J* 2015;48(4):399-404.