

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

CLAUDIA DE OLIVEIRA BRASIL

Avaliação da terapia fotodinâmica, *in vitro*, aplicada na desinfecção de canais radiculares bovinos contaminados com *Candida albicans*

São José dos Campos, SP
2006

Claudia de Oliveira Brasil

“Avaliação da terapia fotodinâmica, *in vitro*, aplicada na desinfecção de canais radiculares bovinos contaminados com *Candida albicans*.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Emília Ângela Loschiavo Arisawa
Co-orientadores: Prof. Dr. Egberto Munin
Prof^a. Msc. Sônia Khouri

São José dos Campos
2006

B83a

Brasil, Cláudia de Oliveira

Avaliação da terapia fotodinâmica *in vitro* aplicada na desinfecção de canais radiculares bovinos contaminados com *Candida albicans*/ Cláudia de Oliveira Brasil. São José dos

Campos: UniVap, 2006

1 Disco laser.color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Fotoquimioterapia 2. *Candida albicans* 3. Cavidade da Polpa Dentária 4. Desinfecção 5. Bovinos I. Arisawa, Emilia Ângela Loschiavo, Orient. II. Munin, Egberto, Co-Orient. III. Khouri, Sonia, Co-Orient IV. Título

CDU: 615.849

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluna:



Data: 13/12/2006

**“AVALIAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA “IN VITRO” APLICADA NA DESINFECÇÃO
DE CANAIS RADICULARES BOVINOS CONTAMINADOS COM *CANDIDA ALBICANS*”**

Claudia de Oliveira Brasil

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **EGBERTO MUNIN** (UNIVAP)

Prof.^a Dra. **EMÍLIA ÂNGELA LOSCHIAVO ARISAWA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **ANTONIO CARLOS VICTOR CANETTIÉRI** (UNIVAP)

Prof. Dr. **HÉLIO PLAPLER** (UNI'FESP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Thereza, pelo carinho, apoio e encorajamento,
fundamentais em todas as etapas da minha vida.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e pela inteligência.

Ao Magnífico Reitor da UNIVAP, Prof. Dr. Baptista Gargione Filho, ao Diretor do IP&D, Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco e ao Diretor da Faculdade de Ciências da Saúde da UNIVAP, Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro, que possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Prof^a.Dr^a. Emília Ângela Loschiavo Arisawa pela orientação, paciência, incentivo e otimismo. Com sua disponibilidade e competência tornou este trabalho possível.

À Prof^a. MsC. Sônia Khouri pelos conhecimentos profissionais generosamente compartilhados.

Ao Prof. Dr. Egberto Munin pelas orientações técnicas fundamentais para a execução deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Íris Frois pela confiança e apoio.

À Prof^a. MsC. Claudia Maria de Oliveira pelo incentivo.

À Marisa Rezende Castro pela amizade, companheirismo e inestimável colaboração em todas as etapas do trabalho.

À Amandinha, D. Célia, Igor, Sílvia e César por terem me recebido sempre de forma calorosa e amiga. Vocês são minha família em São José dos Campos.

Ao Guilherme Theodoro, às estagiárias Carol, Néia e Juliana pelo apoio técnico imprescindível para a realização dos experimentos.

Às bibliotecárias Rosângela Regis Cavalcanti Taranger e Rúbia Gravito de Carvalho Gomes pela atenção e cordialidade no atendimento.

À Vanda Maria Rosa Fogaça da Cruz pela amizade e pelos estudos compartilhados.

À Isabela Bevilacqua pela colaboração e pelos artigos compartilhados.

Ao Aguinaldo Garcez pelas informações, gentileza e generosidade.

Ao Leandro Procópio Alves pelo apoio técnico no acoplamento da fibra ótica.

À empresa Kroman pela cessão temporária de aparelho laser de Arseneto Gálio Alumínio (AlGaAs), fundamental para a execução do trabalho.

À Adriana e Krol pelo apoio constante.

Ao Júlio Bello pelo amor, carinho e paciência.

Aos meus irmãos André e Luciano pelo incentivo permanente e apoio incondicional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

Avaliação da terapia fotodinâmica, *in vitro*, aplicada na desinfecção de canais radiculares bovinos contaminados com *Candida albicans*

Resumo

A presença de fungos, principalmente *Candida albicans*, tem sido observada em infecções dos canais radiculares. O hipoclorito de sódio é uma substância universalmente utilizada na desinfecção destes condutos. Atualmente, formas alternativas de tratamento têm sido empregadas, como a terapia fotodinâmica (PDT). A proposta deste estudo foi avaliar comparativamente a ação do hipoclorito de sódio 1% e da PDT, *in vitro*, sobre suspensões de *C. albicans* inoculadas em raízes de dentes bovinos. Quarenta raízes tiveram os canais preparados e inoculados, confirmando-se a contaminação dos mesmos. Foram, então, divididas em quatro grupos de dez raízes cada e receberam tratamentos diferentes. O Grupo 1 recebeu solução de hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos. Amostras foram colhidas imediatamente após para avaliação da possível redução microbiana. As raízes do Grupo 2 foram irradiadas e amostras foram colhidas para verificação da ação isolada do laser. No Grupo 3 as raízes receberam o corante azuleno 25% / Endo-PTC por um período de 5 minutos. Em seguida, amostras foram colhidas para verificação da possível ação tóxica do corante sobre as leveduras. As raízes do Grupo 4 receberam o corante azuleno 25% associado ao Endo-PTC por um período de pré-irradiação de 5 minutos e foram irradiadas. Amostras foram colhidas após estes procedimentos para avaliação da ação da terapia fotodinâmica sobre as leveduras. A forma de irradiação nos grupos 2 e 4 foi a seguinte: introduziu-se a fibra óptica 10 mm no interior do canal radicular e mantendo-a nesta posição acionou-se o laser (685 nm, 15 mW) por 2 minutos. Removeu-se a fibra e, em seguida, posicionou-se a peça de mão na entrada do canal e nesta posição acionou-se o laser (685 nm, 40 mW) por mais 2 minutos. Todas as amostras foram colhidas com cones de papel absorvente que foram mergulhados, imediatamente depois, em caldo Sabouraud (DIFCO). Alíquotas desses caldos foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud (DIFCO). O efeito dos diferentes tratamentos empregados foi avaliado através da análise qualitativa e/ou quantitativa de formação de unidades de colônias (UFC) no meio de ágar Sabouraud. Somente no Grupo 1 conseguiu-se uma completa descontaminação (zero UFC). Os demais tratamentos não foram eficazes na descontaminação dos canais.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, *Candida albicans*, laser AlGaAs.

“Evaluation of the photodynamic therapy, *in vitro*, applied in the disinfection of bovine root canals contaminated by *Candida albicans*.”

Abstract

The presence of yeasts, mainly *Candida albicans*, has been observed in root canal infections. Sodium hypochlorite is a substance used worldwide in the disinfection of these canals. Currently, alternative forms of treatment have been employed such as the photodynamic therapy (PDT). The aim of this study was to evaluate comparatively the action of the 1% sodium hypochlorite and that of the PDT, *in vitro*, on cultures of *C. albicans* inoculated in bovine tooth roots. The canals of the forty roots were prepared and inoculated, in which contamination was confirmed. The roots were then divided into four groups of ten roots each and received different treatments. Group 1 received 1% sodium hypochlorite solution for 15 minutes. Samples were immediately taken for evaluation of the possible microbial reduction. The roots of Group 2 were radiated and samples were taken in order to verify the isolated action of the laser. In Group 3 the roots received azuleno 25% / Endo-PTC for a period of 5 minutes. After which, samples were taken in order to verify the possible toxic action of the photosensitizer on the levedures. The roots of Group 4 received azuleno 25% associated to Endo-PTC for a pre-irradiation period of 5 minutes and were radiated. After these procedures, samples were taken for evaluation of the photodynamic therapy action on the yeasts. The form of irradiation in groups 2 and 4 was the following: the optic fiber was introduced 10 mm inside the root canal and the laser (685 nm, 15 mW) was set for 2 minutes. The fiber was removed and, then, the hand piece (685 nm, 40 mW) was placed at the entrance of the canal and was set for 2 more minutes. All the samples were taken by absorbent paper points which were dived, immediately, in Sabouraud broth (DIFCO). Aliquots of these broths were plated on Sabouraud agar (DIFCO). The effect of the different treatments employed was evaluated through qualitative and/or quantitative analysis of the colony-forming units (CFU/mL) in the Sabouraud agar plates. Only in Group 1 a complete decontamination was obtained (zero CFU/mL). However, the other treatments weren't effective in the decontamination of the root canals.

Keywords: photodynamic therapy, *Candida albicans*, AlGaAs laser.

*A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido, não na vitória
propriamente dita.*

M. Ghandi

Lista de ilustrações

Figura 1:	Localização dos microrganismos no canal radicular. Fonte: Cardoso; Gonçalves (2002).	22
Figura 2:	Microrganismos no interior dos túbulos dentinários – MEV Fonte: Cardoso; Gonçalves (2002).	25
Figura 3:	Aparelho laser Kroman®	45
Figura 4:	Fibra óptica acoplada à peça de mão, desenvolvida pelo fabricante Kroman®.	45
Figura 5:	Medidor de potência Melles Griot®	45
Figura 6:	Sistema de acoplamento realizado no IP&D	46
Figura 7:	Irradiação do fundo para a abertura do tubo	49
Figura 8:	Irradiação contornando as paredes laterais do tubo	49
Figura 9:	Preparo do dente	51
Figura 10:	Contaminação da raiz com inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	51
Figura 11:	Coleta de amostra	52
Figura 12:	Irradiação com fibra óptica	52
Figura 13:	Canal preenchido com azuleno 25% / Endo-PTC	53
Figura 14:	Azuleno 25% e Creme Endo-PTC	54
Figura 15:	Acoplamento da fibra óptica desenvolvido no IP&D	55
Figura 16:	Irradiação com a fibra óptica	56
Figura 17:	Irradiação com a peça de mão	56
Figura 18:	Fluxo laminar	57
Figura 19:	Placas pertencentes ao grupo controle	58
Figura 20:	Placas pertencentes ao grupo 1 – hipoclorito de sódio a 1%	58
Figura 21:	Placas pertencentes ao grupo 2 – laser isolado	59
Figura 22:	Placas pertencentes ao grupo 3 – fotossensibilizador isolado	59
Figura 23:	Placas pertencentes ao grupo 4 – terapia fotodinâmica	60

Lista de abreviaturas e siglas

AlGaAs: Arseneto Gálio Alumínio

ATCC: American Type Collection Culture

Azul de O -Toluidina: azul de Orto-toluidina

CFU: colony-forming units

Ca(OH)₂: hidróxido de cálcio

cm²: centímetro quadrado

CMI: concentração mínima inibitória

EDTA: ácido diaminoetil- tetracético

EGTA: ácido etilenoglicol- tetracético

Er:YAG: Érbio:Ytrium Aluminium Garnet

Endo-PTC: endo – peróxido de uréia, tween 80, carbowax

GaAs: Arseneto de Gálio

HCl: ácido clorídrico

HL: haste longa

H₂O₂: água oxigenada

He-Ne: Hélio-Neônio

InGaAlP: Fosfato Índio Gálio Alumínio

J: Joule

K-file: Kerr- file

Laser: light amplification by stimulated emission of radiation

log₁₀: logaritmo de base 10

MEV: microscopia eletrônica de varredura

mJ: microjoule

mL: mililitros

mm: milímetro

mW: miliwatt

NaF: fluoreto de sódio

NaOCl: hipoclorito de sódio

Nd:YAG: Neodímio:Ytrium Aluminium Garnet

nm: nanometro

PDT: photodynamic therapy

pH: potencial hidrogeniônico

P. gingivalis: Porphiromona gingivalis

PMCC: paramonoclorofenol canforado

S. sanguis: Streptococcus sanguis

TiF₄: tetrafluoreto de titânio

Tipo H: tipo Hedström

Tipo K: tipo Kerr

TBO: O-toluidine blue

UFC: unidades formadoras de colônia

W: Watt

µg: micrograma

µm: micrometro

Lista de símbolos

®: marca registrada

#: calibre

°C: grau Celsius

<: inferior

?: comprimento de onda

Sumário

1. Introdução	17
1.1 Objetivo geral	19
1.2 Objetivo específico	19
2. Revisão da literatura	20
2.1 Tratamento endodôntico convencional	20
2.2 Terapia fotodinâmica	32
3. Material e métodos (metodologia)	44
3.1 O equipamento laser	44
3.2 O fotossensibilizador	46
3.3 Estudo piloto – manchamento dos dentes	47
3.4 Padronização do protocolo	47
3.4.1 Ação da terapia fotodinâmica em culturas de <i>Candida albicans</i> em tubos de ensaio	47
3.4.2 Ação da terapia fotodinâmica em culturas de <i>Candida albicans</i> em tubos de ensaio – modificação na forma de irradiação	49
3.4.3 Ação da terapia fotodinâmica em suspensões de <i>Candida albicans</i> utilizando a fibra óptica com sistema de acoplamento da Kroman®	50
3.4.4 Ação da terapia fotodinâmica em suspensões de <i>Candida albicans</i> utilizando a fibra óptica com sistema de acoplamento desenvolvido no IP&D	54
3.4.5 Experimento principal: Ação da terapia fotodinâmica em suspensões de <i>Candida albicans</i> utilizando a fibra óptica com sistema de acoplamento desenvolvido no IP&D – protocolo misto	55
4. Resultados	58
5. Discussão	61
6. Conclusões	67
7. Sugestões para trabalhos futuros	68

Referências	69
Anexo A	73
Anexo B	74

1. INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico, independentemente da razão que o motivou, é a obtenção da reparação tecidual que permita ao dente retornar às suas funções normais (PAIVA; ANTONIAZZI, 1984).

A terapia endodôntica, nos dias atuais, apresenta um grande índice de sucesso. Entretanto, a persistência de infecção nos canais radiculares é a principal causa de insucesso, impedindo o reparo da região apical (D'ARCANGELO; VARVARA; FAZIO, 1999).

A infecção endodôntica não é passível de remissão espontânea pela ação de mecanismos de defesa do organismo, nem pode ser combatida por antibioticoterapia sistêmica. A polpa necrosada não tem vasos sanguíneos que possam transportar células de defesa e antibióticos para o local. Assim, devido à localização anatômica da infecção endodôntica, existe a necessidade de intervenção profissional no sítio infectado, através de instrumentos e substâncias químicas (SIQUEIRA JR, 2002). Depois de realizado o acesso aos canais radiculares, os mesmos são esvaziados, sanificados e modelados, sendo finalmente obturados. Após a obturação, eventuais microrganismos que permaneçam viáveis poderão ser reativados, caso ocorra percolação entre o material obturador e a parede do conduto, levando nutrientes aos mesmos (BRAMANTE; GARCIA, 2002).

Muitos casos de insucesso da terapia endodôntica são causados por problemas técnicos, porém existem também as lesões refratárias ao tratamento tecnicamente bem realizado. Além de bactérias anaeróbias estritas, espécies aeróbias ou anaeróbias facultativas também têm sido encontradas em canais radiculares, muitas vezes associadas a infecções persistentes ou secundárias. Dentre estas espécies destacam-se *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* e

Pseudomonas aeruginosa, além de fungos, principalmente do gênero *Candida* (SIQUEIRA JR, 2002).

Nair et al., 1990, usando microscopia, analisaram nove casos de lesões periapicais resistentes ao tratamento endodôntico e verificaram que duas biópsias continham fungos. Sunde et al., 2002, através de culturas coletadas de lesões periapicais, observaram grande variedade de microrganismos, incluindo espécies de *Candida*. A espécie de fungo mais freqüente em infecções endodônticas é *Candida albicans* (SIQUEIRA JR et al., 2002). Apesar disso, muitos estudos buscam meios de destruir as bactérias presentes no canal e poucos se ocupam dos fungos.

Atualmente, a capacidade antimicrobiana dos lasers tem sido pesquisada. Sabe-se que os de alta potência como Er:YAG e Nd:YAG destroem microrganismos pelo calor gerado pela alta energia, enquanto os de baixa potência não apresentam efeito fototérmico. A Terapia Fotodinâmica (PDT) inicialmente preconizada para tratamento de câncer (ACKROYD et al., 2001), vem sendo pesquisada com a finalidade de tratamento de doenças infecciosas. Como a maioria dos microrganismos orais não absorve a luz visível dos lasers de baixa potência, a utilização de um corante que se fixe a eles, atraindo a luz do laser, é necessária para que os lasers de baixa potência tenham ação antimicrobiana. Quando o fotossensibilizador é irradiado com luz de comprimento de onda apropriado, a molécula é excitada. Isto produz uma série de transferências de energia molecular levando à liberação de radicais livres e/ou de oxigênio singleto, uma espécie altamente reativa e citotóxica, resultando na morte celular (ZANIN et al., 2003). Uma vantagem dessa terapia é o custo reduzido em relação aos lasers de alta potência.

Neste estudo será pesquisado o efeito da PDT, também denominada fotossensibilização letal, em canais radiculares de dentes bovinos contaminados com *Candida albicans*, para verificação de uma possível atividade fungicida.

1.1 Objetivo Geral

Testar a ação da terapia fotodinâmica sobre cepa padrão de *Candida albicans*.

1.2 Objetivo Específico

Comparar a ação da terapia fotodinâmica ao uso do hipoclorito de sódio a 1%, em canais radiculares de dentes bovinos inoculados com suspensão de *Candida albicans*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tratamento endodôntico convencional

Fleury e Aun (1990), realizaram revisão da literatura sobre a aplicação da microbiologia voltada à terapia endodôntica. Concluíram que os casos refratários ao tratamento endodôntico convencional estão, freqüentemente, ligados à infecção por microflora anaeróbia, normalmente associação de múltiplas espécies que colonizam o canal radicular e a região periapical. Sugeriram que uma técnica de coleta para anaeróbios pode e deve ser empregada a fim de resolver estas infecções.

Nair et al. (1990), estudaram 9 lesões periapicais refratárias e assintomáticas, que foram removidas para biópsia, durante o tratamento cirúrgico dos dentes. As peças removidas foram examinadas por microscopia eletrônica e de luz. Em seis das nove biópsias foram encontrados microrganismos no canal radicular apical: quatro continham uma ou mais espécies de bactérias e em duas havia fungos. Estes achados sugerem que, na maioria dos dentes com lesões periapicais, microrganismos podem persistir e desempenhar papel importante no fracasso da terapia endodôntica.

Sen, Safavi e Spångberg (1997), investigaram os padrões de colonização de *Candida albicans* em esmalte, dentina e cimento. Não encontraram diferenças no padrão de crescimento desse fungo em esmalte e em cimento, que tiveram suas superfícies recobertas por colônias isoladas, mas densas. A presença ou ausência de *smear layer* não interferiu na colonização destas

áreas. Entretanto, em dentina o *smear layer* pareceu ter um maior efeito na colonização, pois na sua presença as colônias formaram uma massa densa. Os fungos penetraram nos sulcos e migraram para o interior dos túbulos dentinários. Os autores sugeriram, então, que os tecidos duros dentais podem representar um reservatório para disseminação de infecções por *Candida*.

Siqueira Jr et al. (1997), avaliaram histologicamente a eficiência de cinco técnicas de instrumentação na limpeza do terço apical de canais radiculares curvos. Raízes mesiais de molares inferiores foram instrumentadas pelos seguintes métodos: técnica *step-back* usando limas de aço inoxidável; técnica *step-back* usando limas de níquel-titânio; técnica ultrassônica; técnica de força balanceada e técnica Canal Master U. As porções apicais das raízes instrumentadas foram preparadas para exames histológicos. Os cinco métodos foram eficazes na remoção da maior parte de tecidos dos canais, mas nenhuma técnica promoveu o completo debridamento dos condutos.

Abou-Rass e Bogen (1998), pesquisaram os microrganismos de lesões periapicais fechadas, rigorosamente selecionadas, associadas com terapia endodôntica refratária e calcificação pulpar. Foram selecionadas 13 lesões com indicações cirúrgicas e amostras foram tomadas durante as cirurgias. Essas amostras foram colhidas de três regiões diferentes: janela cirúrgica, interior do corpo da lesão e ápice radicular. Nos 13 casos, amostras tomadas do ápice revelaram microrganismos, sendo 63,6% de anaeróbios obrigatórios e 36,4% de anaeróbios facultativos (Figura 1). Os autores alertaram sobre a dificuldade de erradicação de todos os microrganismos durante o tratamento endodôntico e sobre a possibilidade dessas bactérias colonizarem o ápice radicular e os tecidos periapicais, dificultando assim a cura.



Figura 1: Localização dos microrganismos no canal radicular.
Fonte: Cardoso e Gonçalves (2002)

Sundqvist et al. (1998), realizaram um estudo para determinar o tipo de microbiota presente em dentes com insucesso no tratamento endodôntico e para verificar o resultado do retratamento conservador. Cinquenta e quatro dentes com canais tratados e lesões periapicais persistentes foram utilizados. Os dentes foram abertos e a obturação radicular removida com brocas, limas e solução salina estéril. Uma amostra bacteriológica inicial foi colhida. Os canais ficaram vazios e os dentes foram selados com cimento provisório. Sete dias depois, novas amostras foram tomadas dos canais radiculares. Depois de coletadas as amostras, os condutos foram instrumentados com limas manuais, irrigados com solução de NaOCl a 0,5% e preenchidos com pasta de Ca(OH)_2 . Em seguida os dentes foram selados com cimento de óxido de zinco e eugenol. Numa terceira sessão realizada após um período de 7 a 14 dias, os canais foram irrigados com solução salina estéril para remoção da medicação e novas amostras foram colhidas. Os canais foram obturados com guta-percha por meio de condensação lateral. Os dentes retratados foram acompanhados por cinco anos. Os autores encontraram nos dentes, onde houve

fracasso no tratamento endodôntico, uma flora microbiana bastante diferente daquela encontrada em dentes não tratados. Havia principalmente espécies singulares de organismos predominantemente Gram-positivos. A presença de infecção no momento da obturação dos canais e o tamanho da lesão foram fatores que influenciaram negativamente o prognóstico. Houve 74% de sucesso nos retratamentos.

D'Arcangelo, Varvara e Fazio (1999), testaram, *in vitro*, o efeito do hipoclorito de sódio nas concentrações de 5, 3, 1 e 0,5%; e a associação de clorexidina e cetrimida sobre cepas de aeróbios-anaeróbios facultativos: *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis*; de anaeróbios estritos: *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella melaninogenica* e de microaerófilos: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Os resultados revelaram não haver diferença entre os irrigantes testados; todos apresentaram efeito bactericida nos tempos de 10, 20 ou 30 minutos de contato.

Leonardo et al. (1999), avaliaram a atividade antimicrobiana *in vivo* do gluconato de clorexidina a 2%, usado como solução irrigadora de canais radiculares de dentes com polpa necrosada e lesão periapical. Foram utilizados vinte e dois canais radiculares de incisivos e molares de doze pacientes. Depois de realizados os acessos aos canais, amostras foram coletadas com cones de papel estéreis. Os condutos foram então instrumentados com limas tipo K e irrigados com a solução de clorexidina, sendo em seguida selados e mantidos assim por 48 horas. Após este intervalo de tempo, novas amostras foram obtidas e submetidas à avaliação microbiológica e ao teste de efeito residual da solução. Houve 100% de redução para

Streptococcus mutans e 77,78% para microrganismos anaeróbios. Foi observada atividade residual da clorexidine 48 horas após a instrumentação. Os autores concluíram que o gluconato de clorexidine a 2% pode ser usado como solução irrigadora em canais radiculares devido a sua atividade antimicrobiana.

Siqueira Jr et al. (1999), avaliaram *in vitro* a redução da população bacteriana, por meio da ação mecânica da instrumentação e da irrigação realizada com solução salina estéril. Os canais radiculares inoculados com *Enterococcus faecalis* foram instrumentados com limas Nitiflex manuais, limas Greater Taper (GT) e instrumentos Profile rotatórios. Amostras dos canais foram colhidas antes e depois da instrumentação. No grupo Nitiflex, amostras foram tomadas após o uso de cada lima. Todos os instrumentos e técnicas reduziram de forma significativa o número de bactérias dos canais radiculares. A lima Nitiflex # 40 foi mais efetiva na eliminação de bactérias que os demais instrumentos e técnicas testados. Embora os resultados tenham mostrado que a instrumentação e irrigação removeram mecanicamente mais de 90% das bactérias dos canais, não houve nenhum caso de remoção total dos microrganismos.

Buck et al. (2001), compararam três irrigantes endodônticos quanto à eficácia em matar bactérias alojadas no interior de túbulos dentinários humanos (Figura 2). Canais radiculares de dentes extraídos foram preparados, esterilizados e infectados com caldo de cultura de *Enterococcus faecalis*. Os doze canais infectados foram então divididos em quatro grupos e os três canais de cada grupo foram expostos por 1 minuto a uma das seguintes substâncias: hipoclorito de sódio a 0,525%; EDTA a 0,2%; Clorexidina a 0,12% e água estéril. Foram avaliadas raspas de dentina de três diferentes profundidades, dos terços radiculares cervical, médio e apical. O hipoclorito de sódio foi superior às demais substâncias. O EDTA e a

Clorexidina foram mais eficazes que a água. Em todos os níveis do canal, maiores quantidades de bactérias permaneceram viáveis nas regiões mais profundas.

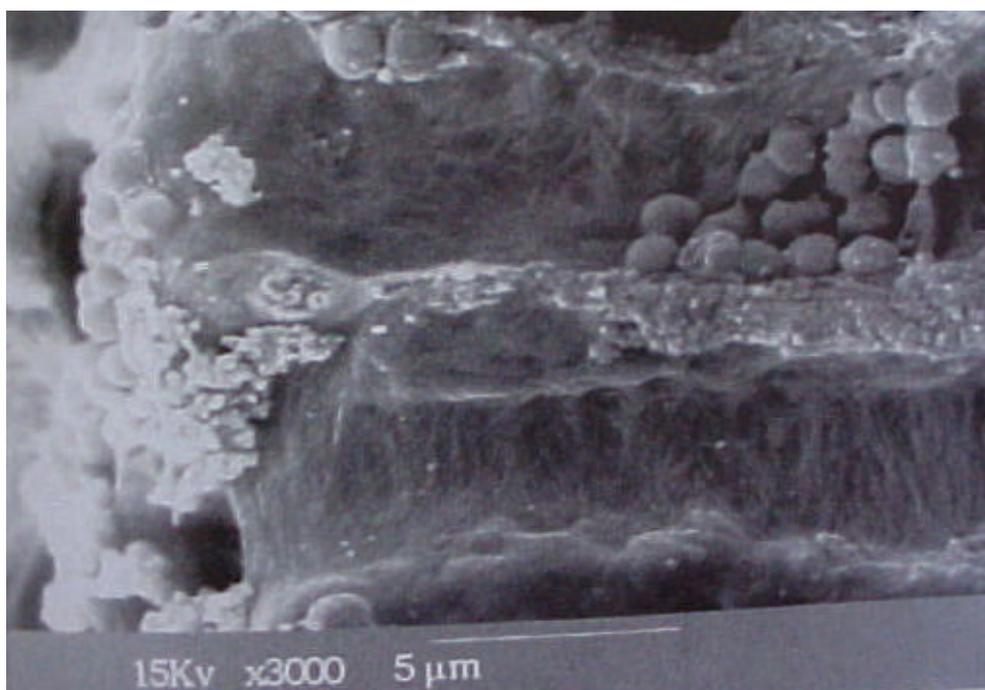


Figura 2: Microorganismos no interior dos túbulos dentinários – MEV - Fonte: Cardoso e Gonçalves (2002)

Peciulien et al. (2001), avaliaram a ocorrência e o papel dos fungos, bastonetes entéricos Gram-negativos e espécies de *Enterococcus* em dentes com canais obturados e com lesões periapicais crônicas, bem como a ação antimicrobiana da solução irrigadora iodo iodeto de potássio. Quarenta dentes tratados endodonticamente, com lesões periapicais e obturações consideradas insatisfatórias foram utilizados neste estudo. Os retratamentos endodônticos foram realizados em condições de assepsia e os materiais obturadores foram removidos apenas com o uso de instrumentos manuais. Após a coleta da primeira amostra microbiológica, os canais foram limpos e modelados com o auxílio de limas do tipo Hedström e irrigados com 10 mL da solução

de hipoclorito de sódio a 2,5% e com 5 mL da solução de EDTA a 17%. Após o completo preparo químico-mecânico dos canais, novas amostras microbiológicas foram colhidas com o auxílio de cones de papel absorvente. Os dentes foram então divididos em dois grupos de vinte dentes cada. No grupo A, os canais foram obturados com hidróxido de cálcio por 10-14 dias antes da obturação definitiva com cimento endodôntico e cones de guta-percha. No grupo B, os vinte canais foram irrigados por 5 minutos com a solução de iodo iodeto de potássio, antes da obturação definitiva do canal. A terceira amostra microbiológica foi colhida antes da obturação final dos vinte canais pertencentes ao grupo B. A análise microbiológica da primeira coleta das amostras revelou a presença de fungos, bactérias entéricas Gram-negativas facultativas e espécies de *Enterococcus* em 33 dentes. Na segunda amostra bacteriológica observou-se a presença de bactérias facultativas e Gram-positivas anaeróbias em dez canais, enquanto fungos e bactérias facultativas Gram-negativas não foram encontradas. *Enterococcus faecalis* foram as bactérias predominantes nas duas amostras. Na terceira amostra, após irrigação final com a solução de iodo iodeto de potássio, a análise microbiológica foi negativa.

Peters et al. (2001), coletaram dois grupos de dentes com periodontite apical em diferentes localizações geográficas, Holanda (grupo I) e Escócia (grupo II), visando estudar as espécies de bactérias deixadas nos túbulos dentinários radiculares. Foram feitas culturas com amostras de dentina radicular de três regiões entre a polpa e o cimento, denominadas de camadas A, B e C. Além disso, a dentina de oito dentes do grupo da Escócia foi examinada histologicamente. Usando as culturas microbiológicas, foram encontradas bactérias em 77% das amostras do grupo I e em 87,5% das amostras do grupo II. Na região mais distante da polpa (camada C) havia bactérias em 62% das amostras. Nas camadas mais próximas à polpa, foi encontrado maior número de bactérias anaeróbias e bastonetes Gram-positivos, bem como uma

maior quantidade de espécies bacterianas. A análise histológica mostrou penetração bacteriana nos túbulos dentinários de cinco dos oito dentes examinados. Os autores concluíram que, em mais da metade das raízes infectadas, bactérias estavam presentes na dentina próxima ao cimento e que culturas anaeróbias de dentina são mais sensíveis que o método histológico para detectar estas bactérias.

Siqueira Jr (2001), realizou uma revisão da literatura com o objetivo de discutir as prováveis causas de insucesso da terapia endodôntica, especialmente em dentes com tratamentos considerados satisfatórios. Muitos casos de falha do tratamento endodôntico se devem à persistência de microrganismos no terço apical dos canais radiculares. Estudos demonstraram que, parte do espaço radicular, permanece intacto após o preparo químico-cirúrgico, indiferentemente das técnicas e instrumentos empregados, abrigando bactérias e substrato. A infecção extra-radicular pode ser outra causa de insucesso, uma vez que microrganismos estabelecidos em tecidos periapicais são inacessíveis aos procedimentos de desinfecção endodôntica. Além disso, fatores intrínsecos e extrínsecos podem impedir o sucesso do tratamento, gerando reação de corpo estranho, mesmo na ausência de microrganismos. O autor recomenda o retratamento como primeira alternativa para resolução dos insucessos e indica cirurgia periapical nos seguintes casos: necessidade de biópsia, prognóstico desfavorável do retratamento, impossibilidade de tratamento ou retratamento.

Souza (2001), discorreu sobre lesões refratárias em Endodontia, citando trabalhos que demonstram predomínio absoluto de bactérias anaeróbias no terço apical de canais com lesão periapical. A indicação cirúrgica é uma das opções para a resolução desses casos, pois os microrganismos podem estar alojados em locais de difícil acesso, inclusive em regiões extra-

radiculares. O autor propõe uma técnica de limpeza ativa do forame como alternativa ao procedimento cirúrgico. Foram tratados dez dentes uni, bi ou tri-radiculares, todos com lesão periapical de tamanhos variados. Instrumentação vigorosa foi realizada por duas ou três limas tipo K, de calibres crescentes, ultrapassando o forame apical. Em seguida, uma lima tipo H, de calibre igual ao da última lima K, também foi utilizada para “raspar” as paredes do forame. Após o preparo, foram feitas irrigações seqüenciais com hipoclorito de sódio a 2%, solução anestésica, EDTA a 17%, hipoclorito de sódio a 2% e solução anestésica, sendo finalmente colocada medicação intracanal com hidróxido de cálcio. O autor obteve reparo nos dez casos e concluiu que as lesões tidas como refratárias, normalmente indicadas para cirurgia, devem ser tratadas endodonticamente através da limpeza ativa do forame.

Valera, Rego e Jorge (2001), pesquisaram *in vitro* o efeito do hipoclorito de sódio a 1% e das seguintes medicações intracanal: Calen, paramonoclorofenol canforado, solução de iodato de iodo a 2%, tricresol formalina e Calen com paramonoclorofenol canforado sobre *Candida albicans* presente no interior de canais radiculares. Verificaram que apenas o paramonoclorofenol canforado foi efetivo em 100% das amostras. Ressaltaram ainda a importância da aplicação de medicação intracanal para eliminar microrganismos que podem ser resistentes ao tratamento endodôntico convencional.

Ferguson, Hatton e Gillespie (2002), realizaram um estudo *in vitro* para determinar a suscetibilidade de *Candida albicans* a vários irrigantes e medicações intracanal. A concentração mínima inibitória (CMI) do hipoclorito de sódio (NaOCl), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), digluconato de clorexidina e hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] aquoso necessária para destruir um inóculo padrão de *Candida albicans* foi determinada. O NaOCl, H₂O₂ e digluconato de

clorexidine foram efetivos com as CMI's <10 µg/mL, 234 µg/mL e <0,63 µg/mL, respectivamente. O Ca(OH)₂ aquoso não foi efetivo. A pasta de Ca(OH)₂ e o paramonoclorofenol canforado quando mantidos em contato direto com *Candida albicans* apresentaram atividade antifúngica.

Siqueira Jr et al. (2002), estudaram, através da microscopia eletrônica, o padrão de colonização da dentina radicular por cinco espécies de fungos: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*. *Candida albicans* colonizou a maioria das amostras, enquanto as outras quatro espécies apresentaram discreta ou nenhuma colonização da dentina radicular. *Candida albicans* mostrou diferentes padrões de infecção da dentina. Em algumas amostras, a colonização da superfície dentinária foi leve e não foi observada nenhuma penetração no interior dos túbulos dentinários. Em outras amostras, algumas áreas das paredes do canal radicular foram recobertas por densas colônias e alguns túbulos foram severamente infectados. Os autores acreditam que os resultados obtidos podem ajudar a explicar o fato de *Candida albicans* ser a espécie de levedura mais comumente encontrada nas infecções endodônticas.

Sunde et al. (2002), pesquisaram a microbiota periapical de 36 dentes com periodontite apical refratária. Nenhum dos dentes respondeu ao tratamento endodôntico convencional nem ao tratamento a longo prazo com Ca(OH)₂. O estudo demonstrou que uma ampla variedade de microrganismos, compreendendo bactérias anaeróbias estritas e facultativas, assim como fungos, permaneceram nas lesões refratárias mesmo após longos períodos de tratamento com Ca(OH)₂. Das bactérias isoladas, 79,5% eram Gram-positivas e 51% eram anaeróbias. Microrganismos facultativos como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*,

Stenotrophomonas, *Sphingomonas*, *Bacillus* ou *Candida* estavam presentes em 75% das lesões. Das 36 lesões, uma única cultura foi negativa, 33 foram polimicrobianas e 2 revelaram apenas uma espécie bacteriana.

Pinheiro et al. (2003), identificaram a microbiota presente no interior de canais radiculares de sessenta dentes com lesão periapical, selecionados para o estudo. Durante o retratamento, o material obturador foi removido usando brocas Gates-Glidden® e limas endodônticas, sem o auxílio de solventes químicos. Foi realizada irrigação com solução salina estéril para remoção do material remanescente e umidificação do canal. Avançadas técnicas microbiológicas, para espécies anaeróbias, foram empregadas para a coleta das amostras microbianas, isolamento e determinação das espécies. A associação dos achados microbiológicos com aspectos clínicos também foi pesquisada. Em 51 canais havia microrganismos e, na maioria dos casos, uma ou duas cepas foram isoladas de cada canal. Dessas espécies microbianas isoladas, 57,4% eram anaeróbias facultativas, 42,6% anaeróbios obrigatórios e 83,3% bactérias Gram-positivas. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais comumente isolada. Infecções polimicrobianas e anaeróbios obrigatórios foram frequentemente encontrados em canais de dentes obturados sintomáticos.

Siqueira Jr et al (2003), avaliaram a efetividade de quatro medicações intracanal em desinfetar a dentina radicular de dentes bovinos infectados com *Candida albicans*. As substâncias utilizadas foram hidróxido de cálcio/glicerina; hidróxido de cálcio/digluconato de clorexidine a 0,12%; hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado/glicerina; e digluconato de clorexidine a 0,12%/óxido de zinco. O contato das amostras com estas medicações se deu por 1h, 2 dias e 7 dias. Os exemplares tratados com Ca(OH)₂/PMCC/glicerina ou com clorexidine/óxido de zinco

foram completamente desinfetados após uma hora de exposição. O Ca(OH)_2 /glicerina foi totalmente efetivo somente após sete dias de exposição. O Ca(OH)_2 misturado com clorexidine foi ineficaz mesmo após uma semana de contato.

Ates, Akdeniz e Sem (2005), avaliaram os efeitos antifúngicos de quelantes de cálcio e de agentes de ligação ao cálcio sobre *Candida albicans*, comparados aos agentes antifúngicos convencionais. Três cepas de *Candida albicans* foram usadas sendo uma padrão, uma cepa de cavidade oral e uma de canal radicular. As soluções testadas foram: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenoglicoltetracético (EGTA), fluoreto de sódio (NaF), tetrafluoreto de titânio (TiF_4), nistatina e cetoconazol. Um método de diluição foi empregado para determinar a concentração mínima inibitória das soluções testadas, isto é a menor concentração que inibiu o crescimento visível da cultura em caldo. Além disso, foi determinada a concentração mínima fungicida das soluções, que significa a menor concentração que inibiu completamente o crescimento das cepas em placas de agar. As três cepas demonstraram padrões similares de susceptibilidade. Depois do cetoconazol, o EDTA foi a solução que teve maior atividade fungicida, seguido pelo TiF_4 . O EGTA e o NaF foram os antifúngicos menos eficientes. Os autores destacaram que apesar da forte ação antifúngica demonstrada pelo EDTA e TiF_4 , essas soluções não devem ser utilizadas rotineiramente na terapia endodôntica, pois apresentam atividade antibacteriana limitada. Entretanto, podem ser recomendadas como alternativa na irrigação de condutos radiculares com infecção persistente e em canais de pacientes com alta incidência de candidose oral.

Öztan et al. (2006), avaliaram a ação de cones de guta percha contendo medicação intracanal sobre microrganismos resistentes às terapias convencionais. Foram utilizados cones

contendo hidróxido de cálcio (Calcium Hydroxide Plus Points), diacetato de clorexidina (Activ Points) ou a combinação hidróxido de cálcio-clorexidina (CHX/Ca Combi Points) testados em culturas puras de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Enterococcus faecalis*. Alíquotas de microrganismos (100µL) suspensos em soro humano diluído foram transferidas para tubos de Eppendorf contendo dois pedaços de uma das variedades de cones de guta percha. Os tubos foram então incubadas por até duas semanas e um tubo foi removido da estufa após 1, 2, 3, 4, 7 e 14 dias, tendo sua suspensão diluída, plaqueada e incubada para posterior contagem de UFC/mL. Os cones contendo hidróxido de cálcio ou clorexidina não exibiram atividade antimicrobiana suficiente, exceto sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Os cones contendo a combinação hidróxido de cálcio/clorexidina destruíram completamente a maioria dos microrganismos, apenas *E. faecalis* e *C. parapsilosis* foram resistentes aos cones até mesmo no período de quatorze dias. Os autores concluíram que a combinação hidróxido de cálcio/clorexidina tem ação antimicrobiana sinérgica sobre alguns fungos.

2.2. Terapia fotodinâmica

A luz tem sido empregada no tratamento de doenças desde a antiguidade. Povos do Egito, Índia, China e Grécia usavam a luz do sol para tratarem de doenças de pele, como psoríase, vitiligo e câncer. No início do século passado, o médico dinamarquês Niels Finsen descreveu o sucesso do tratamento da varíola usando luz vermelha, o que impediu a supuração das pústulas. Ele também utilizou luz ultravioleta para tratar tuberculose cutânea. Em 1900, o aluno de medicina Oscar Raab e seu professor Herman von Tappeiner, durante um estudo dos efeitos da acridina sobre paramécio, descobriram que a combinação da acridina vermelha com a luz era letal

para este protozoário causador da malária. No mesmo ano, o neurologista francês Prime usou a eosina oral no tratamento de epilepsia. Ele descobriu que este tratamento induziu dermatite nas áreas da pele expostas ao sol. Esta descoberta levou von Tappeiner e o dermatologista Jesionek a usarem a eosina tópica e luz branca para tratar tumores cutâneos. Em 1907, von Tappeiner e Jodlbauer demonstraram a necessidade da presença de oxigênio nas reações de fotossensitização e introduziram o termo “ação fotodinâmica” para descrever este fenômeno (ACKROYD et al., 2001).

Dobson e Wilson (1992), realizaram estudo *in vitro* para determinar se biofilmes de *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* poderiam ser sensibilizados por corantes para posterior destruição pela luz de um laser de baixa potência. O azul de O-Toluidina e o azul de metileno foram capazes de sensibilizar os quatro microorganismos testados para serem destruídos pela exposição de 30 minutos ao laser de HeNe. Porém, os corantes Ftalocianina dissulfonada de alumínio, HCl hematoporfirina e éster de hematoporfirina somente foram efetivos em sensibilizar alguns dos microorganismos testados. Tais resultados, segundo os autores, sugeriram que a terapia fotodinâmica pode ser eficaz na eliminação de bactérias periodontopatogênicas da placa dental.

Wilson e Mia (1993), realizaram um estudo para verificar se *Candida albicans* e outras espécies de *Candida*, responsáveis pelas candidoses associadas ao HIV, poderiam ser destruídas através da terapia fotodinâmica. Os lasers utilizados foram o HeNe com potência de saída de 7,3 mW e λ de 632,8 nm e o GaAs com potência de saída de 11 mW e λ de 660 nm. O laser HeNe foi utilizado com os fotossensibilizadores cristal de violeta, azul de O-Toluidina, éster dihematoporfirina e tionina, enquanto o laser GaAs foi associado ao azul de metileno e

ftalocianina dissulfonada de alumínio. A associação do laser HeNe com azul de O-Toluidina foi a mais eficaz na redução de colônias viáveis. O laser GaAs foi pouco eficiente, já que sua densidade de energia no tempo de 120 segundos, foi bem menor que a do HeNe.

Soukos et al. (1996), pesquisaram os efeitos do laser HeNe em células epiteliais orais e fibroblastos na presença de azul de O-Toluidina *in vitro*. O experimento foi realizado com a finalidade de encontrar uma janela terapêutica na qual as bactérias pudessem ser destruídas sem danos ao tecido adjacente. *Streptococcus sanguis* foi usado como microrganismo-teste, por ser uma das espécies mais comumente encontradas na placa dental. O azul de O-Toluidina mostrou-se citotóxico em baixas concentrações (5,0 µg/ml). A sensibilização de queratinócitos e fibroblastos com 2 e 5,0 µg/ml de azul de O-Toluidina, respectivamente, por 5 minutos e exposição ao laser HeNe de 7,3 mW, por 2 minutos, não reduziu a viabilidade celular. Entretanto, a morte do *Streptococcus sanguis* ocorreu após exposição ao laser HeNe por 75 segundos na presença de azul de O-Toluidina na concentração de 2,5 µg/ml.

Walsh (1997), apresentou uma revisão das aplicações do laser de baixa potência no tratamento da hipersensibilidade dentinária e da dor proveniente do ligamento periodontal e descreveu a fotossensibilização letal com laser, aplicada no tratamento da cárie dentária. Os lasers de alta potência geram calor que pode oferecer riscos de injúria térmica ao tecido pulpar, enquanto os lasers de baixa potência não produzem variação térmica que possa causar inflamação ou necrose pulpar. Os lasers de baixa potência apresentam normalmente valores de potência entre 10 e 50 mW, quando medida no nível do laser diodo, mas a potência final utilizável na peça de mão é menor, devido às perdas do sistema de entrega. Por esta razão a calibração do laser usando um medidor externo de potência é importante para a garantia da correta mensuração. O autor

concluiu que para a efetiva aplicação dos lasers de baixa potência é necessária a padronização dos protocolos de tratamento.

Bhatti et al. (1997), realizaram *in vitro* um estudo do efeito de fatores dosimétricos e fisiológicos na fotossensitização letal de *Porphyromonas gingivalis*, usando azul de O-Toluidina e laser HeNe. Os fatores dosimétricos avaliados foram: concentração de TBO, tempo de pré-irradiação e dose de luz. A destruição de bactérias diminuiu com o aumento da concentração do corante, porém de forma estatisticamente não significativa. Um aumento no tempo de pré-irradiação elevou discretamente a proporção de bactérias eliminadas. Houve 100% de eliminação das bactérias com a dose de energia de 4,4 J, mas uma destruição substancial (99,99%) foi obtida com a menor dose de energia utilizada (87,6 mJ). Os fatores fisiológicos estudados foram presença de soro, pH e fase de crescimento bacteriano. Embora o extermínio das bactérias tenha sido substancial na presença de soro, foi significativamente menor que o obtido na presença de saliva. Grande destruição foi alcançada nos três valores de pH (6,5; 7,3; 8,0). As células nas três fases de crescimento foram susceptíveis à fotossensitização letal, porém as células da fase estacionária foram levemente menos susceptíveis.

Wood et al. (1999), avaliaram, *in vitro*, o uso da terapia fotodinâmica para eliminação de bactérias em biofilmes formados *in vivo*. Para tanto, utilizaram uma ftalocianina catiônica e luz branca de uma lâmpada de filamento de tungstênio. Verificaram que houve dano considerável às bactérias do biofilme. Além disso, os biofilmes tratados apresentaram-se mais delgados e com estrutura diferente daquela dos biofilmes de controle. Os resultados demonstraram o valor potencial da terapia fotodinâmica no controle de biofilmes orais.

Bhatti et al. (2000), realizaram estudo para determinar se a conjugação do azul de O-Toluidina com anticorpo poderia ser usada para especificamente marcar *Porphiromona gingivalis* para fotossensitização letal na presença de *Streptococcus sanguis* ou fibroblastos gengivais humanos. Quando uma mistura de *Porphiromona gingivalis* e *Streptococcus sanguis* foi exposta ao TBO e irradiada com laser HeNe, houve redução na contagem de microrganismos viáveis, 1,5 e 4,0- \log_{10} -unidades, respectivamente. Já quando o TBO foi conjugado com anticorpo de *P. gingivalis*, as reduções nas contagens de viáveis de *P. gingivalis* e *S. sanguis* elevaram-se a 5,0 e 0,1 \log_{10} -unidades, respectivamente. A conjugação TBO-anticorpo foi também mais efetiva na redução de *P. gingivalis*, na presença de fibroblastos gengivais humanos, que o TBO puro.

König et al. (2000), descreveram um novo método para inativação bacteriana, baseado na excitação óptica de porfirinas fotossensitizadoras endógenas, por luz vermelha. Particularmente, a porfirina produzida pelas espécies patogênicas Gram-positivas *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces odontolyticus* e *Porphyronomas gingivalis* foi pesquisada. Espectroscopia autofluorescente revelou que estas bactérias sintetizam naturalmente o fotossensitizador protoporfirina IX. Colônias destas bactérias foram expostas à luz vermelha de λ de 632,8 nm, 100 mW/cm² de intensidade de luz e densidade de energia de 360 J/cm² de um laser de HeNe. Houve destruição significativa nas três espécies testadas mesmo após um único fototratamento. Os resultados sugeriram que o tratamento com luz vermelha pode ser potencialmente empregado como método terapêutico para inativação de espécies patogênicas de bactérias produtoras de porfirina sem o uso de fotossensitizadores externos.

Sibata et al. (2000), discutiram um novo conceito em terapia de doenças neoplásicas e não neoplásicas. Segundo os autores, a terapia fotodinâmica envolve ativação por luz, na presença de

oxigênio molecular, de certos corantes que são absorvidos pelos tecidos. Os autores discutiram o mecanismo de interação dos fotossensibilizadores e da luz, além dos efeitos produzidos no “tecido-alvo”. Fizeram considerações sobre o uso clínico da PDT e sobre os novos fotossensibilizadores que estão sendo desenvolvidos. Concluíram que a terapia é potencialmente efetiva e segura para tratamento de alguns tipos de câncer e de certas condições benignas, podendo ser usada como coadjuvante da cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Ressaltaram, porém, que para ser incluída na prática clínica, a PDT deve ser mais pesquisada para padronização do tratamento e estabelecimento de protocolos.

Ackroyd et al. (2001), fizeram uma revisão da origem e desenvolvimento da fotodeteção e da terapia fotodinâmica desde a antigüidade até o presente momento. Os cientistas Raab, Von Tappeiner e Finsen foram pioneiros na utilização da combinação de luz e drogas com finalidade terapêutica. Posteriormente, a produção de porfirinas e a subsequente descoberta das suas propriedades de localização de tumores e efeitos fototóxicos sobre tecidos tumorais levaram ao desenvolvimento da moderna terapia fotodinâmica. Atualmente, esta terapia está sendo empregada no tratamento de tumores desempenhando papel curativo em cânceres iniciais e paliativo nos avançados. Ao final da revisão, os autores ressaltaram a necessidade de novas pesquisas para aperfeiçoamento dos fotossensibilizadores no que diz respeito à seletividade, efeitos colaterais, toxicidade sistêmica e duração da fotossensitividade.

Usacheva, Teichert e Biel (2001), avaliaram a eficácia bactericida do azul de metileno e do azul de toluidina sobre diferentes bactérias, na presença e na ausência de luz. Foram testados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As fontes de luz

vermelha utilizadas foram um laser de Argônio de 630 nm e um laser diodo de 664 nm. Os efeitos da concentração do corante, tempo de incubação na ausência de luz, densidade de energia e densidade de potência do laser na destruição de diferentes bactérias foram analisados. O azul de toluidina exibiu maior atividade bactericida que o azul de metileno, tanto na presença quanto na ausência de luz. A fotodestruição completa das bactérias foi alcançada com o azul de toluidina em concentrações 1,5 a 7 vezes menores que as do azul de metileno. O aumento da densidade de energia e da densidade de potência, mantendo a concentração do corante constante, resultou em maior destruição das bactérias.

Zeina et al. (2001), estudaram a destruição microbiana através da terapia fotodinâmica *in vitro*. Para tanto, utilizaram uma combinação de azul de metileno (100 µg/ml) e luz visível (42 mW/cm²) e algumas espécies microbianas representativas daquelas encontradas na pele saudável e doente como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium minutissimum*, *Propionibacterium acnes* e *Candida albicans*. Este estudo mostrou que todas as espécies testadas foram susceptíveis à terapia fotodinâmica, mas as espécies eucarióticas como *Candida albicans* foram menos susceptíveis à destruição que as bactérias procarióticas. Os autores concluíram que a terapia fotodinâmica na pele pode representar uma alternativa ao tratamento antimicrobiano convencional.

Kömerik e Wilson (2002), avaliaram o efeito de fatores fisiológicos e ambientais na susceptibilidade de algumas bactérias à destruição mediada pelo azul de O-toluidina. Suspensões de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em saliva humana, soro de cavalo e salina foram expostas à luz do laser Hélio/Neônio, na presença do azul de O-toluidina. Suspensões adicionais das mesmas bactérias em diferentes fases de crescimento e

diversos pHs foram tratadas de forma idêntica. O número de bactérias viáveis em cada caso foi determinado antes e depois do tratamento. As três espécies de bactéria foram susceptíveis à fotossensibilização letal nas condições testadas. A presença de soro e, em menor grau, de saliva diminuíram o nível de morte bacteriana. O efeito bactericida foi reduzido em pH ácido, mas não foi afetado pela fase de crescimento da bactéria.

Seal et al. (2002), testaram *in vitro* a ação da fotossensibilização letal e da irrigação com hipoclorito de sódio sobre biofilmes de *Streptococcus intermedius* em canais radiculares, objetivando comparar a destruição bacteriana promovida pelos dois métodos. Foram utilizados 35 dentes humanos unirradiculares extraídos, inoculados com *Streptococcus intermedius* e incubados por 48 horas para formação do biofilme. Os dentes foram então submetidos a irrigação com hipoclorito de sódio a 3% ou a fotossensibilização letal usando vinte combinações de 4 concentrações do azul de O-toluidina (12.5, 25, 50 ou 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 5 doses de energia do laser (2.1, 3.2, 4.2, 10.5 e 21 J). Foi utilizado um laser HeNe de 35 mW aplicado na cavidade de acesso ao canal radicular sem a introdução de fibra óptica no interior do conduto. A ação isolada do laser e do azul de O-toluidina também foi testada. A combinação de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TBO e 21 J de energia alcançou a redução máxima de bactérias viáveis (5 \log_0 CFU). O TBO e o laser utilizados isoladamente apresentaram efeito moderado sobre as bactérias. O hipoclorito de sódio a 3% usado por 10 minutos destruiu completamente as bactérias. Portanto, a fotossensibilização letal teve efeito sobre biofilmes de *Streptococcus intermedius* em canais radiculares, embora não tenha sido tão efetiva quanto a irrigação com hipoclorito de sódio a 3%.

Simplicio, Maionchi e Hioka (2002), fizeram um histórico da terapia fotodinâmica e discutiram sobre as características dos fármacos usados nesta terapia. A combinação droga mais

luz está sendo utilizada para tratamento do câncer e de outras doenças como: degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, micoses fungóides, infestações bacterianas, arteriosclerose, entre outras que apresentam como característica comum um crescimento anormal de tecidos. Algumas das propriedades que as drogas fotoativas devem possuir são: características fotofísicas favoráveis; baixa toxicidade no escuro; fotossensibilidade não prolongada; farmacocinética favorável; simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado; facilidade de manuseio sintético; facilidade de obtenção em escala industrial; alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade). A primeira droga oficialmente aprovada para PDT pela Food and Drug Administration foi o Photofrin®, seguido pelo Levulan®Kerastick e Visudyne®. Os autores destacaram ainda que a PDT também pode ser utilizada como método de diagnóstico precoce do câncer, uma vez que muitos dos fármacos usados, além de apresentarem propriedades tumor-seletivas, exibem forte emissão de fluorescência.

Garcez et al. (2003), abordaram as principais indicações da terapia fotodinâmica na odontologia, assim como os principais corantes e fontes de luz encontrados na literatura. Concluíram que a terapia fotodinâmica é um eficiente método de redução bacteriana, mostrando-se mais eficiente em infecções localizadas, de pouca profundidade e de microbiota conhecida. Em vista do exposto, seu uso em diversas áreas odontologia é bastante indicado, não devendo, contudo, ser encarada como substituta de qualquer tratamento convencional, mas sim como uma terapia complementar e eficiente no tratamento de lesões e infecções bucais. Os autores ressaltaram que a terapia fotodinâmica não provoca resistência bacteriana, apresenta baixo custo, mínimos efeitos colaterais e ausência de efeitos sistêmicos.

Kömerik et al. (2003), realizaram um estudo em ratos para verificar se a fotossensitização letal, mediada pelo azul de toluidina, é eficaz sobre *Porphyromonas gingivalis*. Os autores também avaliaram o efeito da terapia na redução da perda óssea alveolar, característica da periodontite. O azul de toluidina foi utilizado nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/mL. O laser diodo de 630 nm foi aplicado por uma fibra óptica nas doses de 6, 12, 24 e 48 J. Molares de maxilares de ratos foram inoculados com *Porphyromonas gingivalis* e expostos ao laser, na presença do azul de toluidina. O número de bactérias sobreviventes foi então determinado e as estruturas periodontais foram examinadas, para verificação de algum possível dano. Reduções significativas no número de microrganismos viáveis foram alcançadas com todas as combinações dose do laser/concentração do fotossensitizador utilizadas. Destruição total das bactérias foi observada quando o azul de toluidina na concentração de 1 mg/mL foi usado com todas as doses de laser. No exame histológico, não foi detectado nenhum efeito adverso nas estruturas periodontais. Em um grupo adicional de animais, três meses após a aplicação da terapia fotodinâmica, os ratos foram sacrificados e o nível ósseo alveolar dos molares foi avaliado. A perda óssea nos animais submetidos à fotossensitização foi significativamente menor que a observada no grupo controle. Os resultados do estudo mostraram que a terapia fotodinâmica é possível *in vivo* e que diminuiu a perda óssea.

Shibli et al. (2003), avaliaram, através da análise de culturas bacterianas, a viabilidade de microrganismos após a fotossensitização letal, usada no tratamento de periimplantite induzida em cães. A indução foi realizada através da colocação de ligadura de algodão em torno dos implantes, por um período de dois meses. Fez-se então debridamento dos tecidos, lavagem das superfícies dos implantes com solução salina e coleta da primeira amostra microbiológica. Em seguida, foi injetado azul de O-toluidina próximo à margem óssea com uma agulha fina. O corante foi deixado

no local por um minuto e depois foi cuidadosamente removido. A área corada foi irradiada com laser diodo AlGaAs com potência de saída de 50 mW, comprimento de onda de 685 nm, por 80 segundos e dose de energia de 4 J. As superfícies mesial, distal, vestibular e lingual foram irradiadas por 20 segundos cada, perfazendo o total de 80 segundos. A segunda amostra microbiológica foi então obtida. As médias iniciais e finais de contagem bacteriana foram respectivamente 7.22 ± 0.20 e 6.84 ± 0.44 CFU/mL para contagem total de viáveis; 6.19 ± 0.45 e 3.14 ± 3.29 CFU/mL para *Prevotella intermedia/nigrescens*; 5.98 ± 0.38 e 1.69 ± 2.90 CFU/mL para *Fusobacterium* spp.; 6.07 ± 0.22 e 1.69 ± 2.94 CFU/mL para *Streptococcus* beta-hemolíticos. Os autores concluíram que o tratamento microbiológico da periimplantite pela fotossensitização letal reduziu ou eliminou, em algumas amostras, os microrganismos periodontais envolvidos nesta condição patológica.

Zanin et al. (2003), através de uma revisão da literatura, demonstraram que a terapia fotodinâmica, inicialmente idealizada para o tratamento do câncer, está sendo aplicada na odontologia, pois é eficaz na redução de bactérias orais relacionadas ao desenvolvimento das lesões de cárie e doença periodontal. Os autores descreveram como vantagens desta técnica: a morte da célula bacteriana pode ser rápida, não sendo necessária a manutenção do agente químico em altas concentrações sobre as lesões por longos períodos de tempo, como ocorre com o uso dos antibióticos; a terapia pode ser confinada à área da lesão pela aplicação tópica cuidadosa do corante e restrição da irradiação por meio de fibra óptica; custo reduzido comparado ao dos lasers de alta potência; caráter atraumático da terapia. Destacaram como uma das limitações da técnica, a ausência de parâmetros definidos para que a terapia fotodinâmica seja efetiva na eliminação das bactérias presentes em biofilmes, onde são mais resistentes do que aquelas crescidas em caldo de

cultura. Concluíram que estudos laboratoriais mais precisos devem ser realizados antes que essa terapia possa ser aplicada clinicamente em humanos.

Souza et al. (2006), avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica na viabilidade de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* em suspensões padronizadas contendo 10^6 células viáveis por mL. Para cada espécie, dez amostras foram irradiadas com laser diodo (685 nm, 28 J/cm^2) na presença do corante azul de metileno (0,1 mg/mL), dez amostras foram tratadas apenas com azul de metileno, dez amostras foram irradiadas com laser na ausência do corante, dez amostras não foram irradiadas nem tratadas com corante. Diluições seriadas foram obtidas de cada amostra e alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram plaqueadas em duplicata em agar Sabouraud. Após incubação por 48 horas a 37°C , foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). *Candida tropicalis* apresentou redução no número de UFC/mL quando tratada apenas com laser. As demais espécies não foram afetadas nem pela ação isolada do laser nem pela exposição ao azul de metileno. A radiação laser na presença do azul de metileno reduziu o número de UFC/mL em 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis*, 91,6% para *C. krusei* e 82,3% para *C. tropicalis*. Os autores concluíram então que a fotoativação do azul de metileno pela radiação laser de 685nm apresentou efeito fungicida em todas as espécies de *Candida* estudadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP sob Protocolo L150/2004, aprovado em 11 de novembro de 2004. Segue as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO A).

Este trabalho experimental foi desenvolvido na Faculdade de Ciências da Saúde, nos Laboratórios de Microbiologia e de Endodontia do Curso de Odontologia da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP.

Para realização deste estudo foram utilizados 112 dentes bovinos unirradiculares extraídos de animais abatidos para comercialização da carne, conforme laudo veterinário (ANEXO B).

3.1 O equipamento laser

Foi utilizado o equipamento laser de Arseneto de Gálio Alumínio (modelo KO-650, Kroman®, São Paulo, Brasil – Figura 3), comprimento de onda 685 nm e potência de 50 mW, conforme informações fornecidas pelo fabricante.

A potência de saída do equipamento foi de 40 mW e com o uso do sistema de fibra óptica fornecido pelo fabricante (Figura 4) foi reduzida para 5 mW. Essa aferição foi realizada com um medidor de potência Melles Griot® modelo 13PEM001 devidamente calibrado (Figura 5).

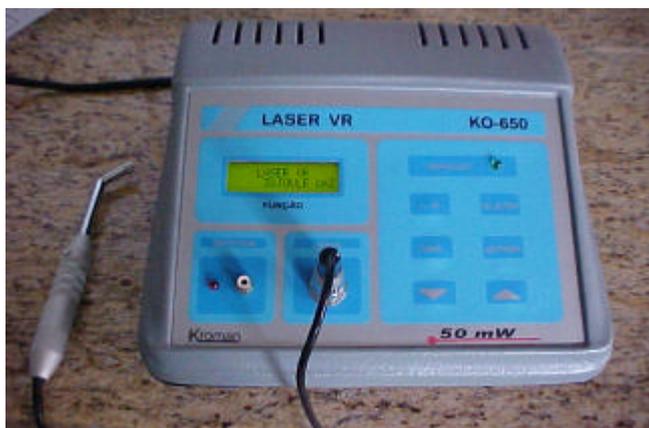


Figura 3: Aparelho laser Kroman®.

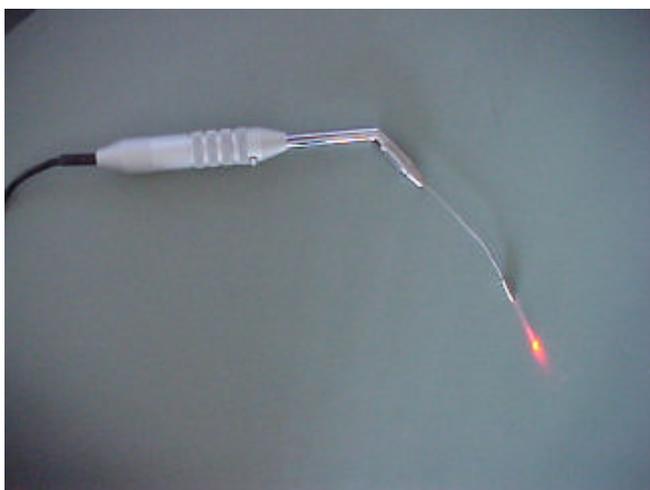


Figura 4: Fibra óptica acoplada à peça de mão, desenvolvida pelo fabricante Kroman®.



Figura 5: Medidor de potência Melles Griot®.

Utilizando o mesmo aparelho foi desenvolvido um sistema de acoplamento de fibra óptica no Laboratório de Aplicações de Lasers de alta potência em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D (Figura 6) que apresentou potência de saída de 15 mW, aferida pelo medidor supracitado.

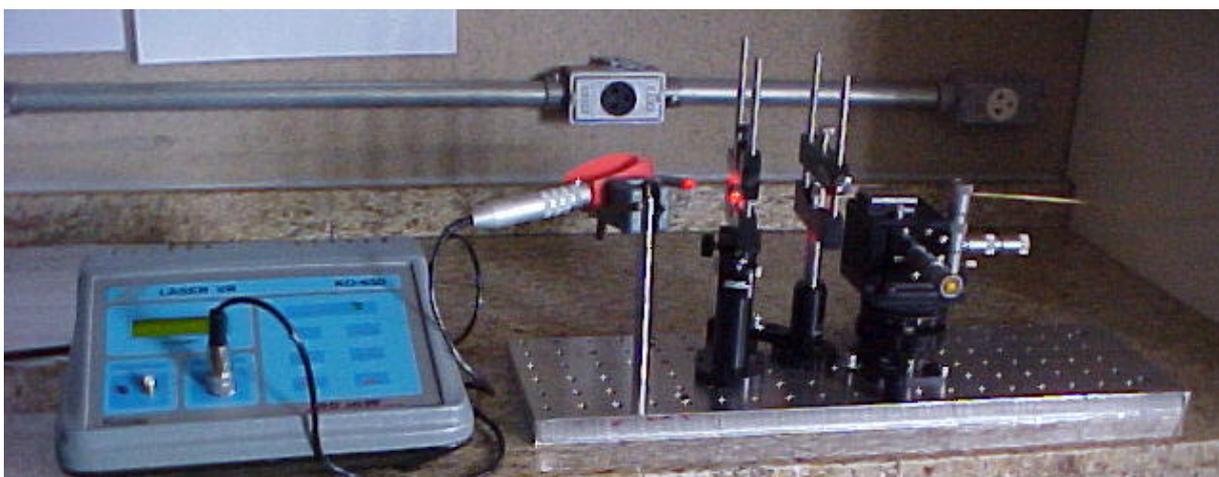


Figura 6: Sistema de acoplamento realizado no IP&D.

3.2 O fotossensibilizador

Dos corantes pesquisados por Garcez (2002), o azuleno 25% foi o que apresentou a banda de absorção mais próxima ao comprimento de onda do laser AlGaAs e também foi o mais eficiente na redução bacteriana. Porém, nesta concentração, o azuleno provoca manchamento da dentina e dificuldade na sua remoção. Para evitar tais inconvenientes o autor sugeriu a associação do corante à pasta Endo-PTC (F&A Laboratório Farmacêutico Ltda). Este creme foi desenvolvido por Paiva & Antoniazzi (PAIVA; ANTONIAZZI, 1993) e apresenta a seguinte composição: Peróxido de uréia (10%), Tween 80 (15%) e o veículo Carbowax (75%).

3.3 Estudo piloto - manchamento dos dentes

Tendo em vista que o uso intracanal de corantes provoca manchamento da dentina, sendo difícil a remoção dos mesmos após o tempo de pré-irradiação, este estudo piloto foi realizado com o objetivo de verificar se a associação do azuleno 25% ao creme de Endo-PTC facilitava a remoção do corante e limpeza dos dentes.

Cirurgias de acesso tradicionais foram realizadas em doze dentes unirradiculares bovinos, previamente imersos por 48 horas em hipoclorito de sódio 0,5%. As cirurgias de acesso foram realizadas com brocas esféricas diamantadas (HL 1016 KG-Sorensen®). Em seguida, os dentes foram esvaziados com limas Hedströen #50 (Dentsply®), irrigados com 2 mL de líquido de Dakin e secos com cones de papel absorvente #50 (Dentsply®). Os canais e as câmaras pulpares de seis dentes foram completamente preenchidos com azuleno 25% associado ao creme de Endo-PTC e os outros seis dentes receberam apenas o azuleno 25%. Após 5 minutos, correspondentes ao período de pré-irradiação, todos os dentes foram irrigados com 5 mL de líquido de Dakin, no intuito de promover remoção mecânica e química, por efervescência, do corante. Verificou-se por meio de análise visual, que a remoção da associação corante/Endo-PTC foi efetiva, enquanto nos dentes que receberam apenas corante observou-se o manchamento das coroas.

3.4 Padronização do protocolo

3.4.1 Ação da terapia fotodinâmica em culturas de *Candida albicans* em tubos de ensaio.

A cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) foi inoculada em 48 mL de caldo Sabouraud (DIFCO), de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland (5×10^5 UFC/mL) e alíquotas de

1,2 mL foram pipetadas e transferidas para quarenta tubos de ensaio. Em seguida, de cada tubo retirou-se 0,2 mL de caldo contaminado e plaqueou-se em ágar Sabouraud (DIFCO) para confirmação da viabilidade das leveduras (Grupo controle).

Os quarenta tubos de ensaio, comprovadamente contaminados com a suspensão de *Candida albicans*, foram então divididos em quatro grupos de 10 tubos cada um:

Grupo 1: os dez tubos receberam 1 mL de solução de hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos e amostras de 0,2 mL foram colhidas e plaqueadas para verificação da ação dessa substância sobre os fungos.

Grupo 2: os dez tubos foram irradiados com o laser diodo de AlGaAs 685 nm, 40 mW, 3 minutos, do fundo para a abertura do tubo; amostras de 0,2 mL foram colhidas e plaqueadas para observação da ação isolada do laser sobre os microrganismos.

Grupo 3: os dez tubos receberam 1 mL, por tubo, da pasta azuleno 25% / Endo-PTC. Realizou-se a mistura no vortex e, após 5 minutos, amostras de 0,2 mL foram colhidas e plaqueadas, com o intuito de se observar a ação isolada do fotossensibilizador.

Grupo 4: os dez tubos receberam 1 mL, por tubo, da pasta azuleno 25% / Endo-PTC. Realizou-se a mistura no vortex e após 5 minutos, período pré-irradiação, os dez tubos foram irradiados com o laser AlGaAs com os seguintes parâmetros 685 nm, 40 mW por 3 minutos do fundo para a abertura do tubo (Figura 7). Em seguida, os tubos foram novamente colocados no vortex e amostras de 0,2 mL foram colhidas, plaqueadas e incubadas a 35°C por 48 h, para avaliação da ação da terapia fotodinâmica sobre as leveduras.

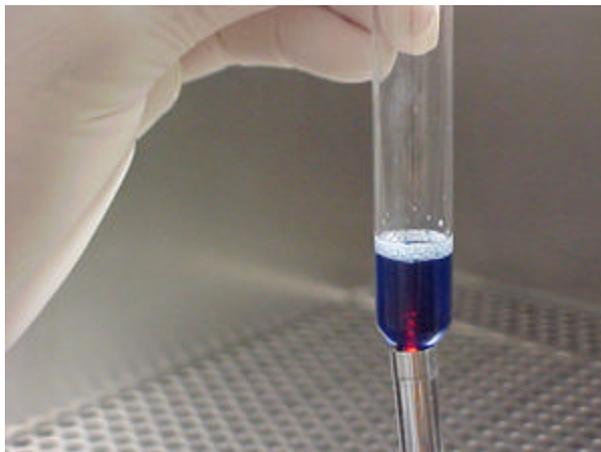


Figura 7: Irradiação do fundo para a abertura do tubo.

3.4.2 Ação da terapia fotodinâmica em culturas de *Candida albicans* em tubos de ensaio - modificação na forma de irradiação.

Como a terapia fotodinâmica não foi efetiva sobre as culturas de *Candida albicans*, tentou-se uma modificação na forma de irradiação. Repetiu-se o experimento anterior, porém a irradiação foi feita por um minuto no fundo do tubo (Figura 7) e trinta segundos em quatro pontos contornando as paredes laterais do mesmo (Figura 8).

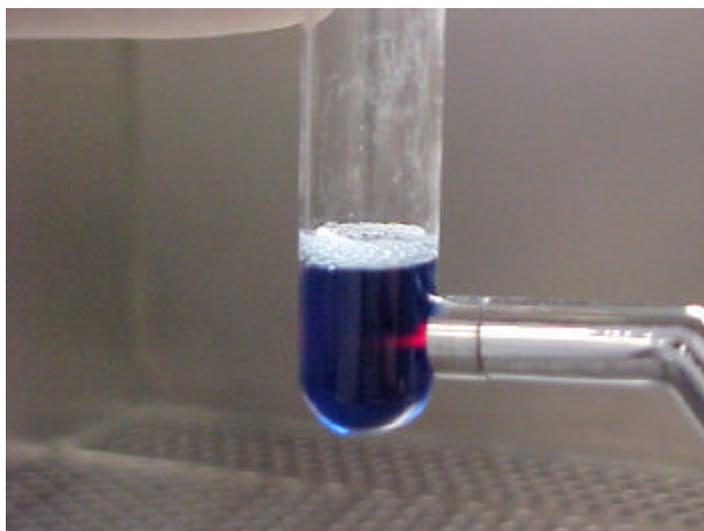


Figura 8: Irradiação contornando as paredes laterais do tubo.

3.4.3 Ação da terapia fotodinâmica em suspensões de *Candida albicans* utilizando a fibra óptica com sistema de acoplamento da Kroman®.

O fotossensibilizador usado neste estudo foi o azuleno 25% associado ao Endo-PTC. O equipamento utilizado foi o laser de Arseneto de Gálio Alumínio (AlGaAs) com acoplamento de fibra óptica acrílica à peça de mão, desenvolvida pelo fabricante KROMAN® para utilização em canais radiculares.

Segundo o fabricante, a potência do equipamento utilizado nesta pesquisa é de 50mW, apresentando pequena diminuição da mesma após o acoplamento da fibra. Entretanto, utilizando-se o medidor para aferição da potência do aparelho, verificaram-se valores de 40mW antes e 5mW após o acoplamento.

Utilizou-se a técnica sugerida por Gutknecht (2000) de irradiação helicoidal para os lasers de alta potência, na tentativa de irradiar todas as paredes do canal.

Vinte dentes bovinos, previamente imersos por 48 horas em hipoclorito de sódio a 0,5%, tiveram suas coroas cortadas com disco de Carborundum, de forma que as raízes ficassem com 20 mm de comprimento. O tecido pulpar foi removido com limas Hedströen (Dentsply®) #35. As entradas dos canais foram preparadas com brocas Gattes-Glidenn® número 4 e Batt® número 14 e os canais radiculares foram instrumentados e alargados em toda a sua extensão com limas tipo K-file (Dentsply®), no mínimo até o calibre 45, seguindo a técnica de Paiva e Antoniazzi (1993). Os ápices radiculares foram selados com resina composta fotoativada Z100 (3M®) cor A3. As superfícies externas das raízes foram impermeabilizadas com duas camadas de esmalte para unhas na cor preta, para evitar espalhamento da luz.

No terço cervical de cada raiz foi feita uma amarrinha com fio 0,25 mm para que o dente pudesse ser introduzido e retirado do tubo de ensaio, sem haver contato manual (Figura 9). As

raízes foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos no interior de tubos de ensaio com tampas de rosca.



Figura 9: Preparo do dente.

As vinte raízes foram contaminadas com um inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 (Figura 10) obtido de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland (5×10^5 UFC/mL). Após este período, amostras foram colhidas (Figura 11) para confirmar a contaminação dos canais (controle positivo).



Figura 10: Contaminação da raiz com inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231.



Figura 11: Coleta de amostra.

As vinte raízes comprovadamente contaminadas com suspensão de *Candida albicans* foram então divididas em quatro grupos de 5 raízes cada um:

Grupo 1: as raízes receberam solução de hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos. Amostras foram colhidas imediatamente após para avaliação da possível redução microbiana.

Grupo 2: as raízes foram irradiadas com a fibra óptica com os seguintes parâmetros: 685 nm, 5 mW, 3 minutos e 0,9 J, em movimentos helicoidais (Figura 12). Amostras foram colhidas para verificação da ação isolada do laser.

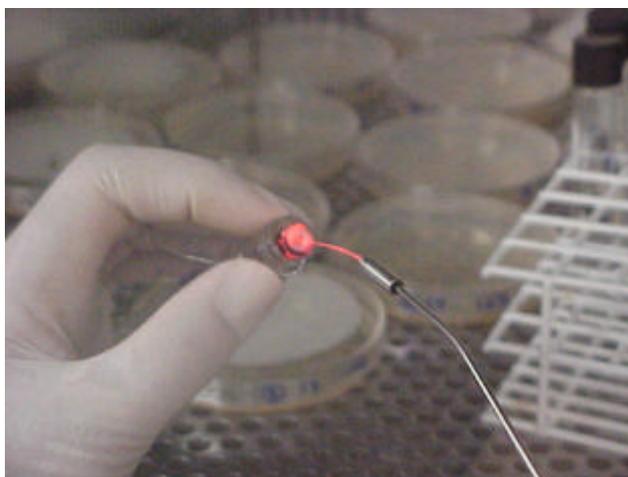


Figura 12: Irradiação com fibra óptica.

Grupo 3: as raízes receberam o corante azuleno 25% / Endo-PTC por um período de 5 minutos (Figura 13). Em seguida, amostras foram colhidas para verificação da possível ação tóxica do corante sobre as leveduras.

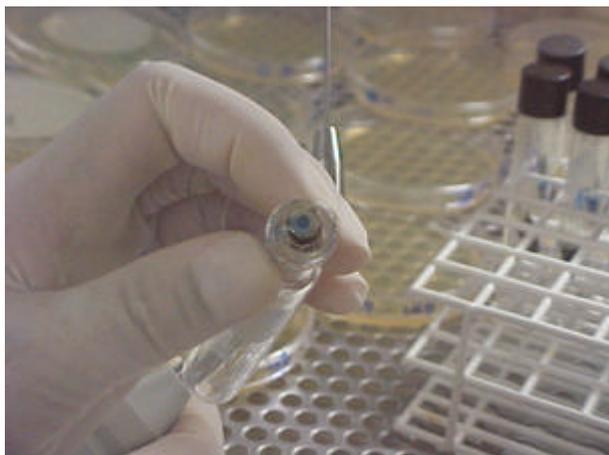


Figura 13: Canal preenchido com azuleno 25% / Endo-PTC.

Grupo 4: as raízes receberam o corante azuleno 25% associado ao Endo-PTC por um período pré-irradiação de 5 minutos e foram irradiadas com a fibra óptica com parâmetros idênticos aos do grupo 2, também em movimentos helicoidais. Amostras foram colhidas após estes procedimentos para avaliação da ação da terapia fotodinâmica sobre os fungos.

A mistura do corante azuleno 25 % com o creme Endo-PTC, na proporção de duas gotas de corante para dois gramas de creme (Figura 14), foi realizada dentro da câmara escura de revelação de radiografia, evitando-se a ação da luz natural e artificial sobre o corante.



Figura 14: Azuleno 25% e Creme Endo-PTC.

Todas as amostras foram colhidas com cones de papel absorvente estéreis que foram mergulhados, imediatamente depois, em tubos contendo 3 mL de caldo Sabouraud. Alíquotas de 0,2 mL desses caldos foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas por 48 horas a 35°C, antes da leitura dos resultados.

3.4.4 Ação da terapia fotodinâmica em suspensões de *Candida albicans* utilizando a fibra óptica com sistema de acoplamento desenvolvido no IP&D.

O fotossensibilizador usado neste estudo foi o azuleno 25% associado ao creme de Endo-PTC. O equipamento utilizado foi o laser de Arseneto de Gálio Alumínio (AlGaAs) com acoplamento de fibra óptica de sílica, com diâmetro de núcleo de 600 μm , desenvolvido no Laboratório de Aplicações de Lasers de alta potência em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D, para utilização nos canais radiculares (Figura 15).



Figura 15: Acoplamento da fibra óptica desenvolvido no IP&D.

Após o acoplamento da fibra óptica, utilizou-se o medidor de potência para aferição da potência de saída da ponta da fibra, verificando-se o valor de 15mW.

Utilizou-se novamente a técnica de irradiação helicoidal, sugerida por Gutknecht (2000) para os lasers de alta potência, na tentativa de irradiar todas as paredes do canal.

Quarenta dentes bovinos foram preparados de forma semelhante à descrita anteriormente, sendo então divididos em quatro grupos de dez dentes cada. Os grupos foram submetidos aos procedimentos descritos no item 3.4.3 e a leitura dos resultados foi realizada após o período de incubação.

3.4.5 Experimento principal: Ação da terapia fotodinâmica em suspensões de *Candida albicans* utilizando a fibra óptica com sistema de acoplamento desenvolvido no IP&D – protocolo misto.

Na tentativa de se alcançar um efeito inibidor em *Candida albicans*, o experimento anterior foi repetido aplicando-se o laser de forma diferente. Neste protocolo misto a forma de irradiação foi a seguinte: introduziu-se a fibra 10 mm no interior do canal radicular e mantendo-a

nesta posição acionou-se o laser (685 nm, 15 mW, 1,8 J) por 2 minutos (Figura 16). Removeu-se a fibra e, em seguida, posicionou-se a peça de mão na entrada do canal e nesta posição acionou-se o laser nos seguintes parâmetros: 685 nm, 40 mW e 4,8 J, por mais 2 minutos (Figura 17). Este protocolo foi realizado visando a irradiação de toda a área do canal radicular, evitando-se que algumas regiões do conduto não fossem atingidas pelo raio laser, o que poderia ter ocorrido na técnica de irradiação helicoidal. Foram utilizados quarenta dentes bovinos e todos os procedimentos foram semelhantes aos descritos no item 3.4.3, exceto a forma de irradiação dos grupos 2 e 4.

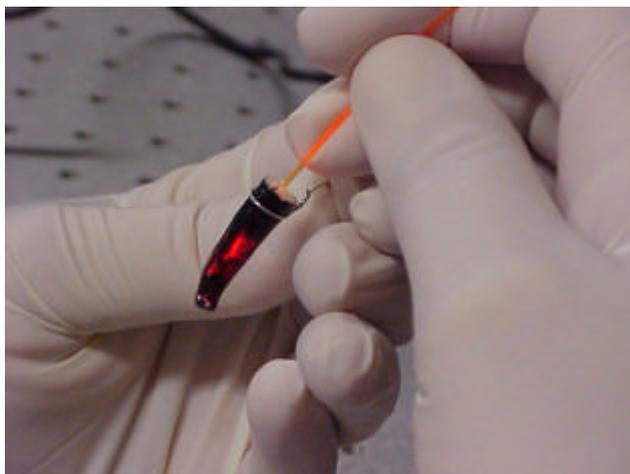


Figura 16: Irradiação com a fibra óptica.

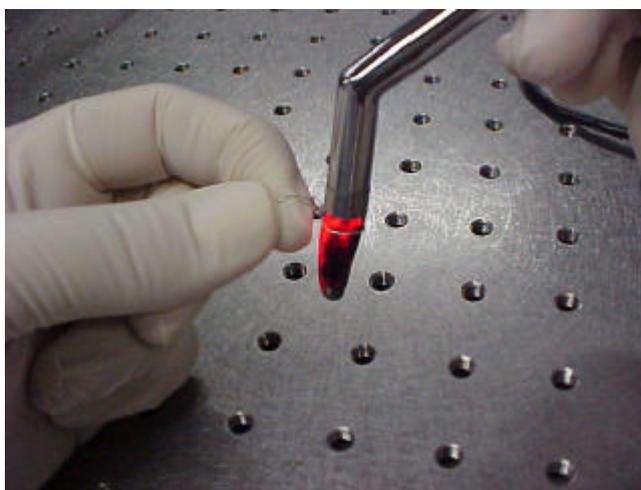


Figura 17: Irradiação com a peça de mão.

Os experimentos do item 3.4.1 ao 3.4.5 foram realizados sob condições de assepsia, em fluxo laminar (Figura 18).



Figura 18: Fluxo laminar.

4. RESULTADOS

Em todos os experimentos realizados, tanto em tubos quanto em raízes os resultados foram semelhantes. Todas as placas semeadas para controle positivo apresentaram um número incontável de colônias (superior a 100.000 UFC/mL), confirmando assim a contaminação (Figura 19).



Figura 19: Placas pertencentes ao grupo controle.

A observação das placas semeadas no Grupo 1, após aplicação da solução de hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos, revelou a inexistência de colônias (zero UFC/mL), confirmando a ação fungicida dessa substância (Figura 20).

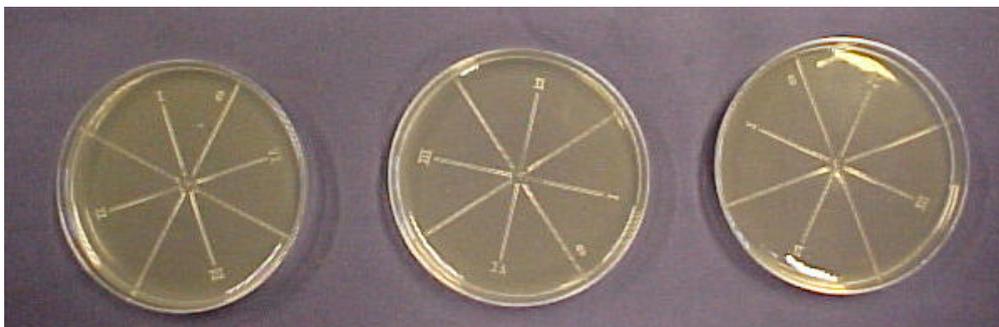


Figura 20: Placas pertencentes ao grupo 1 – hipoclorito de sódio a 1%.

Por sua vez, nas placas semeadas nos Grupos 2, 3 e 4, nos quais utilizou-se, respectivamente, somente aplicação de laser (Figura 21), apenas fotossensibilizador (Figura 22) e terapia fotodinâmica (Figura 23), não se observou descontaminação. As placas provenientes desses grupos apresentaram-se com número de colônias superior a 100.000 UFC/mL, semelhantes, portanto, às placas referentes ao grupo controle.



Figura 21: Placas pertencentes ao grupo 2 – laser isolado.



Figura 22: Placas pertencentes ao grupo 3 – fotossensibilizador isolado.



Figura 23: Placas pertencentes ao grupo 4 – terapia fotodinâmica.

5. DISCUSSÃO

A eliminação dos microrganismos é muito importante no tratamento endodôntico, devido ao papel por eles desempenhado na indução e perpetuação das alterações pulpares e periapicais. O tratamento convencional compreende alargamento mecânico do canal principal, irrigação com substância antimicrobiana, medicação intracanal e obturação. A maioria dos microrganismos, presentes em canais radiculares infectados, pode ser removida por estes procedimentos endodônticos de rotina. Porém, a total eliminação não ocorre na prática clínica, devido a fatores como a complexidade anatômica dos canais radiculares e a resistência intrínseca dos microrganismos. Segundo Bramante e Garcia (2002), após a obturação do canal radicular, eventuais microrganismos que permaneçam viáveis poderão ser reativados, caso ocorra percolação entre o material obturador e a parede do conduto, levando nutrientes aos mesmos.

Lesões refratárias ao tratamento endodôntico são aquelas que se apresentam em dentes onde os canais radiculares passaram por um correto preparo biomecânico, observando-se radiograficamente obturação bem executada, sem que a lesão responda ao tratamento, persistindo após a preservação (NISHIYAMA, LEAL ; CAMARGO, 2002). A conduta clínica nesses casos é o retratamento do canal e, caso a lesão periapical não regrida, a cirurgia paraendodôntica deve ser indicada.

A microbiota de canais com insucesso do tratamento endodôntico difere daquela encontrada normalmente em dentes necrosados e não tratados, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, sendo caracterizada por monoinfecções com predominância de microrganismos anaeróbios facultativos. O número limitado de microrganismos encontrados nos dentes tratados endodonticamente, deve-se a fatores de seleção que determinam a persistência daqueles capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos, aos medicamentos utilizados na terapia endodôntica e

sobreviver em um meio escasso de nutrientes. O baixo número de espécies microbianas isoladas de casos de retratamento está provavelmente relacionado à qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamentos endodônticos de má qualidade apresentam uma microbiota similar àquela encontrada nos dentes não tratados, os quais contêm um maior número de espécies microbianas (SUNDQVIST et al., 1998).

Os fungos, especialmente *Candida albicans*, podem estar associados a infecções persistentes e são resistentes a diversas medicações normalmente utilizadas nos canais radiculares (KUBO; GOMES; JORGE, 1997). A parede celular dos fungos, que são seres eucarióticos, é constituída principalmente de quitina, enquanto a das bactérias, que são procarióticas, é composta por peptidoglicana. Sendo assim, fungos são insensíveis a antibióticos tais como penicilina, que inibem a síntese de peptidoglicana (LEVINSON; JAWETS, 1998). Além disso, enquanto existe uma enorme quantidade de antibióticos, as drogas antifúngicas compõem um grupo de apenas cinco fármacos que apresentam efeitos colaterais consideráveis, uma vez que as células humanas são eucarióticas.

A terapia fotodinâmica é um eficiente método de redução bacteriana, mostrando-se eficaz em infecções localizadas, de pouca profundidade e microbiota conhecida (GARCEZ et al., 2003). Devido à importância dos fungos nas infecções endodônticas, o presente estudo avaliou a efetividade desta técnica em canais radiculares contaminados com *Candida albicans*.

Inicialmente, testou-se a terapia fotodinâmica em suspensões de *Candida albicans* em tubos de ensaio. A irradiação foi realizada do fundo para a abertura do tubo por 3 minutos, segundo protocolo empregado por Garcez, 2002, não sendo observado nenhum efeito antifúngico.

Repetiu-se então o experimento alterando a forma de irradiação, visando atingir áreas do tubo que poderiam não ter recebido a luz, com a aplicação apenas no fundo do mesmo. A dose foi fracionada em cinco aplicações distribuídas no fundo e em quatro pontos nas laterais do tubo, e os

resultados obtidos anteriormente se repetiram. A hipótese levantada para a ineficiência da técnica foi o grande volume irradiado. Usacheva, Teichert e Biel, (2001), verificaram que o aumento da espessura da solução irradiada resultava em diminuição da ação bactericida.

Realizou-se novo experimento em raízes de dentes bovinos extraídos, nas quais o volume de suspensão de *C. albicans* seria bem menor do que o presente nos tubos de ensaio. Além disso, haveria possibilidade de simulação da situação que ocorreria *in vivo*.

Foi utilizado o laser Kroman® que teve uma fibra óptica acrílica acoplada pelo fabricante para utilização em canais radiculares. Os resultados foram novamente os mesmos. Segundo o fabricante, a potência do equipamento utilizado nesta pesquisa é de 50 mW, apresentando pequena diminuição da mesma após o acoplamento da fibra. Entretanto, a aferição da potência do aparelho, com o medidor de potência Melles Griot®, demonstrou valores de 40 mW antes e 5 mW após o acoplamento, havendo, portanto, uma perda de quase 90% da potência ao utilizar-se a fibra. A queda na potência poderia justificar a ineficiência da PDT observada neste estudo, uma vez que a dose de energia resultante foi de apenas 0,9 J.

Procurou-se uma forma de conexão da fibra que não determinasse uma perda tão significativa de potência. Foi então desenvolvida uma forma de acoplamento no IP&D que resultou em potência de saída na extremidade da fibra de 15 mW. Repetiu-se o experimento anterior com esta fibra e dessa forma a dose de energia foi triplicada (2,7 J), pois, embora o tempo de irradiação de 3 minutos tenha sido mantido, a potência foi três vezes maior. Não houve, contudo, alteração dos resultados. A técnica de aplicação helicoidal foi utilizada na tentativa de irradiar todas as paredes do canal, entretanto, algumas áreas podem não ter sido alcançadas, devido às anfractuosidades existentes no conduto. Os nichos não irradiados podem ter sido a causa do insucesso da terapia fotodinâmica.

Partiu-se então para um protocolo misto de irradiação, visando atingir todas as áreas do canal. Aumentou-se também o tempo de irradiação para quatro minutos. Durante 2 minutos a irradiação foi realizada com a fibra óptica de 15 mW de potência posicionada no interior do canal radicular, resultando em 1,8 J de energia. Em seguida, a peça de mão de 40 mW de potência foi acionada por mais 2 minutos na entrada do canal, ou seja, aplicou-se 4,8 J de energia, totalizando a dose de 6,6 J. Não se conseguiu a eliminação dos fungos, apesar das modificações realizadas no protocolo.

No presente estudo, os resultados obtidos com a solução de hipoclorito de sódio a 1% coincidem com aqueles alcançados por D’Arcangelo; Varvara e Fazio, 1999, que obtiveram efeito fungicida nos tempos de 10, 20 ou 30 minutos de contato, com diversas concentrações do produto. Concordam também com os de Ferguson, Hatton e Gillespie, 2002, que também conseguiram total inibição do crescimento de *C. albicans* com todas as concentrações testadas. Entretanto, Valera; Rego e Jorge, 2001, constataram apenas 70% de efetividade do hipoclorito de sódio a 1% em canais radiculares contaminados com *C. albicans*.

Na ausência do fotossensibilizador, a aplicação do laser não afetou a viabilidade dos fungos. Utilizando apenas o laser AlGaAs com comprimento de onda de 660 nm e potência de 11mW, por 2 minutos, em culturas de *C. albicans*, Wilson e Mia, 1993, também não observaram ação fungicida.

Avaliou-se também a ação isolada do fotossensibilizador sobre culturas de *Candida albicans*. Quando o azuleno 25% / Endo-PTC foi utilizado sem o laser, não se observou redução fúngica, demonstrando que o corante nesta concentração não apresentou efeito citotóxico. Garcez, 2002, também observou que o corante natural azuleno na concentração de 25% associado ao creme Endo-PTC não apresentou efeito antibacteriano em culturas de *Enterococcus faecalis*.

Seal et al., (2002), utilizando a terapia fotodinâmica, conseguiram a máxima redução em biofilmes de *Streptococcus intermedius*, em canais de dentes humanos extraídos, quando utilizaram azul de O-toluidina na concentração de $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$ associado ao laser He-Ne na dose de 21 J, efeito inferior ao alcançado pela utilização de hipoclorito de sódio a 3% por dez minutos, que destruiu totalmente as bactérias. No presente estudo, a dose de 6,6 J pode ter sido insuficiente para destruir os fungos, entretanto o hipoclorito de sódio a 1% usado por 15 minutos teve ação fungicida. A contagem de unidades formadoras de colônia não foi realizada, pois o objetivo era verificar a ação fungicida total (zero UFC/mL). Souza et al., 2006, observaram redução de 88,6% no número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) para *Candida albicans*. A metodologia foi bastante diferente da empregada no estudo atual, pois utilizaram o corante azul de metileno (0,1 mg/mL) e o laser diodo InGaAlP nos seguintes parâmetros: 35 mW, 5 minutos, 28 J/cm^2 de densidade de energia, irradiando placas com área de $0,38 \text{ cm}^2$. Entretanto, os comprimentos e calibres dos canais radiculares são bastante variados, não sendo possível o cálculo das áreas dos mesmos.

Garcez (2002), usando metodologia semelhante à do atual estudo, conseguiu destruir completamente suspensões de *Enterococcus faecalis* com dose de 1,8 J. Zeina et al. (2001), testaram a efetividade da PDT em diferentes microrganismos e observaram que as bactérias procarióticas foram mais susceptíveis do que as espécies eucarióticas como *C. albicans*. Segundo os autores, as diferenças nos resultados podem ser explicadas pelas variações de susceptibilidade das diferentes espécies de microrganismos. É possível que *Candida albicans* seja menos sensível à terapia por apresentar uma membrana nuclear, que pode atuar como uma barreira adicional ao corante ou aos radicais livres produzidos nas reações da PDT. Deve-se considerar também que a parede celular de quitina pode dificultar a penetração do corante na célula.

Outra hipótese a ser estudada envolve a consistência cremosa da associação azuleno a 25% com Endo-PTC, que pode ter gerado deficiência na penetração do corante nos túbulos dentinários e, até, no interior das células fúngicas, sugerindo a importância de se utilizar a microscopia de fluorescência no estudo desses eventos.

Diversas variáveis podem afetar o número de células destruídas com o uso de PDT, tais como: concentração e tipo de corante, tempo de pré-irradiação, concentração e estágio fisiológico dos microrganismos, tempo de exposição ao laser e densidade de energia (WILSON; MIA, 1993). Portanto, estudos complementares são necessários para se determinar a penetração dos fotossensibilizadores na intimidade dos canais radiculares e no interior das células fúngicas, bem como considerar as variações anatômicas, presentes nos canais radiculares tais como comprimentos e calibres dos mesmos. A dose e forma de irradiação parecem determinar respostas distintas, incentivando a busca de protocolo para a PDT que exerça um efeito fungicida em canais radiculares com lesões refratárias ao tratamento convencional.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nos parâmetros utilizados no presente estudo, permitem sugerir que:

- O hipoclorito de sódio a 1% em contato com suspensão de *Candida albicans* foi efetivo na descontaminação total dos canais radiculares.
- A terapia fotodinâmica não apresentou ação fungicida sobre os canais radiculares contaminados com *Candida albicans*.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diversas variáveis interferem na efetividade da PDT. Sendo assim, estudos complementares devem ser realizados para estabelecimento de protocolo eficiente e seguro que possibilite a aplicação da terapia fotodinâmica em canais radiculares na prática odontológica, tais como:

- Por meio de microscopia de fluorescência, verificar se o corante azuleno 25% associado ao creme de Endo-PTC é capaz de penetrar no interior da célula de *Candida albicans*.
- Repetir o experimento principal do presente estudo, aumentando as doses de energia do laser, seja pelo aumento do tempo de irradiação, pelo aumento da potência ou ambos.

REFERÊNCIAS

- ABOU-RASS, M.; BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v.31, p.39-47, 1998.
- ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.5, p.656-659, 2001.
- ATES, M.; AKDENIZ, B. G.; SEN, B. H. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.100, n.5, p.626-630, 2005.
- BHATTI, M. et al. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.10, p.2615-2618, 2000.
- BHATTI, M. et al. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis in vitro*. **Photochemistry and Photobiology**, v.65, n.6, p.1026-1031, 1997.
- BRAMANTE, C. M.; GARCIA, R. B. Quando falha o tratamento endodôntico, quais são as alternativas terapêuticas. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Endodontia – Trauma**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 323-368.
- BUCK, R. A. et al. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. **Journal of Endodontics**, v.27, n.3, p.206-208, 2001.
- CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Endodontia – Trauma**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. 476 p.
- D'ARCANGELO, C.; VARVARA, G.; FAZIO, P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. **Journal of Endodontics**, v.25, n.5, p.351-353, 1999.
- DOBSON, J.; WILSON, M. Sensitization of oral bacteria in biofilmes to killing by light from a low-power laser. **Archs oral Biol.**, v.37, n.11, p.883-887, 1992.
- FERGUSON, J. W.; HATTON, J. F.; GILLESPIE, M. J. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. **Journal of Endodontics**, v.28, n.2, p.68-71, 2002.
- FLEURY, A. A. P.; AUN, C. E. Rationale for microbiological diagnosis in endodontic therapy. **Rev. Fac. Odont. F. Z. L.**, v.2, n.2, p.106-111, 1990.
- GARCEZ, A.S. **Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico**. 2002. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- GARCEZ, A. S. et al. Terapia fotodinâmica em odontologia – laser de baixa potência para redução microbiana. **Revista da APCD**, v.57, n.3, p.223-226, 2003.
- GUTKNECHT, N.; VAN GOGSWAARDT, D.; CONRADS, G.; APEL, C.; SCHUBERT, C.; LAMPERT, F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, n.2, p.57-60, 2000.

- KÖMERIK, N. et al. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.3, p.932-940, 2003.
- KÖMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.618-623, 2002.
- KÖNIG, K. et al. Red light kills bacteria via photodynamic action. **Cellular and Molecular Biology**, v.46, n.7, p.1297-1303, 2000.
- KUBO, C. H.; GOMES, A. P. M.; JORGE, A. O. C. Isolamento de *Candida* de canais radiculares e verificação da sua sensibilidade a medicamentos utilizados na prática endodôntica. **Rev. Odontol. UNICID**, v.9, p.119-130, 1997.
- LEONARDO, M. R. et al. In vivo antimicrobial activity of 2% clorexidine used as a root canal irrigating solution. **Journal of Endodontics**, v.25, n.3, p.167-171, 1999.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 415 p.
- NAIR, P. N. R. et al. Intraradicular bactéria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **Journal of Endodontics**, v.16, n.12, p.580-588, 1990.
- NISHIYAMA, C. K.; LEAL, J. M.; CAMARGO, J. M. P. Tratamento cirúrgico das infecções periapicais: quando indicar. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Endodontia – Trauma**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 369-390.
- ÖZTAN, M. D. et al. Antimicrobial effect, *in vitro*, of gutta-percha points containing root canal medications against yeasts and *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** v.102, p.410-416, 2006.
- PAIVA, J. G.; ANTONIAZZI, J. H. **Endodontia** bases para a prática clínica. São Paulo: Artes Médicas, 1984. 640p.
- PECIULIENE, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v.34, p.429-434, 2001.
- PETERS, L. B. et al. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v.27, n.2, p.76-81, 2001.
- PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v.36, p.1-11, 2003.
- SEAL, G. L. et al. An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **International Endodontic Journal**, v.35, p.268-274, 2002.
- SEN, B. H.; SAFAVI, K. E.; SPÅNGBERG, L. S. W. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. **Archs oral Biol.**, v.42, n.7, p.513-520, 1997.
- SHIBLI, J. A. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. **Journal of Oral Science**, v.25, p.17-23, 2003.

- SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.8, p.869-880, 2000.
- SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v.25, n.5, p.801-807, 2002.
- SIQUEIRA JR, J.F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **International Endodontic Journal**, v.34, p.1-10, 2001.
- SIQUEIRA JR, J. F. et al. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. **Journal of Endodontics**, v.25, n.5, p.332-335, 1999.
- SIQUEIRA JR, J. F. et al. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. **Journal of Endodontics**, v.29, n.8, p.501-504, 2003.
- SIQUEIRA JR, J. F. et al. Fungal infection of the radicular dentin. **Journal of Endodontics**, v.28, n.11, p.770-773, 2002.
- SIQUEIRA JR, J. F. et al. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. **Journal of Endodontics**, v.23, n.8, p.499-502, 1997.
- SIQUEIRA JR, J. F. Medicação intracanal: Por que e quando usar? In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. **Endodontia – Trauma**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p. 219-238.
- SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.18, p.253-259, 1996.
- SOUZA, R. A. Lesões refratárias – Como tratá-las endodonticamente. **Rev. ABO Nac.** v.9, n.5, p.290-294, 2001.
- SOUZA, S. C. et al. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.83, p. 34-38, 2006.
- SUNDE, P. T. et al. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **Journal of Endodontics**, v.28, n.4, p.304-310, 2002.
- SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v.85, n.1, p.86-93, 1998.
- USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.29, p.165-173, 2001.
- VALERA, M. C.; REGO, J. M.; JORGE, A. O. C. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. **Journal of Endodontics**, v.27, n.6, p.401-403, 2001.
- ZANIN, I. C. J.; BRUGNERA JR, A.; ZANIN, F.; GONÇALVES, R. B. Terapia fotodinâmica na odontologia (T. F. D.). **RGO**, v.51, n.3, p.179-182, 2003.
- ZEINA, B. et al. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v.144, p.274-278, 2001.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Australian Dental Journal**, v.42, n.5, p.302-306, 1997.

WILSON, M.; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **J Oral Pathol Med**, v.22, p.354-357, 1993.

WOOD, S. et al. An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed in vivo. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.50, p.1-7, 1999.

ANEXO A

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP****CERTIFICADO**

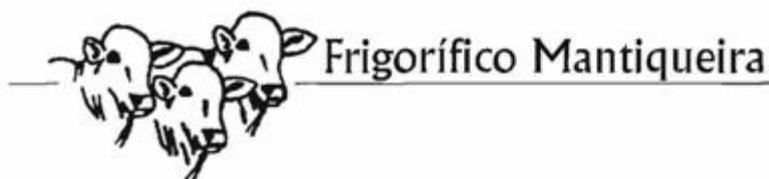
Certificamos que o Protocolo n.º L150/2006/CEP, intitulado "*Terapia fotodinâmica aplicada em canais radiculares: estudo da ação sobre colônias de Candida albicans*", sob a responsabilidade da Profa. Emilia Ângela L. Arisawa, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 12 de dezembro de 2004.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

ANEXO B



São José dos Campos, 25 de Agosto de 2004.

DECLARAÇÃO

O Frigorífico Mantiqueira, junto com o SIF 222 (Serviço de Inspeção Federal) local, declara que o material (dentes) usados pela odontóloga Claudia de Oliveira Brasil em sua pesquisa "Terapia fotodinâmica em canais radiculares inoculados com *Candida albicans*" foram retirados de mandíbulas de animais abatidos neste estabelecimento sob fiscalização Sanitária Federal por um médico veterinário credenciado.



Frigorífico Campos de São José Ltda.



Ademir Lourenço da Costa
Médico Veterinário
CRM.V-SP 2149
Fiscal Federal Agropecuária