



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Campus de Araçatuba

MURILO SILVA DE OLIVEIRA

**Influência da Terapia Fotodinâmica com Azul de Metileno na
Dentina Radicular: Estudo das Propriedades Mecânicas
(dureza e módulo de elasticidade)**

Araçatuba

2017

MURILO SILVA DE OLIVEIRA

Influência da Terapia Fotodinâmica com Azul de Metileno na Dentina Radicular: Estudo das Propriedades Mecânicas (dureza e módulo de elasticidade)

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

Orientador: Prof Dr. Gustavo Sivieri de Araújo

Co-orientador: Prof Adj Dr. Paulo Henrique dos Santos

Araçatuba

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, por sempre ter me guiado e abençoado durante a minha caminhada, pela família que me deu e por todas as oportunidades concedidas, portas que foram fechadas e novas que se abriram para algo muito melhor.

Aos meus Pais, **Raul e Luciana**, minha eterna gratidão por tudo, sem o esforço de vocês com certeza eu não estaria escrevendo esse trabalho. Obrigado por facilitarem e batalharem junto comigo pelos meus sonhos, vocês são meus exemplos de vida, amo vocês demais!

À minha Família, especialmente meus avós, **José de Oliveira e Laudine, José e Maria José**, obrigado por auxiliarem meus pais quando precisaram, e além disso, por serem sempre um porto seguro para mim. **Vô Oliveira**, saudade eterna.

Aos meus Amigos de Brotas, **Danilo Barreto, Filipe Checco, Luís Henrique Rampasso, Thales Sgorlon, Rafael Rampasso**, que caminharam comigo desde pequenos, mostraram o real valor de uma amizade verdadeira que perdura ao longo de muito tempo, a vocês também, o meu muito obrigado.

À minha amada **Anna Clara Mendes**, que me mostra diariamente o significado da palavra “companheirismo”, obrigado por dividir e me acompanhar em todos os meus dias, exemplo de pessoa, coração que não cabe no peito e que me proporciona uma força incrível, maravilhosa seria um adjetivo pequeno pra você. Gratidão por ter você comigo, te amo!

À **República Seis de Paus**, que foi minha casa nesses cinco anos de graduação, **Murilo Cestari, Vitor Shimada, Rodrigo Cosin, Vinicius Oliveira**, fundadores dessa república, muito obrigado por cada experiência de vida trocada, cada um de vocês mora no meu coração, aprendi muito dividindo o mesmo teto com vocês, desejo que cada um tenha muito sucesso nessa caminhada da vida, que vocês construam suas famílias e que Deus abençoe grandemente cada um.

Aos amigos que a **Graduação** me proporcionou, **Danielle Almeida, Leandro Bonfietti, Jessica Cordeiro, Amanda Valente, Juliana Nobre, Diego Sakaguchi, Gabriel Carrijo, Leonardo Raniel, Heitor Cecílio, Afonso Castro, Gabriel Nunes e Wiliam Jacometo**, vou levar cada um de vocês comigo, obrigado por se tornarem especiais, muita luz na caminhada de vocês.

Aos já Cirurgiões Dentistas, **Lucas Silveira, Laura Molinar, Fábio Salomão, Carlos Bueno, Vanessa Dreibi e Marjorie Gallinari**, obrigado por compartilharem suas experiências de vida e profissional, se tornaram amigos especiais e moram no meu coração, sei que posso contar com cada um de vocês, mesmo os que estão longe, lutando pelos seus sonhos. Todo sucesso do mundo pra vocês.

Aos companheiros de trabalho, **Paloma Pereira e Henrico Strazi**, esse trabalho também é de vocês, obrigado pelo empenho apresentado durante as etapas. Tenho certeza que conheci um pouquinho a mais de cada um nesse tempo e só fica a certeza de que terão muito sucesso e profissionalismo na vida de vocês, obrigado por tudo!

Ao **Professor Dr. Gustavo Sivieri**, pela oportunidade de realizar esse trabalho, onde me mostrou uma realidade totalmente diferente em relação a quem simplesmente só faz a graduação, sem passar pelos projetos realizados nos departamentos e em toda a pós-graduação. Desejo muitas conquistas em sua trajetória, que realize todos os seus sonhos. Muito obrigado pelo aprendizado.

Aos Professores, **Eloi Dezan e Ricardo Okida**, por se tornarem muito mais que professores, são amigos que fiz e escolhi como banca avaliadora deste trabalho, obrigado pela disponibilidade, sucesso na caminhada e muita paz. Obrigado

Agradeço à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - PROPe-UNESP (**Edital Primeiros Projetos 12/2015-PROPe**), pela aprovação e concessão deste Edital (Auxílio Pesquisa e Bolsa de Iniciação Científica), que proporcionou a realização deste importante Projeto de Pesquisa.

Agradeço ao Professor Adjunto Juno Gallego do Departamento de Engenharia Mecânica, da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira-UNESP pelo emprego do ultramicrodurômetro digital DUH-211 (Shimadzu).

"Eu te desejo não parar tão cedo, pois, toda idade tem prazer e medo, e com os que erram feio e bastante, que você consiga ser tolerante. Quando você ficar triste, que seja por um dia e não o ano inteiro e que você descubra que rir é bom, mas que rir de tudo é desespero. Desejo, que você tenha a quem amar e quando estiver bem cansado, ainda exista amor pra recomeçar. Eu te desejo muitos amigos, mas, que em um você possa confiar e que tenha até inimigos pra você não deixar de duvidar. Desejo que você ganhe dinheiro, pois, é preciso viver também e que você diga a ele pelo menos uma vez quem é o dono de quem".

Frejat

OLIVEIRA, M.S. **Influência da terapia fotodinâmica com azul de metileno na dentina radicular: estudo das propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade)**. 2017. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

Nos últimos anos, fortes evidências demonstram o sucesso da terapia fotodinâmica (TFD) na redução microbiana, entretanto não há estudos da influência da TFD nas propriedades mecânicas da dentina radicular. A TFD se baseia num conjunto de procedimentos físicos, químicos e biológicos, que ocorrem após a administrar um agente fotossensibilizador (FS) ativado por meio de luz visível (Laser ou Led) de comprimento de onda específico, com intenção de destruir a célula-alvo. O objetivo do presente estudo foi avaliar por meio da análise das propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade), a influência da TFD na dentina radicular empregando o FS azul de metileno. Foram utilizados 40 dentes bovinos, que foram radiografados com intuito de auxiliar na confirmação da integridade de toda a estrutura dentária. A coroa dos dentes foi cortada 1 mm acima da junção amelocementária e o preparo biomecânico do canal radicular foi feito por meio do transpasse de uma broca cirúrgica nº 703 no sentido coroa-ápice e vice-versa. Após a irrigação final com hipoclorito de sódio a 1%, os canais radiculares foram aspirados com cânulas endodônticas e secos com cones de papel absorventes estéreis # 80. Foram distribuídos em 5 grupos (n=8) de acordo com o FS utilizado: G1-Água deionizada (controle); G2- FS azul de metileno 0,005%; G3- FS azul de metileno 0,005% + Laser vermelho 660nm (TFD) 1 minuto; G4- FS azul de metileno 0,01%; G5- FS azul de metileno 0,01% + Laser vermelho 660nm (TFD) 1 minuto. Foi utilizada uma fibra óptica flexível de diâmetro de 300 µm, levada a 2mm aquém do comprimento real de trabalho (CRT) no G3 e G5. Todos os 4 grupos (G2 ao G5) receberam o FS azul de metileno, por um período de 3 minutos (período de pré-irradiação), sendo estes agitados por 60 segundos com ultrassom (irrigação passiva - sem refrigeração), na escala de potência 2 para Endodontia com auxílio de uma lima K # 25 a 2mm aquém do CRT. Posteriormente, os espécimes foram cortados perpendicularmente ao longo eixo, com disco diamantado montado em cortadeira de precisão Isomet 2000, obtendo-se uma fatia de aproximadamente 1,3mm de cada terço a ser analisado (terços cervical, médio e apical). As propriedades mecânicas de dureza e módulo de elasticidade foram mensuradas nas estruturas dentárias radiculares em ultramicrodurômetro digital DUH-211 (Shimadzu), sob ação de carga de 3mN, nos diferentes terços da dentina intrarradicular. Os dados das propriedades mecânicas foram submetidos ao

teste de normalidade e as médias comparadas pela Análise de Variância e teste de Friedman ($\alpha=0,05$). Os resultados para a dureza Martens mostrou que não houve diferença estatística significativa quando comparou-se os terços (cervical, médio e apical), de todos os grupos experimentais ($p>0,05$). Não foi encontrado diferença estatisticamente significativa nos resultados da análise do módulo de elasticidade nos terços (cervical, médio e apical) e em nenhum dos grupos experimentais ($p>0,05$). Podemos concluir que a terapia fotodinâmica com fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações empregadas e nos parâmetros do Laser utilizados, não influenciou nas propriedades mecânicas de dureza Martens e módulo de elasticidade nos diferentes terços da dentina radicular.

Palavras-chave: Tratamento do canal radicular, terapia fotodinâmica, azul de metileno, dureza, módulo de elasticidade.

OLIVEIRA, M.S. **Influence of photodynamic therapy with methylene blue on root dentin: study of mechanical properties (hardness and modulus of elasticity)**. 2017. 29 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Through the past years, strong evidence has demonstrated the success of photodynamic therapy (PDT) in decreasing the microbial load. However, there are no studies concerning the influence of PDT on the mechanical properties of root dentin. The PDT is based on a set of physical, chemical and biological procedures that occur after administration of a specific wavelength-activated photosensitizing agent (FS), with the objective of destroying specific cells. The aim of the present study was to evaluate the influence of PDT on root dentin using the methylene blue FS (MPS), analyzing the dentin mechanical properties (hardness and elastic modulus). Forty bovine teeth were used in this study, initially radiographed in order to confirm the integrity of the entire dental structure. The crown was cut 1 mm above the cement-enamel junction and the root canal biomechanical preparation was performed with the aid of a surgical bur n° 703 in the crown-apex direction and vice versa. After the final irrigation with 1% sodium hypochlorite, the root canals were aspirated with endodontic cannulas and dried with sterile absorbent paper cones #80. Then, distributed in 5 groups (n = 8) according to the FS used: G1- Deionized water (control); G2-FS methylene blue 0.005%; G3- FS methylene blue 0.005% + 660nm red laser (TFD) 1 minute; G4-FS methylene blue 0.01%; G5- FS methylene blue 0.01% + 660nm red laser (TFD) 1 minute. A flexible optical fiber of 300 µm diameter was used, until 2 mm before the working length (WL) in G3 and G5. All 4 groups (G2 to G5) received methylene blue FS for 3 minutes (pre-irradiation period), agitated for 60 seconds with ultrasound (passive irrigation - no refrigeration) with the power scale for Endodontics set as 2, using a K #25 file also 2mm before the WL. Afterwards, the specimens were cut perpendicularly to the long axis, with a diamond disk on an Isomet 2000 precision cutter, obtaining a slice of approximately 1.3mm of each third (cervical, middle and apical) to be analyzed. The mechanical hardness and elastic modulus properties were measured in the root structures in a DUH-211 digital ultramicrodurometer (Shimadzu) under 3mN in the different thirds of the intra-radicular dentine. Mechanical properties data were submitted to the normality test and the means were compared by Analysis of Variance and Friedman test ($\alpha = 0.05$). The results for hardness properties showed no significant statistical difference when comparing the thirds (cervical, middle and apical) of

all experimental groups ($p > 0.05$). Also, no statistically significant difference was found in the results of the elastic modulus analysis in the thirds (cervical, middle and apical) and in none of the experimental groups ($p > 0.05$). It can be concluded that the photodynamic therapy, with methylene blue photosensitizer at the concentrations used and the laser parameters, did not influence the mechanical properties of Martens hardness and elastic modulus in the different thirds of the root dentin.

Keywords: Root canal treatment, photodynamic therapy, methylene blue, hardness, elastic modulus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Dente Bovino.....	15
Figura 2- Remoção da polpa coronária e radicular com lima tipo K #60.....	15
Figura 3- Irrigação do canal radicular com hipoclorito de sódio a 1%.....	16
Figura 4- Ápice selado com resina composta.....	16
Figura 5a- Azul de Metileno 0,005%.....	17
Figura 5b- Azul de Metileno 0,01%.....	17
Figura 6- Agitação do FS azul de metileno com ultrassom.....	17
Figura 7- Laser vermelho com auxílio de uma fibra óptica flexível 2mm aquém do CRT.....	18
Figura 8- Espécimes cortados.....	19
Figura 9- Fatia Embutida em resina acrílica.....	19
Figura 10- Lixas abrasivas de granulação 320, 600, 800 e 1200.....	19
Figura 11- Imagem microscópica da indentação realizada em Dentina intrarradicular.....	20
Figura 12- Pastas diamantadas (1, 3 e 6 μ m)	20
Figura 13- Ultramicrodurômetro Digital DUH211.....	21

LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

Quadro 1 - Distribuição dos grupos, em função da TFD.....	16
Gráfico 1 - Dureza Martens da dentina radicular em função do fotossensibilizador ou terapia fotodinâmica nos diferentes terços radiculares.....	22
Gráfico 2 - Módulo de elasticidade da dentina radicular em função do fotossensibilizador ou terapia fotodinâmica nos diferentes terços radiculares.....	22

SUMÁRIO

1 Introdução.....	12
2 Objetivos.....	14
3 Materiais e métodos.....	14
3.1 Preparo dos dentes e preparo canal radicular.....	15
3.2 Divisão dos grupos.....	16
3.3 Terapia fotodinâmica.....	16
3.4 Análise das propriedades mecânicas.....	18
4 Forma de análise dos resultados.....	21
5 Resultados.....	21
6 Discussão.....	22
7 Conclusão.....	25
Referências.....	26
Anexo - Comitê de Ética.....	29

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico é de fundamental importância para abolir a infecção do sistema de canais radiculares (SCR) em dentes que apresentam necrose pulpar (1). A erradicação completa da infecção no SCR consiste em um objetivo primordial para o sucesso endodôntico. Estratégias terapêuticas como o preparo biomecânico do canal radicular (PBM) (2), utilização de substâncias irrigadoras como o hipoclorito de sódio (2, 3) e emprego de uma medicação intracanal de hidróxido de cálcio puro ou associado (4-6), reduzem os micro-organismos (MO) e seus produtos tóxicos residuais (endotoxinas e biofilme apical) da infecção endodôntica (2). Apesar disso, estudos mostram que o PBM, associado às soluções irrigadoras e a medicação intracanal, são incapazes de deixar o SCR totalmente livre das bactérias e seus produtos tóxicos (7, 8). Portanto, novas modalidades terapêuticas devem ser constantemente investigadas com intuito de potencializar o combate às infecções endodônticas.

Com o advento do Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e Led (*Light-Emitting Diode*), surgiram inovações aos tratamentos da Área da Saúde (9, 10). Dentre os distintos empregos destes aparelhos, enfatizamos a terapia fotodinâmica (TFD), em língua inglesa, *photodynamic therapy (PDT)*, que fundamenta-se em uma reação local que ocorre após administrar um agente fotossensibilizador exógeno (FS) ativado por meio de uma fonte de luz visível (Laser ou Led) de comprimento de onda (λ) específico ao FS com finalidade terapêutica em um local específico (célula-alvo), que é utilizada nos tratamentos contra câncer, doenças não oncológicas e na redução microbiana (11, 12).

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, propriedades básicas e aplicadas da TFD (13-16). O mecanismo de ação básico se dá quando o FS absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam do estado normal para o mais estimulado. Na presença do oxigênio o FS transfere a energia ao substrato. Ao retornar ao seu estado natural, forma espécies altamente reativas e de vida curta, como o oxigênio singleto ou também chamado de oxigênio singleto, que provoca injúrias locais apenas na célula alvo, como também, aos MO, via oxidação irreversível de componentes celulares nos patógenos (17-19).

Na Endodontia, a TFD é empregada após a execução do PBM e antes da obturação dos canais radiculares, como alternativa para aumentar a desinfecção do SCR. Estudos *in vitro* (19, 20) e *in vivo* (21, 22) demonstraram que a TFD potencializa a desinfecção do canal radicular, tanto na ausência quanto na presença da medicação intracanal empregando azul de metileno ou azul de toluidina como FS.

O azul de metileno também conhecido como cloreto de metiltionínio é um composto químico, desinfetante e antisséptico, empregado como corante ou indicador nas reações de oxirredução (23). Este composto também é utilizado como um dos FS disponíveis para a realização da TFD, possui banda de absorção na faixa de 500 a 700 nm e apresenta picos de absorção máxima entre 609 e 668 nm (24).

Entretanto, estudos correlacionados com as propriedades físicas da TFD na Endodontia dentre eles a análise das propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade), não foram encontrados na literatura pertinente. Logo, estas propriedades físicas da TFD, em especial sua influência na dentina radicular, devem ser pesquisadas.

Os parâmetros mais comuns obtidos nos ensaios de materiais empregando a identificação (caracterização dos materiais odontológicos), são a dureza e o módulo de elasticidade do material (25-29). A dureza é a capacidade da superfície do material em resistir à penetração por uma ponta, sob uma carga específica (30, 31). Já o módulo de elasticidade descreve a relativa rigidez de um material, que pode ser calculado a partir da inclinação da tangente da curva utilizada no cálculo da dureza (32). Estudos que correlacionem a influência da TFD na Odontologia, e em especial na Endodontia, nas propriedades mecânicas da dentina principalmente quanto ao uso do FS azul de metileno, são inexistentes na literatura atual.

Existem questionamentos que precisam ser bem esclarecidos e carecem no presente momento de respostas com evidências científicas para o emprego da TFD na Endodontia. Embora já exista protocolos clínicos sendo preconizados, os benefícios da TFD na Endodontia ainda não foram totalmente estabelecidos cientificamente, principalmente quando utilizada o azul de metileno como FS. Além do mais, trabalhos que investiguem as propriedades mecânicas de dureza e módulo de elasticidade da dentina, em que comparem o emprego da TFD, especialmente quando da utilização do azul de metileno, são inexistentes na Literatura, tornando conveniente a realização deste Projeto de Pesquisa no presente momento.

Desta forma, o estudo das propriedades mecânicas de dureza e módulo de elasticidade da dentina em que será aplicada a TFD, torna este Projeto de Pesquisa oportuno e de grande relevância científica, a fim de constituir melhores embasamentos científicos do assunto

pertinente. A importância circunstancial da necessidade do desenvolvimento deste Projeto de Pesquisa será determinar protocolos mais precisos para o emprego TFD na Endodontia, analisando se há alguma influência ou não desta terapia sobre as propriedades mecânicas de dureza e módulo de elasticidade na dentina radicular, sendo que a relevância destes achados poderão responder os questionamentos atuais. Os resultados podem levar a uma terapia endodôntica distinta das atuais, já que não se conhece se estas propriedades mecânicas de dureza e módulo de elasticidade na dentina radicular podem ser influenciadas pela TFD, constituindo assim o emprego uma modalidade terapêutica embasada cientificamente, que poderão ser especificamente direcionadas e aplicadas para os mecanismos físicos aliados aos biológicos que estão envolvidos nas terapias para a resolução da infecção endodôntica.

2 OBJETIVO

Verificar o efeito da terapia fotodinâmica com fotossensibilizador azul de metileno, avaliando as propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade) na dentina intrarradicular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Processo FOA nº 2015-00690 (item 11-Anexo).

Foram utilizados 40 dentes bovinos (figura 1), com raízes retas, extraídos por razões alheias a esta pesquisa. Os dentes foram avaliados com lupa de 0,75 de diâmetro e 4x de aumento, sob iluminação adequada, de forma a se observar a ausência de trincas e fraturas induzidas pela extração. Os dentes que apresentaram trincas e/ou fraturas foram imediatamente descartados, sendo os demais armazenados em congelador a temperatura de -20°C, até o início do estudo. Os dentes também foram radiografados com intuito de auxiliar na confirmação da integridade de toda a estrutura dentária.



Figura 1 - Dente Bovino.

3.1 Preparo dos dentes e preparo do canal radicular

As coroas dos dentes bovinos foram cortadas 1 mm acima da junção amelocementária vestibular (33), por meio de uma secção transversal, com disco de diamante em cortadeira de precisão Isomet 2000 (Buheler, Lake Bluff, USA) em baixa velocidade, sob refrigeração.

As polpas coronária e radicular foram removidas com uma lima K #60 (figura 2) (Dentsply Maillefer, Petrópolis, RJ, Brasil) e irrigação com hipoclorito de sódio a 1% (Apothecário - Farmácia de Manipulação, Araçatuba, SP, Brasil).

Por se tratar de dente bovino, o canal radicular é amplo, portanto, o PBM foi feito por meio do transpasse de uma broca cirúrgica nº 703 (Jet-Set) no sentido coroa-ápice e vice-versa. Após a irrigação final com hipoclorito de sódio a 1% (figura 3), os canais radiculares foram aspirados com cânulas endodônticas e secos com cones de papel absorventes estéreis # 80.

Os dentes foram acondicionados em uma gaze úmida com soro fisiológico a 0,9% durante todo o preparo. Depois do preparo, os dentes foram radiografados e armazenados em 100% de umidade, a 37°C, durante um período de 7 dias.



Figura 2 - Remoção da polpa coronária e radicular com lima tipo K #60.



Figura 3 - Irrigação do canal radicular com hipoclorito de sódio a 1%.

3.2 Divisão dos grupos

Os dentes foram distribuídos de forma aleatória em cinco grupos experimentais (n=8), para receberem ou não a TFD (Quadro 1):

Quadro 1 - Distribuição dos grupos, em função da TFD.

Grupos Experimentais	Terapia Fotodinâmica
G1	Água deionizada (controle)
G2	FS azul de metileno 0,005%
G3	FS azul de metileno 0,005% + Laser vermelho 660nm (TFD)
G4	FS azul de metileno 0,01%
G5	FS azul de metileno 0,01% + Laser vermelho 660nm (TFD)

3.3 Terapia fotodinâmica

Em todos os grupos foi realizada a odontometria 1mm aquém do ápice radiográfico para determinação do CRT (34). Após a odontometria os ápices foram selados com resina composta (Figura 4), com intuito de vedar o ápice para não deixar que o FS seja extravasado.



Figura 4 - Ápice selado com resina composta.

O G1 (controle) foi preenchido com água deionizada e não recebeu FS, como também não foi realizada a TFD. Nos grupos G2 e G3 os canais radiculares foram preenchidos com o FS azul de metileno 0,005% (figura 5a). Os grupos G4 e G5 foram preenchidos com o FS azul de metileno 0,01% (figura 5b).

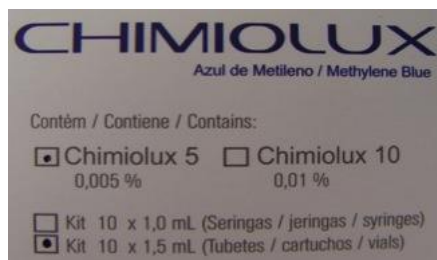


Figura 5a - Azul de Metileno 0,005%.

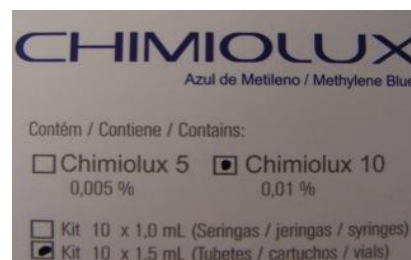


Figura 5b - Azul de Metileno 0,01%.

Todos os 4 grupos (G2 ao G5) receberam o FS azul de metileno, por um período de 3 minutos (período de pré-irradiação) (21), sendo estes agitados por 60 segundos com ultrassom (Jet-Sonic Four Plus, Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (figura 6), a irrigação passiva do ultrassom (sem refrigeração), na escala de potência 2 para Endodontia com auxílio de um inserto ultrassom co Irrisonic E1 (Helse Dental Technology, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil), (35). Todo esforço foi feito para minimizar o contato da ponta de ultrassom com as paredes dos canais radiculares e promover a agitação do FS (35).

Nos grupos G2 e G4, após o período de pré-irradiação, foi realizada a irrigação final dos canais radiculares com 10mL de água deionizada para remoção do FS e posteriormente secagem com cânulas de aspiração e pontas de papel absorvente # 80.



Figura 6 - Agitação do FS azul de metileno com ultrassom.

Nos grupos experimentais G3 e G5 foi realizada a TFD. O FS azul de metileno foi ativado por Laser vermelho 660nm por 1 minuto (21), com auxílio de uma fibra óptica flexível de diâmetro de 300 μm , levada a 2mm aquém do CRT (21, 34), (Figura 7). Utilizamos movimentos helicoidais no sentido ápico-cervical, com a fibra óptica para difusão uniforme da luz por toda a extensão do canal radicular (34, 36), criando melhores

possibilidades de entrega da luz no SCR. Os movimentos foram repetidos aproximadamente 10 vezes/minuto (42).



Figura 7 - Laser vermelho com auxílio de uma fibra óptica flexível 2mm aquém do CRT.

Antes do emprego do Laser foi realizada com Radiômetro VLX365 (Vilbert Lourmat, França) a aferição da potência emitida em mW/cm^2 para confirmação se a intensidade luminosa estava correta.

Durante o período de pré-irradiação do FS e também durante a ativação do Laser para realizar a TFD, a iluminação do ambiente no laboratório foi reduzida, para que não houvesse algum tipo de degradação do FS azul de metileno e possíveis interferências nos resultados. Imediatamente após a realização da TFD no G3 e G5, foi realizada a irrigação final dos canais radiculares com 10mL de água deionizada para remoção do FS e posteriormente secagem com cânulas de aspiração e pontas de papel absorvente # 80.

3.4 Análises das propriedades mecânicas

Após o emprego da TFD ou apenas do FS, todos os dentes foram armazenados em água destilada por 7 dias (37, 38).

Os espécimes foram cortados perpendicularmente ao longo eixo, com disco diamantado montado em cortadeira de precisão Isomet 2000, obtendo-se uma fatia de aproximadamente 1,3mm de cada terço a ser analisado (Figura 8), (terços cervical, médio e apical) (28, 29).

As fatias foram embutidas em resina acrílica (Clássico, São Paulo, SP, Brasil), (Figura 9), posteriormente desgastadas manualmente com lixas abrasivas de granulação 320, 600, 800 e 1200 (Figura 10), (Extex Corp, Enfield, CT, USA) e depois polidas com pastas diamantadas (6, 3 e $1\mu\text{m}$) por um período de 4 minutos cada etapa (Figura 11). As amostras foram limpas

em cuba ultrassônica (modelo 2210, Branson Ultrasonic Corp., Danbury CT, USA) com água deionizada durante 2 minutos entre as lixas e pastas e ao final do processo (25, 28, 29).



Figura 8 - Espécimes cortados.

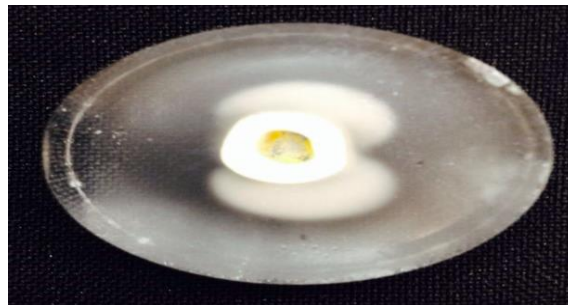


Figura 9 - Fatia Embutida em resina acrílica.

A superfície dental preparada foi conduzida ao Ultramicrodurômetro Digital DUH211 (Shimadzu, Kyoto, Japão), (Figura 12) para verificação da dureza Martens (HM) e módulo de elasticidade (Eit), sob ação de carga de 3mN a uma velocidade de 0,2926mN/s, com tempo de manutenção de carga de 5 segundos, em cada região de dentina analisada: terço cervical, médio e apical. A ponta indentadora utilizada foi a Vickers, e foram realizadas três leituras em cada região (28, 29).



Figura 10 - Lixas abrasivas de granulação 320, 600, 800 e 1200.

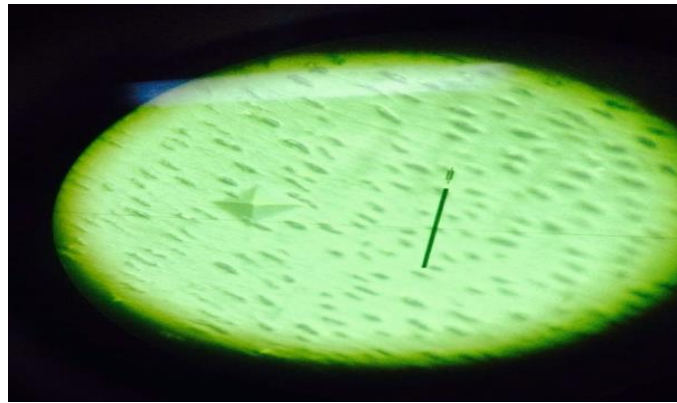


Figura 11- Imagem microscópica da indentação realizada em Dentina intrarradicular.



Figura 12 - Pastas diamantadas (1, 3 e 6μm).

Essas grandezas foram obtidas a partir de um ciclo completo de carregamento e descarregamento de cargas. A dureza Martens (HM) é definida como a carga máxima ($P_{máx}$) dividida pela área projetada da impressão de contato (A):

$$HM = \frac{P_{máx}}{A}$$

O módulo de elasticidade (E_{it}) é calculado segundo a equação:

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1-\nu^2)}{E_{it}} + \frac{(1-\nu_i^2)}{E_i}$$

Onde ν e ν_i são respectivamente, os coeficiente de Poisson (definida como a razão entre as deformações específicas transversal e longitudinal) da amostra e do identador; e E_i

é o módulo de elasticidade do indentador. No nosso caso, $v_i=1141\text{GPa}$ e $v_i=0,07$. O módulo de elasticidade reduzido (E_r) é calculado pela seguinte equação:

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi} S}{2\sqrt{A}}$$

Onde (A) é a área projetada pela impressão de contato, (s) é a rigidez do material obtido a partir da inclinação da porção inicial da curva de descarga e π é 3,14.

Porém neste projeto de pesquisa, os valores do módulo de elasticidade (E_{it}) e dureza Martens (HM) foram calculados automaticamente por meio do programa de software DUH211 da própria Shimadzu.



Figura 13 - Ultramicrodurômetro Digital DUH211.

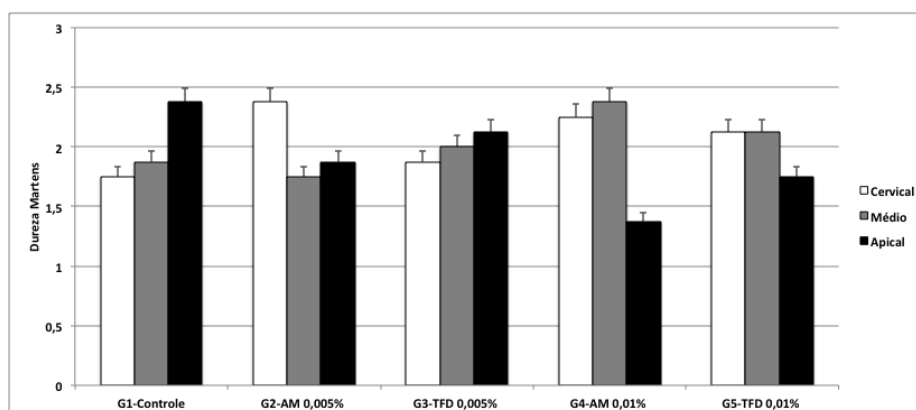
4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados das propriedades mecânicas foram submetidos ao teste de normalidade e as médias comparadas pela Análise de Variância e teste de Friedman ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

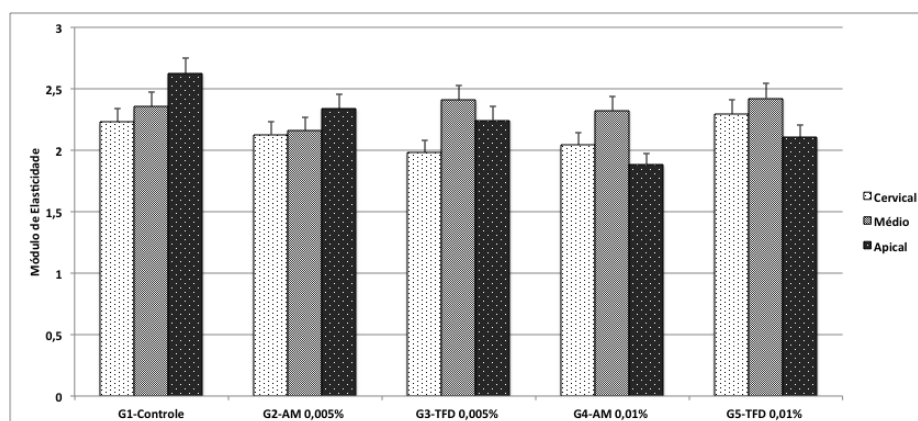
A avaliação da propriedade mecânica de dureza Martens pode ser vista no Gráfico 1. Este revelou que na comparação entre os terços (cervical, médio e apical), não houve diferença estatística significativa nos valores de dureza Martens para todos os grupos experimentais ($p>0,05$).

Gráfico 1 - Dureza Martens da dentina radicular em função do fotossensibilizador ou terapia fotodinâmica nos diferentes terços radiculares.



Os resultados da avaliação da propriedade mecânica de módulo de elasticidade estão ilustrados no Gráfico 2. Não houve diferença estatística significativa nos valores de módulo de elasticidade quando comparou-se os terços (cervical, médio e apical), em todos os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Gráfico 2 - Módulo de elasticidade da dentina radicular em função do fotossensibilizador ou terapia fotodinâmica nos diferentes terços radiculares.



6 DISCUSSÃO

O PBM em conjunto com as soluções irrigadoras, limpa e modela o SCR (40), e que juntamente com a medicação intracanal reduzem o número de MO principalmente devido a complexa variação anatômica do SCR, onde certas áreas podem ficar inacessíveis a este PBM (2, 40). Contudo, mesmo com o avanço técnico-científico da terapêutica endodôntica, há MO que ainda sobrevivem, sendo os principais responsáveis pela manutenção infecção

endodôntica e contribuem para os insucessos (40). Logo, novas estratégias terapêuticas constantemente devem ser investigadas para emprego contra as infecções endodônticas.

Com o advento dos aparelhos de laser e Led, surgiram novas alternativas nos tratamentos da área de saúde, como por exemplo, a terapia fotodinâmica (TFD), com intuito de destruir a célula-alvo ou auxiliar no combate às infecções (41, 42).

Na Endodontia, a TFD surge como uma modalidade terapêutica coadjuvante e inovadora ao PBM, que potencializa a desinfecção do SCR com intuito de suprimir os MO resistentes ao tratamento endodôntico (43, 44). Mas, achados não foram encontrados na literatura de estudos que correlacionam as propriedades mecânicas de dureza Martens e módulo de elasticidade ao emprego da TFD, em especial quando aplicada para a Endodontia.

O presente estudo, avaliou as propriedades de dureza Martens da dentina subjacente ao canal radicular (que tem como base tanto a deformação elástica ou plástica) e o módulo de elasticidade na região dos terços cervical, médio e apical.

Neste estudo, foi demonstrado que as propriedades mecânicas dureza Martens e módulo de elasticidade, apresentaram variações no decorrer do preparo do canal radicular, entretanto, não apresentaram diferença estatística significativa entre os terços dos canais radiculares analisados, nos diferentes grupos experimentais ($p>0,05$).

Na dentina subjacente ao canal radicular, os maiores valores de dureza Martens foram obtidos para os grupos G1 e G3 no terço apical e G2 e G4 no terço cervical, mas sem diferença estatística significantes entre os grupos ($p>0,05$).

Quanto ao módulo de elasticidade, foram encontrados nos grupos G3, G4 e G5, os maiores valores especialmente no terço médio, porém, sem diferença estatística significantes entre os grupos ($p>0,05$).

Contudo, por se tratar de um Projeto de Pesquisa com metodologia inédita para a TFD na Endodontia, não foi encontrado na Literatura, trabalhos que concordam ou não com nossos resultados.

Empregamos o azul de metileno como FS por ser amplamente empregado na realização da TFD, em especial para a Endodontia (24). Entretanto, trabalhos sobre as propriedades de dureza Martens e módulo de elasticidade da dentina radicular, que comparando o emprego da TFD com azul de metileno, não foram encontrados.

Empregamos os parâmetros do laser vermelho e do azul de metileno, para a realização da TFD, de acordo com outros autores (21, 35).

Embora não tenham sido encontrados diferenças estatísticas significantes entre os grupos nos diferentes terços do canais radicular, este trabalho demonstrou ter uma importância para relevância clínica, pois a TFD com azul de metileno não alterou as propriedades de dureza Martens e módulo de elasticidade da dentina radicular, confirmando por meio esta propriedade, sua indicação clínica, além das já conhecidas propriedades biológicas que beneficiam com o seu emprego para a Endodontia.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e resultados obtidos, pode-se concluir que a terapia fotodinâmica com fotossensibilizador azul de metileno nas concentrações empregadas e nos parâmetros do Laser utilizados, não influenciou nas propriedades mecânicas de dureza Martens e módulo de elasticidade nos diferentes terços da dentina radicular.

8 REFERÊNCIAS

- 1) Holland R, Otoboni Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Dezan E Jr. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2003;29:121-4.
- 2) Wu MK, Dummer PM, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006;39:343-56.
- 3) Lin LM, Ricucci D, Lin J, Rosenberg PA. 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) Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J* 2013;24:89-102.
- 6) Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.
- 7) Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One-versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod* 2012;38:1040-52.
- 8) Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of posttreatment apical periodontitis. *Br Dent J* 2014;216:305-12.
- 9) Berbert FLCV, Sivieri-Araujo G, Ramalho LT, Pereira SA, Rodrigues DB, de Araújo MS. 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.
- 10) Sivieri-Araujo G, Berbert FLCV, Ramalho LTO, Rastelli ANS, Crisci FS, BonettiFilho 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.
- 11) Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24-9.
- 12) Alves E, Faustino MA, Neves MG, Cunha A, Tome J, Almeida A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem* 2014;6:141-64.
- 13) Vollet-Filho JD, Menezes PFC, Moriyama LT, Grecco C, Sibata C, Allison RR, Castro-E-Silva O, Bagnato VS. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. *J Appl Phys* 2009;105:1020381-7.
- 14) Buzza HH, Silva LV, Moriyama LT, Bagnato VS, Kurachi C. Evaluation of vascular effect of Photodynamic Therapy in chorioallantoic membrane using different photosensitizers. *J Photochem Photobiol B* 2014;138:1-7.
- 15) Rego-Filho FG, de Araujo MT, de Oliveira KT, Bagnato VS. Validation of Photodynamic Action via Photobleaching of a New Curcumin-Based Composite with Enhanced Water Solubility. *J Fluoresc* 2014;24:1407-13.

- 16) Grecco C, Moriyama LT, Cosci A, Pratavieira S, Bagnato VS, Kurachi C. Necrosis response to photodynamic therapy using light pulses in the femtosecond regime. *Lasers Med Sci* 2013;28:1177-82.
- 17) Allison RR, Sibata CH. Photodynamic therapy: mechanism of action and role in the treatment of skin disease. *G Ital Dermatol Venereol* 2010;145:491-507.
- 18) Allison RR, Moghissi K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013;10:331-41.
- 19) Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent* 2013;7:469-73.
- 20) Shrestha A, Kishen A. Antibiofilm efficacy of photosensitizer-functionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. *J Endod* 2014;40:1604-10.
- 21) Juric IB, Plecko V, Panduric DG, Anic I. The antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy used as an addition to the conventional endodontic retreatment: A clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2014;11:549-55.
- 22) Silva LAB, Novaes AB Jr, de Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M Jr, Silva RA. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 2012;38:360-6.
- 23) 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.
- 24) ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de Normas COFID, versão IV, p. 178, Brasília, abril 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6805ba804f5ea576920df79a71dcc661/ConsolidadoVersaoIVpublicar.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso 25 de fevereiro de 2015.
- 25) Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, Severino D, de Fátima Turchiello R, Baptista MS. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2005;2:175-91.
- 26) Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J Biomech* 2011;44:1691-4.
- 27) Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Nanomechanical properties of biochemically modified dentin bonded interfaces. *J Oral Rehabil* 2011;38:541-6.
- 28) Berger SB, Pavan S, Vidal Cde M, Santos PH, Giannini M, Bedran-Russo AK. Changes in the stiffness of demineralized dentin following application of tooth whitening agents. *Acta Odontol Scand* 2012;70:56-60.
- 29) Suzuki TY, Godas AG, Guedes AP, Catelan A, Pavan S, Briso AL, Dos Santos PH. Microtensile bond strength of resin cements to caries-affected dentin. *J Prosthet Dent* 2013;110:47-55.
- 30) Suzuki TY, Gomes-Filho JE, Gallego J, Pavan S, Dos Santos PH, Fraga Briso AL. Mechanical properties of components of the bonding interface in different regions of radicular dentin surfaces. *J Prosthet Dent* 2015;113:54-61.
- 31) Sabbagh J, Vreven J, Leloup G. Dynamic and static moduli of elasticity of resin-based materials. *Dent Mater* 2002;18:64-71.

- 32) Mecholsky Jr JJ. Fracture mechanics principles. *Dent Mater* 1995;11:111-2.
- 33) Shahdad SA, McCabe JF, Bull S, Rusby S, Wassell RW. Hardness measured with traditional Vickers and Martens hardness method. *Dent Mater* 2007;23:1079-85.
- 34) Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36:292-6.
- 35) 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.
- 36) Mecholsky Jr JJ. Fracture mechanics principles. *Dent Mater* 1995;11:111-2.
- 37) Shahdad SA, McCabe JF, Bull S, Rusby S, Wassell RW. Hardness measured with traditional Vickers and Martens hardness method. *Dent Mater* 2007;23:1079-85.
- 38) Mumcu E, Erdemir U, Topcu FT. Comparison of micro push-out bond strengths of two fiber posts luted using simplified adhesive approaches. *Dent Mater J* 2010;29:286-96.
- 39) Onay EO, Korkmaz Y, Kiremitci A. Effect of adhesive system type and root region on the push-out bond strength of glass-fibre posts to radicular dentina. *Int Endod J* 2010;43:259-68.
- 40) Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MM, Bernabé PF. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci* 2008;16:137-44.
- 41) Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24-9.
- 42) Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-state of the art review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008;5:19-28.
- 43) Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The Effect of Photodynamic Therapy in Root Canal Disinfection: A Systematic Review. *J Endod* 2014;40:891-8.
- 44) Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008;34:728-34.

9 ANEXO

Certificado do Comitê de Ética



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Influência da terapia fotodinâmica com azul de metileno na dentina radicular: estudo das propriedades mecânicas (dureza e módulo de elasticidade)**", Processo FOA nº 2015-00690, sob responsabilidade de Gustavo Sivieri de Araújo apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 05 de Agosto de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 18 de Agosto de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 18 de Setembro de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Influence of photodynamic therapy with methylene blue at the root dentin: study of mechanical properties (hardness and modulus elasticity)**", Protocol FOA nº 2015-00690, under the supervision of Gustavo Sivieri de Araújo presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 05, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 18, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 18, 2016.


Profa. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br