

UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENGENHARIA
CAMPUS FERNANDÓPOLIS

ROBERTA MIRANDOLA MILE ROSSI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DE DIFERENTES TERAPIAS
ANTIMICROBIANAS EM CANAIS UNIRADICULARES INFECTADOS
COM *Candida albicans***

IN VITRO EVALUATION THE EFFECTS OF DIFFERENT
ANTIMICROBIAL THERAPIES IN ROOT CANAL INFECTED WITH
Candida albicans

São Paulo

2022

ROBERTA MIRANDOLA MILE ROSSI

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DE DIFERENTES TERAPIAS
ANTIMICROBIANAS EM CANAIS UNIRADICULARES INFECTADOS
COM *Candida albicans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador(a): Profa. Dra. Alessandra Baptista

São Paulo – SP
2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

R743a ROSSI, Roberta Mirandola Mile.

Avaliação in vitro dos efeitos de diferentes terapias antimicrobianas em canais uniradiculares infectados com Candida Albican / Roberta Mirandola Mile Rossi. -- Fernandópolis: Universidade Brasil, 2022.

50 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-Graduação do Curso de Bioengenharia da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Alessandra Baptista.

1. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. 2. Óleo Ozonizado. 3. Água Ozonizada. I. Baptista, Alessandra. II. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE APROVAÇÃO

ROBERTA MIRANDOLA MILE ROSSI

**“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DE DIFERENTES TERAPIAS
ANTIMICROBIANAS EM CANAIS UNIRADICULARES INFECTADOS COM *CANDIDA
ALBICANS*”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Baptista (presidente-orientadora)

Prof.(a) Dr.(a) Nilton Cesar Pezati Boer (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof.(a) Dr.(a) Aguinaldo Silva Gárces Segundo (FACULDADE SÃO LEOPOLDO MANDIC)

São Paulo, 08 de fevereiro de 2022
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a). Alessandra Baptista

Houve alteração do Título: sim () não (X):

**FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA
UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA
CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO**



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Termo de Autorização

**Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW
do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES**

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2008, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

**Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DE DIFERENTES TERAPIAS
ANTIMICROBIANAS EM CANAIS UNIRADICULARES INFECTADOS COM *CANDIDA
ALBICANS*"**

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Autor(es):

Discente: **Roberta Mirandola Mile Rossi**

Assinatura: Roberta M. Mile Rossi

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Baptista**

Assinatura: Alessandra Baptista

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 08/02/2022

DEDICATÓRIA

Dedico esse meu trabalho à todas as pessoas que torcem por mim, em especial a minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por toda força espiritual à qual me foi dada.

Ao meu marido e minha filha que sempre me apoiaram e me incentivaram para que eu pudesse finalizar mais um projeto em minha vida.

Ao meu querido pai, que partiu em meio a metade da minha jornada do curso, mas que mesmo em outro plano continua me apoiando, incentivando e ao mesmo tempo feliz de me ver conquistando mais um projeto em minha vida.

Aos meus amigos mais próximos, que de alguma maneira torceram muito e me incentivaram para realização desse projeto.

Ao meu amigo e companheiro de trabalho Prof. Marcelo Boer, por ter permitido participar e concretizar parte de sua pesquisa.

A querida Profa. Dra. Dora Inés Kozusny- Andreani, que me ajudou desde o início do projeto me incentivando no laboratório e sempre disponibilizou seu tempo para finalizarmos o projeto.

As funcionárias Joelma Evelin Pereira Kume e Vanessa Barbosa Gimenez, que sem elas eu não teria conseguido preparar e coletar nenhuma amostra.

A Profa. Selma Aparecida Pereira Bernardo que me ajudou durante a extração dos dentes bovinos no hospital veterinário da Universidade Brasil- Campus Fernandópolis.

A Profa. Danila Fernandes Rodrigues que se disponibilizou a me ajudar a conseguir as mandíbulas bovinas para a extração dos dentes.

A minha orientadora Profa. Dra. Alessandra Baptista que não desistiu de mim e com suas exigências me fez crescer profissionalmente e me desenvolver como pesquisadora.

RESUMO

A contaminação do sistema de canais radiculares é uma das principais intercorrências em um tratamento endodôntico, onde a polpa necrosada não tem vasos sanguíneos que possam transportar células de defesa e antibióticos para o local. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a redução fúngica de canais radiculares tratados com diferentes terapias antimicrobianas. Cinquenta e quatro dentes bovinos foram previamente preparados para a confecção de canais unirradiculares padronizados, por meio da instrumentação prévia com limas *Hedströen* (Denstisplay®) #35, pré-alargados com brocas *Gattes Gliden* #4 (Denstisplay®) e instrumentados, de forma mecanizada com movimentos recíprocos, em toda a sua extensão com limas *Reciproc* R 50–25 mm. Em seguida os canais radiculares foram contaminados com *Candida albicans* e submetidos a diferentes terapias antimicrobianas: irrigação com hipoclorito de sódio 1%, por 5 min (GH); irrigação com clorexidina 0,2%, por 5 min (GCHX); terapia fotodinâmica (aPDT- *antimicrobial Photodynamic Therapy*), mediada por azul de metileno (0,005%) e laser de baixa potência (Laser Duo, MMO, São Carlos, Brasil, $\lambda=660$ nm; P=100 mW; E=18 J ; t=180 s) (GaPDT); irrigação com óleo de girassol ozonizado 2400 ppm, por 5 min (GOO) e irrigação com água ozonizada, por 5 min (GAO). Ainda, um grupo de dentes recebeu irrigação com soro fisiológico como grupo controle (GC). Para avaliar a redução microbiana promovida pelos diferentes tratamentos realizados, amostras microbiológicas foram obtidas antes e imediatamente após as diferentes intervenções, T1 e T2 - respectivamente. As reduções microbianas foram analisadas por testes estatísticos de Kruskal Wallis e teste de Dunn, como *post hoc* ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que os grupos: GH, GCHX, GaPDT e GAO promoveram a erradicação total dos microrganismos, nos parâmetros testados em cada grupo, enquanto que o GOO, apresentou redução microbiana estatisticamente significativa ($p=0,0044$) entre T1 e T2. Portanto podemos concluir que todas as terapias antimicrobianas testadas neste estudo se mostraram eficazes na redução fúngica de canais radiculares, no entanto o uso do óleo de girassol se mostrou menos efetivo, nos parâmetros testados, que as outras terapias avaliadas.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica antimicrobiana. Óleo ozonizado. Água ozonizada.

ABSTRACT

Contamination of the root canal system is one of the main complications in endodontic treatment, where the necrotic pulp does not have blood vessels that can transport defense cells and antibiotics to the site. The aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the fungal reduction of root canals treated with different antimicrobial therapies. Fifty-four bovine teeth were previously prepared for the manufacture of standardized single-root canals, with previous instrumentation with Hedströen files (Denstplay®) #35, pre-enlarged with Gattes Gliden #4 drills (Denstplay®) and instrumentation throughout its length with Reciproc R 50–25 mm files, using mechanized instrumentation with reciprocating movements. Then the root canals were contaminated with *Candida albicans* and submitted to different antimicrobial therapies: irrigation with 1% sodium hypochlorite for 5 min (GH); irrigation with 0.2% chlorhexidine for 5 min (GCHX); photodynamic therapy (aPDT-antimicrobial Photodynamic Therapy), mediated by methylene blue (0.005%) and low power laser (Laser Duo, MMO, São Carlos, Brazil, $\lambda=660$ nm; P=100 mW; E=18 J ; t=180 s) (GaPDT); irrigation with 2400 ppm ozonized sunflower oil for 5 min (GOO) and irrigation with ozonized water for 5 min (GAO). Also, a group of teeth received irrigation with saline solution as a control group (CG). To assess the microbial reduction promoted by the different treatments performed, microbiological samples were obtained before and immediately after the different interventions, T1 and T2 - respectively. Microbial reductions were analyzed by Kruskal Wa llis statistical tests and Dunn's test *aspost hoc* ($p<0.05$). The results showed that the groups: GH, GCHX, GaPDT and GAO promoted the total eradication of microorganisms, in the parameters tested in each group, while the GOO presented a statistically significant microbial reduction ($p=0.0044$) between T1 and T2. Therefore, we can conclude that all antimicrobial therapies tested in this study proved to be effective in reducing fungal root canals, however the use of sunflower oil was less effective, in the parameters tested, than the other therapies evaluated.

Keywords: Antimicrobial photodynamic therapy. Ozonized oil. Ozonized water.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERENCIA DE CONHECIMENTO

O insucesso do tratamento endodôntico ainda é uma realidade na clínica odontológica. A presença de microrganismos remanescentes nos condutos radiculares, mesmo após a intervenção do profissional no ato do tratamento endodôntico pode ser considerada uma das grandes responsáveis por esse insucesso. Este estudo mostrou que o uso de soluções irrigadoras como o hipoclorito de sódio, a clorexidina, a terapia fotodinâmica antimicrobiana, o óleo de girassol ozonizado e a água ozonizada, mostraram-se eficaz na redução fúngica de canais radiculares, no entanto o uso do óleo de girassol se mostrou menos efetivo, nos parâmetros testados, que as outras terapias avaliadas.

Esse trabalho se encaixa:

- Área de Pesquisa: Fotobiomodulação, Biomarcadores e Sistemas Diagnósticos;
- Linha de Pesquisa: Biofotônica Aplicada;
- Projeto de Pesquisa: Processos oxidativos avançados

RELEVÂNCIA NA BIOENGENHARIA:

O uso de substâncias antimicrobianas tem ocasionado o aparecimento de espécies microbianas resistentes. Neste contexto, a busca por terapias alternativas capazes de promover efeito antimicrobiano, com resistência microbiana pouco provável e segura, para os tecidos saudáveis adjacentes, tem sido cada vez mais exploradas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vedamento apical das raízes.....	25
Figura 2: Impermeabilização externa das raízes.....	26
Figura 3: Esterilização das raízes.....	26
Figura 4: Contaminação das raízes.....	27
Figura 5: Selamento dos canais radiculares.....	28
Figura 6: Caixa vedada sob agitação mecânica a 37°C, por 48 h.....	28
Figura 7: Laser com a fibra óptica.....	30
Figura 8: Contaminação dos condutos radiculares com <i>C. albicans</i> , antes de qualquer procedimento. Grupo Controle (GC); Grupo Hipoclorito (GH), Grupo Clorexidina (GCHX); Grupo Terapia Fotodinâmica (GaPDT); Grupo Óleo Ozonizado (GOO); Grupo Água Ozonizada (GAO) (as barras indicam o desvio padrão).....	32
Figura 9: Fração de sobrevivência da <i>C. albicans</i> , após as diferentes intervenções antimicrobianas. Grupo Controle (GC); Grupo Hipoclorito (GH), Grupo Clorexidina (GCHX); Grupo Terapia Fotodinâmica (GaPDT); Grupo Óleo Ozonizado (GOO); Água Ozonizada (GAO) (as barras indicam o desvio padrão).....	33
Figura 10: Redução microbiana entre as avaliações antes e imediatamente após as diferentes intervenções, T1 e T2 - respectivamente. Grupo Controle (GC); Grupo Hipoclorito (GH), Grupo Clorexidina (GCHX); Grupo Terapia Fotodinâmica (GaPDT); Grupo Óleo Ozonizado (GOO); Água Ozonizada (GAO) (as barras indicam o desvio padrão).....	34
Figura 11: Fração de sobrevivência da <i>C. albicans</i> , após as diferentes intervenções antimicrobianas. Grupo Controle (GC); Grupo Hipoclorito (GH), Grupo Clorexidina (GCHX); Grupo Terapia Fotodinâmica (GaPDT); Grupo Óleo Ozonizado (GOO); Água Ozonizada (GAO) (as barras indicam o desvio padrão).....	35

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

#: calibre da lima

‰: Porcentagem

®: Marca registrada

aPDT: do inglês – *Antimicrobial Photodynamic Therapy*

C. albicans: *Candida Albicans*

Ca⁺: íon cálcio

EDTA: Ácido Diaminoetil tetracético

FS: Fotossensibilizador

J: Joules (unidade de energia)

LED: do inglês – *Light Emitting Diode*

mJ: milijoule (unidade de energia)

mL: mililitro

mm: milímetro

mW: miliwatt (unidade de potência)

NaOCl: Hipoclorito de Sódio

nm: nanometro

PIT: do inglês – *Pre Irradiation Time*

UFC: Unidade Formadora de Colônia

W: Watt (unidade de potência)

µL: microlitro

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	14
2- OBJETIVO.....	17
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4- MATERIAL E MÉTODO.....	24
5- RESULTADOS.....	32
6- DISCUSSÃO.....	36
7- CONCLUSÃO.....	40
8- REFERÊNCIAS.....	41
9- ANEXOS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A Endodontia abrange diversos tratamentos que poderão ser escolhidos à partir das diferentes etiologias detectadas nos exames de anamnese, clínico e radiográfico, realizados pelo cirurgião-dentista. Entre essas variáveis a serem consideradas para a escolha do tratamento, a contaminação do sistema de canais radiculares tem importância relevante, uma vez que o tratamento endodôntico tem como objetivo reparar estruturas pulpares, apicais e periapicais alteradas e a descontaminação do sistema pulpar pode ser um desafio. Diferentemente da maioria das estruturas do organismo, o dente com polpa necrosada e infectado não apresenta circulação sanguínea, tornando-se inacessível para células e elementos de defesa, ou seja impedindo o efeito da antibióticoterapia sistêmica e conseqüentemente a resposta do sistema imunológico, (LEONARDO MR, et al 2012).

Conhecendo essa limitação do organismo em se auto defender, a fase do debridamento químico-mecânico completo do tecido pulpar, dos restos de dentina e dos microrganismos é de suma importância e deve ser realizada corretamente para que se obtenha sucesso no tratamento endodôntico, (BASRANI B, et al 2012).

Embora a endodontia nos dias atuais apresente um elevado índice de sucesso, devido ao uso de técnicas de instrumentação mecanizada e diagnósticos radiográficos mais precisos, a persistência de contaminação nos canais radiculares é a principal causa de insucessos, pois impede a reparação apical, (AFKHAMI F, et al 2017). Microrganismos como bactérias anaeróbias estritas, aeróbias e anaeróbias facultativas têm sido encontrados em canais radiculares, muitas vezes associados as infecções persistentes ou recidivantes, (BELTLES C, et al 2017). Destas espécies podemos destacar: os *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de fungos, principalmente do gênero *Candida albicans*, principal fungo encontrado na cavidade bucal (MOHAMMADI Z, et al 2017).

O tratamento na fase do preparo biomecânico, ação dos instrumentos cortantes, normalmente se limita apenas ao canal principal, não atingindo totalmente o sistema de canais radiculares, devido à complexidade da anatomia dos mesmos. Cerca de 50% das paredes dos canais radiculares não são instrumentadas, deste modo, faz-se necessário a utilização de uma substância química auxiliar.

A substância química quando associada à instrumentação mecânica penetra neste complexo sistema, facilitando a ação dos instrumentos endodônticos e

potencializam a desinfecção. Diversas substâncias químicas podem ser utilizadas como agentes irrigantes. Essas soluções devem possuir propriedades tais como, capacidade de dissolver a matéria orgânica, ação antimicrobiana, lubrificação e neutralização de conteúdos tóxicos, que podem contribuir para diminuição do índice de insucessos do tratamento endodôntico (MOHAMMADI Z, et al 2017).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é uma solução irrigadora muito utilizada por possuir eficácia antimicrobiana. Por outro lado, dependendo das concentrações utilizadas, o NaOCl é citotóxico aos tecidos periapicais, além de apresentar gosto e cheiro desagradáveis. Assim, a busca por outros agentes irrigantes, com menor potencial para induzir efeitos colaterais adversos e mais seguros, vem sendo estudadas. O gluconato de clorexidina (CHX) também tem sido utilizado como agente de irrigação endodôntica em substituição ao NaOCl, por apresentar amplo espectro antimicrobiano e possuir ação bactericida, além de ausência de citotoxicidade, em baixas concentrações. No entanto, o uso desta substância pode causar resistência microbiana, (SOUZA MA, et al 2017).

Neste contexto, a busca por terapias alternativas capazes de promover efeito antimicrobiano, com resistência microbiana pouco provável e segura, para os tecidos saudáveis adjacentes, tem sido cada vez mais exploradas.

Dentre estas alternativas antimicrobianas, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês: *antimicrobial photodynamic therapy* – aPDT), tem se mostrado efetiva em infecções localizadas e de microbiota conhecida. A aPDT consiste em um tratamento que engloba o uso de um fotossensibilizador (FS), que deve permanecer em contato com a área tratada por um tempo determinado, seguido de iluminação por luz visível, com comprimento de onda ressonante ao FS, na presença de oxigênio, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio, que levam a morte microbiana por danos oxidativos (GARCEZ AS, et al 2015). Individualmente, a luz e o FS não promovem efeitos antimicrobianos (GARCEZ AS, et al 2015).

Outra alternativa antimicrobiana que tem mostrado resultados efetivos é o uso do ozônio, utilizado na forma individual ou em combinação com outras substâncias, como à água ou o óleo (TIWARI S, et al 2017). O uso do ozônio consiste em uma molécula inorgânica formada por três átomos de oxigênio, caracterizado pelo seu poder oxidativo. Quando exposto a fluidos orgânicos provoca a formação de

moléculas reativas de oxigênio capazes de promover danos oxidativos em células microbianas (UGAZIO E, et al 2017).

A maioria dos estudos, com terapias antimicrobianas alternativas, avaliam a redução bacteriana em canais radiculares, no entanto, a casuística clínica de reinfecção, periodontite periapical e necessidade de retratamento endodôntico ou cirurgia periapical, muitas vezes são provocadas por infecções fúngicas, (GARCEZ AS, et al 2010).

Assim, são necessários mais estudos que avaliem diferentes abordagens antimicrobianas, que sejam capazes de inativar células fúngicas, de forma eficiente, sem o risco de induzir resistências.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar, *in vitro*, a redução fúngica de canais radiculares tratados com diferentes terapias antimicrobianas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do hipoclorito de sódio a 1%, como solução irrigante, na redução microbiana em canais radiculares contaminados com *C. albicans*.
- Avaliar os efeitos da clorexidina 0,2%, como solução irrigante, na redução microbiana em canais radiculares contaminados com *C. albicans*.
- Avaliar os efeitos da aPDT mediada por azul de metileno e *laser* vermelho, na redução microbiana em canais radiculares contaminados com *C. albicans*.
- Avaliar os efeitos do o óleo de girassol ozonizado, na redução microbiana em canais radiculares contaminados com *C. albicans*.
- Avaliar os efeitos da água ozonizada na redução microbiana em canais radiculares contaminados com *C. albicans*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microbiota na Endodontia

A endodontia é a especialidade da Odontologia cuja finalidade é conhecer a função, a fisiologia da polpa além de tratar as afecções da polpa dentária e do tecido periapical (LEON-ROMA et al., 2004).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, que compõem o elemento dentário formando com a dentina o complexo dentino-pulpar. Histologicamente, ela apresenta componentes celulares, como os odontoblastos, os fibroblastos, as células mesênquimais indiferenciadas, os macrófagos e outras células imunocompetentes, bem como, vasos sanguíneos, linfáticos, fibras nervosas e, permeando este conjunto, substância fundamental amorfa. Além dos diferentes componentes celulares, a polpa dentária desempenha diversas funções como sensibilidade dentária, hidratação, defesa e a mais importante delas a formação de dentina (NONAKA et al., 2005).

Em caso de uma necrose pulpar haverá uma proliferação de microrganismos que serão responsáveis pelas infecções pulpares e periapicais. Estima-se que aproximadamente 150 espécies de microrganismos sejam capazes de colonizar os canais radiculares, sendo responsáveis pelas lesões endodônticas, associadas à necrose pulpar. A microbiota encontrada geralmente é mista, dificultando a avaliação do papel desempenhado por cada espécie, assim como, possíveis interações entre elas, fato que contribui para o estabelecimento de um ambiente seletivo no interior dos canais radiculares, com predomínio de microrganismos anaeróbios (BAUMGMARTNER & FALKLER JUNIOR⁸, 1991; SUNDQVIST⁸⁶, 1992; SUNDQVIST⁸⁷⁻⁸, 1992, 1994).

As bactérias mais comuns encontrada em lesões refratárias são o *Enterococcus faecalis* e a *Escherichia coli*, por possuírem alto poder de penetração nos túbulos dentinários, o que contribui para sua sobrevivência durante o preparo biomecânico, demonstrando resistência as soluções irrigadoras, comumente utilizadas durante a terapia endodôntica (MOLANDER et al.⁵⁴, 1998; SUNDQVIST et al.⁸⁹, 1998; SUNDE et al.⁸⁵, 2002),

Grande parte das infecções endodônticas são de natureza bacteriana, porém as leveduras também tem sido encontradas nos canais radiculares de dentes com

necrose pulpar. Dentre as espécies de leveduras comumente isoladas nos canais radiculares, a *Candida albicans* é encontrada principalmente em lesões refratárias.

A eliminação do *E. faecalis*, da *C. albicans* e de outros microrganismos do interior dos canais radiculares se faz necessário, uma vez que esses microrganismos são os agentes causadores das patologias pulpares e periapicais, além da persistência da infecção devido seu poder de penetração nos túbulos dentinários.

Em busca de erradicação desses microrganismos são buscadas novas técnicas, novos materiais irrigadores, novos curativos de canais e até mesmo novos cimentos obturadores de canal radicular, que consigam reduzir essa microbiota resistente e assim melhorar as taxas de sucesso nos tratamentos endodônticos, (Baumgartner JC, et al 2000).

3.2 Ação antimicrobiana e antifúngicas de irrigantes endodônticos

Segundo Di Santi et al. (2015), na perspectiva de se obter um tratamento endodôntico de sucesso, precisamos eliminar totalmente esses microrganismos patogênicos, pois a permanência resultará na falha do tratamento.

Para que não ocorra esse insucesso, estão sendo utilizadas na fase do preparo mecânico, soluções irrigadoras que possuem mecanismos de ação como atividade microbiana, capacidade de dissolver proteínas e tecidos, baixa tensão superficial, que sejam de fácil manuseio, além de não promoverem injúrias aos tecidos periapicais (PAIVA et al, 1973).

O emprego do hipoclorito de sódio como solução irrigadora na terapia endodôntica se tornou de rotina em razão dos seus importantes efeitos antimicrobianos e da dissolução de tecidos necróticos. SIQUEIRA JUNIOR et al. (1997) relataram a efetividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, quando em contato com restos orgânicos, resultando na formação de um ácido forte (ácido hipocloroso - HOCL), com efetiva ação oxidante sobre enzimas bacterianas, devido à presença do cloro ativo, inibindo definitivamente as funções metabólicas microbianas.

Quando utilizado em altas concentrações, o hipoclorito de sódio provoca agressão aos tecidos pulpares adjacentes, assim, outras substâncias químicas auxiliares, mais biocompatíveis e com efetiva ação antimicrobiana, vêm sendo utilizadas como alternativas no tratamento endodôntico, como a clorexidina.

Em 1994, Jeansonne & White compararam o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio 5,25% com a clorexidina 2,0%. Como resultado, obtiveram reduções significativas no número de colônias de microrganismos pós-irrigação, comprovando a eficácia de ambas soluções. Siqueira Junior et al (1998) confirmaram a eficácia dos agentes irrigantes, no qual foi avaliado a ação de irrigantes endodônticos, frente a quatro bactérias anaeróbias Gram-negativas produtoras de pigmentos negros e quatro anaeróbias facultativas. Foram empregadas as soluções de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações: 4%, 2,5% e 0,5%; clorexidina 2% e 0,2%; EDTA 17% e ácido cítrico 10%. Após sete dias, as zonas de inibição de crescimento foram medidas e os resultados demonstraram que as soluções irrigantes testadas inibiram 100% das cepas bacterianas. Diante dos resultados, classificaram a eficácia diante do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, do maior para o menor, classificadas da mais eficiente para a menos eficiente, ordenadas: hipoclorito de sódio 4%, hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina 2%, clorexidina 0,2%, EDTA, ácido cítrico e finalmente hipoclorito de sódio 0,5%.

Em 2001, Gomes et al compararam, *in vitro*, a efetividade de diferentes concentrações e também obtiveram resultados efetivos da ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorexidina na eliminação de *E faecalis*. Foram utilizados hipoclorito de sódio 0,5%, 1,0%, 2,5%, 4,0% e 5,25% e duas formas de clorexidina (gel e líquida), nas concentrações de 0,2%, 1,0% e 2%. Siqueira Junior et al. (2002) avaliaram a eficácia das técnicas e dos agentes irrigantes, como o hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 2%, na redução de *E. faecalis* do interior de canais radiculares. Os autores verificaram que as técnicas foram eficientes e as soluções empregadas reduziram significativamente a quantidade de microrganismos.

Apesar da comprovação da efetividade do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, sabe-se que essa solução irrigadora apresenta citotoxicidade. Assim estudos de toxicidade foram desenvolvidos comparando o hipoclorito de sódio com a clorexidina. Em estudos na determinação do efeito antimicrobiano de medicações sobre *C. albicans*, Sen et al. (1999) investigaram, *in vitro*, a ação antifúngica do hipoclorito de sódio e da clorexidina, no interior de canais radiculares de 266 dentes humanos unirradiculados, contaminados com *C. albicans*, por 10 dias. Foi verificado crescimento microbiano após ação das soluções de hipoclorito de sódio 1%, hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 0,12% em 1, 5 e 30 min. Os resultados demonstraram ainda que na presença de *smear layer*, o hipoclorito de sódio e suas

concentrações e a clorexidina 0,12% não apresentaram eficiência nos três tempos testados, mas após 1 h de tratamento, os irrigantes apresentaram ação antifúngica. Na ausência de *smear layer*, somente o hipoclorito de sódio 5% foi efetivo em 1, 5 e 30 min. O hipoclorito de sódio 1%, e a clorexidina 0,12% não foram efetivos nos três tempos testados.

3.3 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (do inglês: *antimicrobial Photodynamic Therapy* - aPDT) é um efetivo recurso terapêutico com ação antimicrobiana. O método envolve a utilização de um fotossensibilizador (FS), como o azul de metileno, que é um composto químico, que absorve luz na região do vermelho do espectro eletromagnético e na presença de oxigênio é capaz de promover a formação de espécies reativas de oxigênio que levam a danos celulares (Konopka K, et al 2007).

A aPDT tem sido apontada como uma técnica coadjuvante no tratamento endodôntico, pois apresenta potencial de aumentar a eficiência na descontaminação dos canais radiculares, quando utilizada com a instrumentação convencional (Marinic K, et al 2015).

Souza et al 2010, realizaram um estudo em que foi avaliada a associação durante o preparo biomecânico, utilizando o hipoclorito de sódio e a aPDT. Os resultados deste estudo mostraram que a associação entre essas duas técnicas se mostrou mais eficaz, que a sua utilização isolada do hipoclorito de sódio ou da aPDT. Uma substância para ser considerada um bom FS deverá apresentar características de não toxicidade, sem efeitos danosos ao hospedeiro, fácil acessibilidade, baixo custo, solubilidade e alto rendimento quântico, isto é, alta produção de espécies reativas de oxigênio. Para que ocorram danos oxidativos no microrganismo é importante que o FS interaja com a parede celular ou penetre no microrganismo, uma vez que absorvendo a radiação eletromagnética da luz ressonante irá desencadear o processo oxidativo (GARCEZ A, et al 2015).

3.4 Ozônio

As pesquisas com ozônio estão crescendo nos últimos tempos devido suas propriedades antimicrobianas.

O ozônio atua causando a oxidação das paredes celulares e membranas citoplasmáticas das bactérias, agindo também sobre fungos, protozoários e vírus. Pode afetar o equilíbrio osmótico promovendo a lise celular (GARDUÑO et al., 1995; OIZUMI et al., 1998; VELANO et al., 2001). Estas propriedades antimicrobianas são utilizadas no tratamento de várias enfermidades, sendo bastante efetivas na eliminação de bactérias, fungos e vírus em lesões infectadas (RODRIGUEZ et al., 1994). Estudos microbiológicos da ação antimicrobiana da água ozonizada e sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, associadas com alimentos, começaram a fornecer dados para aplicação na indústria de alimentos, sendo que, Restaino et al. (1995) afirmaram que a utilização do ozônio resultou em redução microbiana, podendo ser aplicada no controle microbiano de alimentos. A água ozonizada também foi eficaz contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, seguindo esta ordem de efetividade. O efeito antimicrobiano do ozônio na odontologia, ainda é pouco difundido, mas tem atraído alguns pesquisadores interessados em estudos neste campo. Este gás, tem-se mostrado eficaz contra muitas das espécies microbianas encontradas na cavidade bucal (BARROS, et al 2000) e como método de desinfecção de próteses (OIZUMI et al. 1998).

Nagayoshi et al. (2004), avaliaram o efeito antimicrobiano da água ozonizada como agente irrigante, durante o preparo biomecânico da terapia endodôntica, sobre *E. faecalis* e *S. mutans* inoculados no interior dos canais radiculares de dentes bovinos. Os resultados mostraram que houve uma diminuição significativa destes microrganismos, sugerindo que a água ozonizada pode ser empregada como agente irrigante durante a terapia endodôntica.

Faria et al. (2005) avaliaram os efeitos oxidativos da água ozonizada (3,3 mg/ml O₃) frente a 49 cepas de *Candida*, recém isoladas da saliva e os resultados demonstraram redução de *C. albicans* nas suspensões.

Rodriguez et al. (1994) avaliaram a utilização do óleo de girassol ozonizado no tratamento da gengivo-estomatite herpética aguda em crianças. O óleo de girassol ozonizado foi empregado embebido em gaze utilizada na assepsia das lesões, quatro

vezes ao dia. O período de reparação foi bastante reduzido; em 3 dias de tratamento se obteve 76,9% de cura.

Várias soluções têm sido utilizadas como irrigantes endodônticos, entretanto, necessitamos saber quais dessas soluções é mais eficaz, de forma a contribuir ainda mais para sucesso da terapia endodôntica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As avaliações microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, campus, Fernandópolis, SP.

Para realização deste estudo foram utilizados dentes bovinos unirradiculares extraídos de animais abatidos para comercialização da carne, conforme laudo veterinário (ANEXO 1). Este estudo passou pela Comissão de Ética de uso Animal (CEUA), cujo número de protocolo é 2000086 (ANEXO 2). A execução experimental do preparo dos espécimes, preparos químicos-mecânicos dos canais radiculares, vedamento apical e impermeabilização externa das raízes foram realizadas por um operador treinado, calibrado e especialista em endodontia.

4.1 Preparo dos espécimes

Cinquenta e quatro (54) dentes bovinos unirradiculares recém extraídos, limpos com auxílio de curetas *Gracey* (S.S. White Artigos Dentários Ltda., Juiz de Fora, MG, Brasil), para remoção de tecidos moles, fibras periodontais, cálculos e remanescentes ósseos aderidos foram utilizados neste estudo.

Após a limpeza, os dentes foram mantidos em solução fisiológica estéril em frasco vedado em freezer (-20° C) por 30 dias. No momento da realização do experimento os dentes foram selecionados e lavados com água destilada, imersos por 48 h em hipoclorito de sódio a 1% e posteriormente seccionados, próximo à junção cimento-esmalte com disco de *carborundum* (KG Sorensen, Alemanha), acoplado a um mandril em micromotor, descartando-se as coroas e padronizando o comprimento dos remanescentes radiculares em aproximadamente 25 mm.

4.2 Preparo químico-mecânico dos canais

Todas as amostras foram submetidas à instrumentação prévia para padronização do diâmetro dos canais radiculares. O tecido pulpar foi removido com limas *Hedströen* (Denstsplay®) #35. Os canais radiculares foram pré-alargados com brocas *gattes gliden* #4 (Denstsplay®) e instrumentados em toda a sua extensão com limas *Reciproc R* 50–25 mm, utilizando-se a instrumentação mecanizada com

movimentos recíprocos. Os canais foram irrigados durante toda instrumentação com solução fisiológica.

4.3 Vedamento apical e impermeabilização externa das raízes

Os canais radiculares foram secos com cones de papel absorvente estéreis nº 20, no comprimento do remanescente radicular, por 1 min e foi realizado o vedamento da região apical das raízes utilizando resina composta fotopolimerizável (Z100 cor, 3M ESPE, St Paul, EUA). As raízes foram ainda impermeabilizadas, em toda sua extensão, com duas camadas de esmalte para unhas na cor preta marca Impala, SP, Brasil) (Figura 1 e Figura 2).

Figura 1 – Vedamento apical.



Fonte: Próprio autor.

Figura 2 – Impermeabilização externa das raízes.



Fonte: Próprio autor.

4.4 Esterilização das raízes

As amostras de raízes foram distribuídas em grupos em 3 caixas plásticas com divisórias para esterilização em autoclave, colocando cada raiz em um compartimento. A caixa foi embalada para esterilização em autoclave a 121°C por 50 min (Figura 3).

Figura 3 - Esterilização das raízes



Fonte: Próprio autor.

4.5 Contaminação dos espécimes

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no interior de uma câmara de fluxo laminar, a qual foi previamente submetida à desinfecção com álcool 70% e incidência de luz ultravioleta por 30 min. Todos os materiais e instrumentos utilizados foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 50 min .

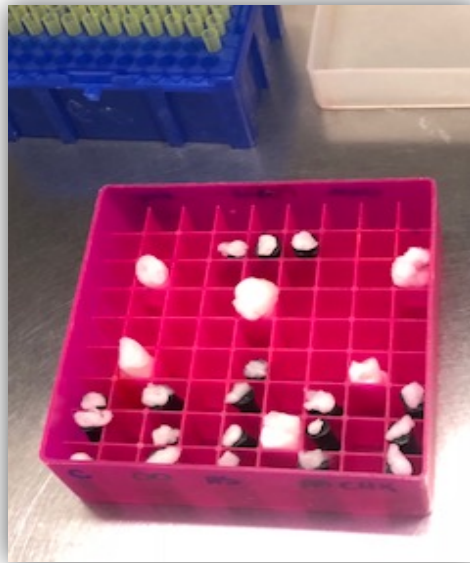
As amostras foram contaminadas com *Candida albicans* (ATCC 10231), previamente semeada em caldo *Sabouraud dextrose* (Difco, Detroit, EUA) por 48 h. Após esse período, com auxílio de uma pipeta, 20 µl de microrganismos foram inoculados em cada raiz (Figura 4). Os canais foram selados com tampão de algodão estéril, embebidos em solução salina estéril, a fim de manter a umidade. A caixa foi então vedada e mantida em estufa bacteriológica a 37° C, sob agitação mecânica, por 48 h (Figura 5 e Figura 6).

Figura 4 - Contaminação das raízes



Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Selamento dos canais radiculares



Fonte: Próprio autor.

Figura 6 - Caixa vedada sob agitação mecânica a 37°C, por 48 h



Fonte: Próprio autor.

4.6 Divisão dos grupos

Para as avaliações *in vitro*, da eficácia antimicrobiana de diferentes soluções irrigantes utilizadas no tratamento endodôntico e a comparação com diferentes terapias que levam a morte microbiana por dano oxidativo, as amostras foram divididas em 6 grupos experimentais, conforme Tabela 1. As avaliações foram feitas em duplicatas em 3 dias diferentes. Os grupos experimentais avaliaram 2 amostras de dente por dia de experimento, enquanto o grupo controle avaliou uma amostra de dente por dia.

Tabela 1: Grupos amostrais e intervenções realizadas.

Grupos	Intervenção
Grupo Controle (GC) (6 raízes)	irrigação com soro fisiológico (5 mL), por 5 min;
Grupo Hipoclorito de sódio (GH) (n=6)	irrigação com hipoclorito de sódio 1,0% (5 mL) por 5 min;
Grupo Clorexidina (GCHX) (n=6)	irrigação com digluconato de clorexidina 0,2% (5 mL) por 5 min;
Grupo Terapia fotodinâmica (GaPDT) (n=6)	Azul de metileno (3 min) + luz vermelha;
Grupo Óleo ozonizado (GOO) (n=6)	óleo ozonizado 2400 ppm (5 mL) por 5 min;
Grupo Água ozonizada (GAO) (n=6)	água ozonizada 75 µg/mL (5 mL) por 5 min.

Fonte: Próprio autor.

Previamente as diferentes intervenções com finalidades microbiológicas, todas as amostras foram instrumentadas, de forma mecanizada, com limas reciprocantes R50 #50.06 (VDW®), irrigadas com a solução irrigadora escolhida (5 mL), aspiradas, irrigadas com EDTA 17% (5 mL) e novamente aspiradas, a fim de mimetizar os procedimentos endodônticos preconizados na prática clínica.

A aPDT foi mediada com o uso do azul de metileno (Sigma, Aldrich), como FS, na concentração de 0,005% e laser de baixa potência (Laser Duo, MMO, São Carlos, Brasil, $\lambda = 660$ nm).

O FS foi deixado em contato com os canais contaminados por 3 min, antes das irradiações (PIT: do inglês – *Pre Irradiation Time*). Após o PIT, as amostras foram então irradiadas com um laser de baixa potência (Laser Duo, MMO, São Carlos, Brasil, $\lambda = 660$ nm;

P =100 mW; E =18 J; t =180 s), com auxílio de uma fibra óptica para uso intracanal (Figura 7). Cada amostra foi irradiada com uma fibra óptica diferente, previamente esterilizada.

Figura 7 - Laser com a fibra óptica



Fonte: Próprio autor.

4.7 Avaliação Microbiológica

Para avaliar a redução microbiana promovida nos diferentes tratamentos realizados, amostras microbiológicas foram obtidas antes de qualquer intervenção (T1) e depois dos procedimentos (T2).

Amostras T1:

Para obtenção das amostras T1 foram selecionados 6 dentes, um de cada grupo, em 3 dias diferentes (18 dentes).

Após as 48 h de incubação dos microrganismos em estufa bacteriológica, foi colocado 30 μ L de solução salina estéril e mantida por 10 min, em cada amostra. Amostras microbiológicas foram então obtidas com auxílio de um cone de papel estéril e colocadas em *ependorfs* contendo 1 mL de solução salina estéril e submetidas a agitação mecânica (Vortex) de 200 rpm por 30 s. Para facilitar a contagem final de microrganismos, em uma placa de microtitulação foram realizadas diluições seriadas na ordem de 1/10, com a finalidade de diminuir a concentração de UFC/mL (UFC - Unidades Formadoras de Colônias). Em seguida, 10 μ L de cada diluição foram

estriados em placas de *Petri*, contendo como meio de cultura *Sabouraud dextrose* (Difco, Detroit, EUA), colocadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 h para a contagem final dos microrganismos. As placas foram feitas em duplicata para cada amostra. As UFC encontradas nas placas de *Petri* foram multiplicadas pelo fator de diluição.

Amostras T2:

Para obtenção das amostras T2 foram selecionados 12 dentes, dois de cada grupo, em 3 dias diferentes (36 dentes).

Foram obtidas amostras microbiológicas imediatamente após os diferentes procedimentos (T2), para controle microbiológico, com auxílio de um cone de papel estéril, friccionando o mesmo nas paredes do conduto radicular. Na sequência, os cones foram colocados em *eppendorfs* contendo 1 mL de solução salina estéril e submetidos a agitação mecânica (Vortex) de 200 rpm por 30 s. Para facilitar a contagem final de microrganismos, em uma placa de microtitulação, foram realizadas diluições seriadas na ordem de 1/10, com a finalidade de diminuir a concentração de UFC/mL. Dez- μ L de cada diluição foram estriados em placas de *Petri*, contendo como meio de cultura *Sabouraud dextrose* (Difco, Detroit, EUA), colocadas em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 h para a contagem final dos microrganismos. As placas foram feitas em duplicata para cada amostra. As placas foram feitas em duplicata para cada amostra. As UFC encontradas nas placas de *Petri* foram multiplicadas pelo fator de diluição.

4.7 Análise dos dados

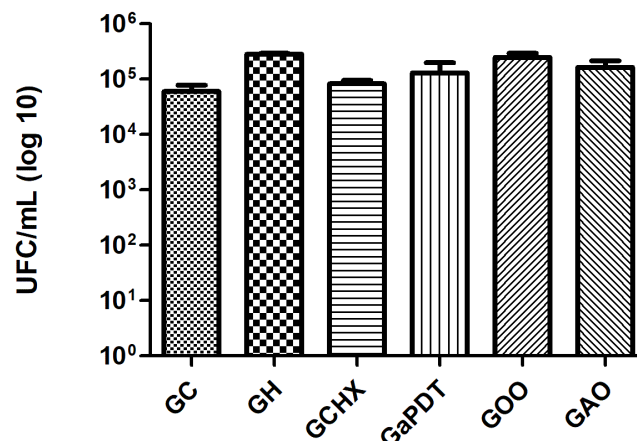
Para avaliação dos resultados microbiológicos foram calculadas as frações de sobrevivência dos diferentes grupos e foi realizado o teste de normalidade por Shapiro-Wilk, que atestou distribuição não-normal das amostras. Por conta disso, foi realizado o teste estatístico não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e o teste de *Dunn* como *post hoc*. As amostras foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O presente estudo avaliou, *in vitro*, os efeitos de diferentes terapias antimicrobianas em canais radiculares contaminados com *C. albicans*, comparando soluções irrigadoras de amplo uso clínico, aPDT e o uso de óleo e água ozonizada.

A Figura 8 mostra que todos os grupos avaliados estavam contaminados com *C. albicans*, nas concentrações entre 10^5 e 10^6 após 48 h de incubação e imediatamente antes de qualquer intervenção antimicrobiana.

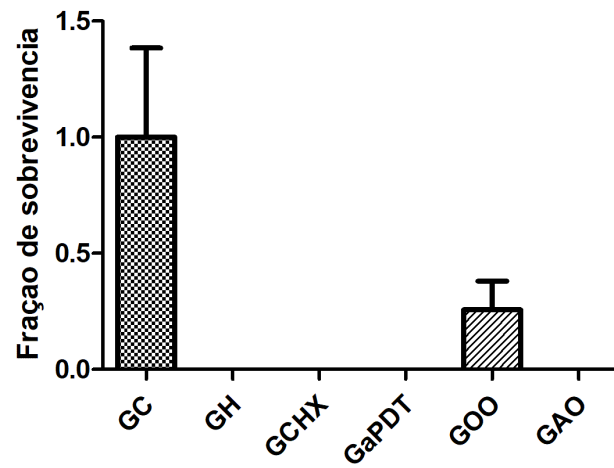
Figura 8 – Contaminação dos condutos radiculares com *C. albicans*, antes de qualquer procedimento. Grupo Controle (GC); Grupo Hipoclorito (GH), Grupo Clorexidina (GCHX); Grupo Terapia Fotodinâmica (GaPDT); Grupo Óleo Ozonizado (GOO); Grupo Água Ozonizada (GAO) (as barras indicam o desvio padrão).



Fonte: Próprio Autor

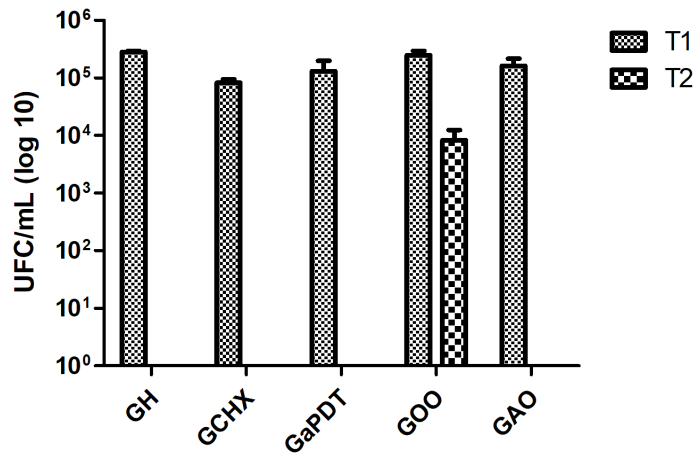
A Figura 9 mostra a fração de sobrevivência dos grupos: hipoclorito (GH), clorexidina (GCHX), aPDT (GaPDT), óleo ozonizado (GOO) e água ozonizada (GAO) em relação ao grupo controle (GC). Nota-se que os grupos: GH, GCHX, GaPDT e GAO promoveram a erradicação total dos microrganismos, nos parâmetros testados em cada grupo, enquanto que o GOO, apresentou redução microbiana entre T1 e T2 de aproximadamente 1,5 log (Figura 10).

Figura 9 – Fração de sobrevivência da *C. albicans*, após as diferentes intervenções antimicrobianas. Grupo Controle (GC); Grupo Hipoclorito (GH), Grupo Clorexidina (GCHX); Grupo Terapia Fotodinâmica (GaPDT); Grupo Óleo Ozonizado (GOO); Água Ozonizada (GAO) (as barras indicam o desvio padrão).



Fonte: Próprio Autor

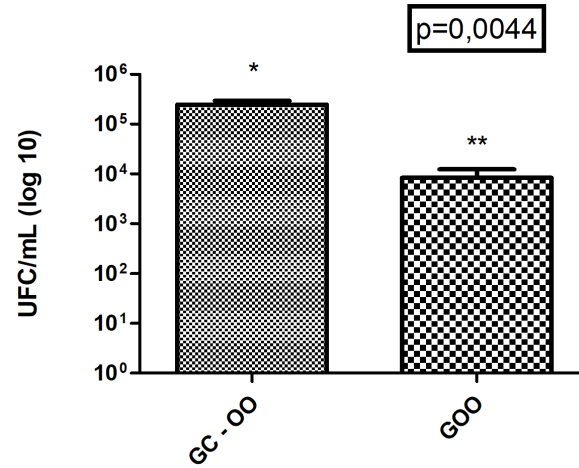
Figura 10 – Redução microbiana entre as avaliações antes e imediatamente após as diferentes intervenções, T1 e T2 - respectivamente. Grupo Controle (GC); Grupo Hipoclorito (GH), Grupo Clorexidina (GCHX); Grupo Terapia Fotodinâmica (GaPDT); Grupo Óleo Ozonizado (GOO); Água Ozonizada (GAO) (as barras indicam o desvio padrão).



Fonte: Próprio Autor

A Figura 11 mostra que a redução microbiana promovida pela ação do óleo ozonizado, nos parâmetros testados, proporcionou redução significativa de *C. albicans* ($p=0,0044$).

Figura 11 - Redução microbiana entre as avaliações antes e imediatamente após o uso do óleo ozonizado. Grupo Controle antes do uso Óleo Ozonizado (GC-OO); Grupo imediatamente após o uso do Óleo Ozonizado (GOO) (as barras indicam o desvio padrão).



Fonte: Próprio Autor

6 DISCUSSÃO

A importância da limpeza mecânica e química do sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico tem sido amplamente enfatizada durante as últimas décadas (LIOLIOS et al., 1997, ESTRELA et al., 2003), uma vez que são encontrados inúmeros microrganismos e seus produtos nas doenças pulpares e periapicais.

Cerca de 509 espécies de bactérias podem ser encontradas na cavidade oral, portanto, a escolha da técnica de instrumentação e soluções irrigadoras que permitam a neutralização microbiana e inativação das toxinas, sem interferir negativamente com o processo de cura, é fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico (LEONARDO et al., 1999). As bactérias facultativas, como o *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e fungos como *Candida albicans* são considerados por muitos, as espécies mais resistentes na cavidade oral (GOMES et al., 2003, VIANNA et al., 2004).

GARCEZ et al, (2007) ressaltou que a incorporação da terapia fotodinâmica antimicrobiana, como coadjuvante no tratamento endodôntico pode ser uma boa alternativa na descontaminação do sistema de canais radiculares, uma vez que a resistência microbiana aos agentes antimicrobianos, desperta o interesse da comunidade científica, que incorpora cada vez mais em seus objetivos, a busca por mecanismos que transponham esse problema. É possível observar no tratamento endodôntico atual, que diferentemente daquela da década de 80, oferece muito em tecnologia para viabilizar um tratamento eficiente na eliminação de microrganismos, na otimização do tempo de tratamento, com a finalidade de diminuir consideravelmente as intervenções, de forma segura aos padrões de qualidade em Endodontia. Dentre as inovações, a utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em Endodontia têm se destacado (ALMEIDA, 2007).

O presente estudo mostrou em seus resultados o quanto é eficaz a utilização de terapias antimicrobianas na descontaminação dos canais radiculares contaminados com *Candida albicans*, associada ao preparo químico mecânico e a instrumentação endodôntica. O uso do hipoclorito de sódio à 1%, da clorexidina 0,2%, como soluções irrigadoras, assim como, a utilização da aPDT, mediada por azul de metileno e luz vermelha, nos parâmetros testados neste estudo e a irrigação com água ozonizada 75ug/mL, promoveram a erradicação fúngica dos canais radiculares. A

irrigação com o óleo de girassol ozonizado 2400ppm, apesar de não ter promovido a erradicação fúngica, promoveu diminuição de 1,5 logs de *C. albicans*.

Os estudos de D'Arcangelo et al, (1999) mostrou a efetividade do efeito fungicida do hipoclorito de sódio sobre a *C. albicans* e o presente estudo corrobora com tais evidências científicas. Segundo ESTRELA et al., (2003), a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio o torna a solução irrigadora de escolha pelos cirurgiões-dentistas, principalmente em casos de dentes com polpa necrosada.

FERRAZ et al., (2007) realizaram um estudo e afirmaram que tanto a clorexidina gel à 2%, quanto a líquida a 2% foram mais eficazes comparadas com todas as concentrações de hipoclorito de sódio testadas, incluindo o 5,25%, quando ambas expostas à 5 espécies de bactérias anaeróbias facultativas e 4 espécies de anaeróbios estritos. A clorexidina foi testada em vários estudos sobre terapia endodôntica e demonstrou apresentar uma grande eficiência no tocante à eliminação de fungos como a *C. albicans* (LIN S et al, 2016), sendo que nesse estudo os resultados se assemelham, no entanto, usando concentrações menores de clorexidina.

O sucesso da aPDT está relacionado principalmente pelo efeito antimicrobiano comprovadamente constatado em diferentes microrganismos, além de apresentar pouca probabilidade em promover resistência microbiana, ser uma técnica de fácil aplicação, indolor, além de somar a todas essas características, os efeitos benéficos oriundos da terapia com laser de baixa potência, como biomodulação, analgesia, importantes condições para o sucesso de todas as fases do tratamento endodôntico (ALTUNDASAR E et al, 2006).

Muitas das dificuldades no estabelecimento de um protocolo efetivo da aPDT para utilização intracanal consiste na diferença de susceptibilidade dos microrganismos aos protocolos empregados. A literatura reporta a efetividade da aPDT frente a diferentes microrganismos, tais como: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis* (BRASIL CO, et al, 2006), no entanto, não há consenso na literatura dos parâmetros que promovem a efetividade da aPDT para os diferentes microrganismos.

Os índices de descontaminação alcançados com a aPDT atingem entre 97-100% e são equivalentes àqueles conseguidos com os lasers de alta potência. O efeito antimicrobiano da aPDT em patógenos endodônticos (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F.*

nucleatum, *P. micros*, *P. endodontalis*) foi observado tanto *in vitro* (BELBER VB, 2005), quanto *in vivo* (ALTUNDASAR E, 2006).

O uso do azul de metileno (do inglês *Metyllene Blue* - MB) na prática médica tem sido realizado por mais de 100 anos, apresentando baixa toxicidade tecidual. Apresenta forte absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético, na qual a penetração da luz nos tecidos é considerada ótima. Na Endodontia, o período de pré-irradiação pode variar entre dois e cinco minutos — tempo para o FS atingir e ultrapassar a membrana celular microbiana

Outra terapia que tem mostrado efetividade antimicrobiana é o uso do ozônio, que pode se apresentar diluído em água ou em óleo, ou ainda na forma de gás (HOLMES, 2004).

Cardoso, et al., (2008) relataram em seu estudo que a água ozonizada, é efetiva contra *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* e não promove efeitos residuais. Reportam ainda a efetividade do uso da água ozonizada, como agente irrigante na eliminação de bactérias e na neutralização de endotoxinas, durante a sanificação de canais radiculares.

Cruz HFO (2006) afirmou a eficácia da ação antimicrobiana do óleo ozonizado, quando misturado com veículos viscosos, permitindo maior difusão e sendo mais fácil a sua remoção do interior do canal.

Silva NLS et al (2019) alegam que na reparação óssea periapical é eficaz a utilização da água ozonizada como agente irrigante juntamente com a utilização do óleo ozonizado como medicação intracanal.

Na questão da administração do ozônio, Martins IVR (2018), afirma que se administrado em concentrações adequadas, com tempo de exposição ideal e se aplicado de forma correta a terapia é eficaz, porém não existe protocolos sobre a concentração ideal de utilização do ozônio.

SILVA, (2019) também concordou que, há poucas informações sobre a quantidade de doses, concentração e seu uso ainda não é bem definido, sendo necessário mais estudos para definir a quantidade de doses, tempo de aplicação para que a Ozonioterapia venha a ser cada dia mais efetiva nos tratamentos odontológicos.

Durmus N et al.,(2019), avaliaram a eficácia da aplicação do ozônio na terapia pulpar indireta em duas sessões em 105 pacientes utilizando HealOzone na concentração de 2100 ppm, a uma taxa de fluxo de 615 ml/min por 60 s. Esse protocolo foi utilizado como agente desinfetante do canal radicular em duas sessões.

Embora as aplicações de desinfetantes de cavidades tenham melhorado a eficácia antibacteriana (controle: 79,11%; clorexidina: 98,39%; ozônio: 93,33%), a aplicação da clorexidina exibiu uma redução significativa maior do que ambos os grupos.

Apesar de nossos resultados serem promissores em relação ao uso da aPDT e da ozonioterapia na descontaminação fúngica de canais radiculares, mais trabalhos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados, a fim de estabelecer protocolos clínicos eficazes e seguros.

7 CONCLUSÃO

Portanto podemos concluir que todas as terapias antimicrobianas testadas neste estudo se mostraram eficaz na redução fúngica de canais radiculares, no entanto o uso do óleo de girassol se mostrou menos efetivo, nos parâmetros testados, que as outras terapias avaliadas.

REFERÊNCIAS

1. AFKHAMI F, AKBARI S, CHINIFORUSH N. Entrococcus faecalis elimination in root canals using silver nanoparticles, photodynamic therapy, diode laser, or laseractivated nanoparticles: an in vitro study. J Endod. 2017Feb;43(2):279-82.
2. ALMEIDA-LOPES L. Dosimetria. DMC J. 2007;1(1):16-7.
3. ARITA, M.; NAGAYOSHI, M.; FUKUIZUMI, T.; OKINAGA, T.; MASUMI, S.; MORIKAMA, et al. Microbicidal efficacy of ozonated water against Candida albicans adhering to acrylic denture plates. Oral Microbiol Immunol, v. 20, p. 10-206, 2005.
4. ALTUNDASAR E, ÖZÇELİK B, CEHRELI ZC, MATSUMOTO K. Ultramorphological and histochemical changes after ER,CR:YSGG laser irradiation and two different irrigation regimes. J Endod. 2006;32(5):465-8.
5. BARROS, L.M.; FIORINI, J.E. Efeito da clorexidina e da água ozonizada sobre os S. viridans da placa supragengival. Rev Assoc Paul Cir Dent, v.54, n.1, p.47-52, jan/fev. 2000.
6. BASRANI B, HAAPASALO M. Update on endodontic irrigating solutions. End Topics. 2012Sep;27(1):74-102.
7. BAUMGARTNER JC, WATTS CM, XIA T. (2000). Occurrence of Candida albicans in infections of endodontic origin. Journal of endodontics, 26(12), 695-698.
8. BELTES C, ECONOMIDES N, SAKKAS H, PAPADOPOULOU C, LAMBRIANIDIS T. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and near-infrared diode laser against enterococcus faecalis in infected human root canals. Photomed Laser Surg. 2017May;35(5):264-9.

9. BRASIL CO, CASTRO MR, KHOURI S, ARISAWA EAL. Avaliação, in vitro, da terapia fotodinâmica em cultura de *Candida albicans*. Anais do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos; 2006.
10. CARDOSO, M. G.; OLIVEIRA, L. D.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 105(3), p. 85- 91, 2008.
11. COSTA, A.C.B.P.; RASTEIRO, V.M.C.; HASHIMOTO, E.S.H.S.; ARAÚJO, C.F.; PEREIRA, C.A.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Effect of erythrosine and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of 55 immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Medicine*, v.114, n.1, p.67-74, 2012.
12. Cruz, H. F. O. Avaliação “in vitro” da associação do efeito antimicrobiano do ozônio a veículos e curativos de demora em diferentes períodos de tempo de armazenagem. Dissertação. Universidade estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brasil (2006).
13. 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.
14. DURMUS N, TOK YT, KAYA S, AKCAY M. Effectiveness of the ozone application in two-visit indirect pulp therapy of permanent molars with deep carious lesion: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2019;23(10):3789–99.

15. DUNAVANT TR, REGAN JD GLICKMAN GN, SOLOMON ES, HONEYMAN AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod.* 2006;32(6):527-31.
16. ESTRELA C, RIBEIRO RG, ESTRELA CR, PÉCORA JD, SOUSA-NETO MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 14(1):58-62, 2003.
17. FARIA, I. S. et al. Effects of ozonated water on *Candida albicans* oral isolates. *Braz J Oral Sci*, v.4, n.14, p.783-86, July/Sept. 2005.
18. FERRAZ CC, GOMES BP, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 18(4):294-298, 2007.
19. GARCEZ AS, NÚÑEZ SC, LAGE-MARQUES JL, JORGE AOC, DDS, RIBEIRO MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:93-8.
20. GARCEZ AS, RIBEIRO MS, TEGOS GP, NÚÑEZ SC, JORGE AOC, HAMBLIN MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007;39:59-66
21. GARCEZ A, ARANTES-NETO JG, SELLERA DP, FREGNANI ER. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2015.
22. GARCEZ AS, ARANTES-NETO JG, SELLERA DP, FREGNANI ER. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the

- bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015 Dec;12(4):575-80.
23. GARCEZ AS, NUÑEZ SC, HAMBLIM MR, SUZUKI H, RIBEIRO MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. J Endod. 2010 Sep;36(9):1463-6.
24. GARCEZ AS, NUÑEZ SC, HAMBLIN MR, RIBEIRO MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. J Endod. 2008 Feb;34(2):138-42.
25. GARDUÑO, P.G. et al. Efectos del agua ozonificada en la placa dentobacteriana. Assoc Dent Med, v.52, n.6, p.305-8, nov./dic. 1995.
26. GOMES, B.P.F.A. et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. Int Endod J, v.34, n.6, p.424-8, 2001.
27. GOMES BPFA, SOUZA SFC et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003;36:267-75.
28. GUERRA, O. C.; CEPERO, S. M.; JÓRDAN, M. E. M.; VÁSQUEZ, T. C. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. Revista Cubana de Estomatología, v. 1, n. 34, p. 4-21, 1997.
29. HOLMES, J.; LYNCH, E. Reversal of occlusal caries using air abrasion, ozone and sealing. IADR Abs, 2004.

30. JEANSONNE, M.J.; WHITE, R.R. A comparison of 2,0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod*, v.20, n.6, p.276-8, June 1994.
31. KONOPKA K, GOSLINSKI T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007.
32. LEONARDO MR, LEONARDO RT. Tratamento de canais radiculares: avanços tecnológicos de uma endodontia minimamente invasiva e restauradora. São Paulo: Artes Médicas; 2012.
33. LIN S.; ZUCKERMAN O.; WEISS E.I.; MAZOR Y.; FUSS Z. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. *J Endod*.v.29, n.6, p.416-418, 2016
34. LIOLIOS E, ECONOMIDES N, PARISSIS-MESSIMERIS S, BOUTSIUKIS A. The effectiveness of three irrigating solutions on root canal cleaning after hand and mechanical preparation. *Int Endod J*. 30(1):51-57, 1997. 20.
35. LUI JN, SAE-LIM V, SONG KP, CHEN NN. In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 37(2):105-113, 2004.
36. MARINIC K, MANOIL D, FILIERI A, WATABA JC. SCHRENZEL, J.; LANGE, N.; BOUILLAGUET, S. Repeated exposures to blue light--activated eosin Y enhance inactivation of *E. faecalis* biofilms, in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2015.
36. MARTINS, I. V. R. Aplicação do ozônio na terapêutica do sistema de canais radiculares: revisão de literatura. TCC. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Brasília, DF, Brasil, 2018.
37. MENEZES MM, VALERA MC, JORGE AO, KOGA-ITO CY, CAMARGO CH, MANCINI MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and

- intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 37(5):311-319, 2004.
38. MOHAMMADI Z, JAFARZADEH H, SHALAVI S, PALAZZI F. Recent advances in root canal disinfection: a review. *Iran Endod J.* 2017 Fall;12(4):402-6.
39. MUNIN E, GIROLDO LM, ALVES LP, COSTA MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B.* 2007;88:16-20.
40. NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*, v.30, n.11, p.778-81, Nov. 2004.
41. NÉRI, J. S. V., LOMBA, E., KARAM, A. M., REIS, S. R. A., MARCHIONNI, A. M. T., MEDRADO, A. R. A. P. (2017). Ozone therapy influence in the tissue repair process: A literature review. *Journal of Oral Diagnosis*, 2 (1), 1-6.
42. NG R, SINGH F, PAPAMANOU DA, SONG X, PATEL C, HOLEWA C, Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod.* 2011;37(2):217-22.
43. OIZUMI, M. et al. In vitro testing of a denture cleaning method using ozone. *J Med Dent Sci*, v.45, n.2, p.135-9, Apr. 1998.
44. ONÇAD O, HOĞÖR M, HILMIOĞLU S, ZEKIOĞLU O, ERONAT C, BURHANOĞLU D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 36(6):423-432, 2003
45. PAIVA, J. G.; ANTONIAZZI, J. H. *Endodontia bases para a prática clínica.* São Paulo: Artes Médicas, 1984.
46. RADCLIFFE CE, POTOUIDOU L, QURESHI R, HABAHBEH N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*,

- A. naeslundii, Candida albicans and Enterococcus faecalis. *Int Endod J.* 2004;37:438–46
47. RESTAINO, L. et al. Efficacy of ozonated water against various food- Related microorganisms. *Appl Environm Microbiol*, v.61, n.9, p.3471-5, Sept. 1995.
48. RINGEL AM, PATTERSON SS, NEWTON CW, MILLER CH, MULHERN JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod.* 8(5):200-204, 1982.
49. SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPANBERG, L.S.W. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod*, v.25, n.4, p.235-8, Apr. 1999.
50. SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*, v.24, n.6, p.414-6, June 1998.
51. SMITH, N. L., WILSON, A. L., GANDHI, J., VATSIA, S., & KHAN, S. A. (2017). Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Medical Gas Research*, 7 (3), 212.
52. SILVA, L.C. (2019). *Uso da ozonioterapia na odontologia: revisão de literatura integrativa.* Monografia. Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira, BA, Brasil.
53. SOUZA LC, BRITO PR, DE OLIVEIRAJCM, ALVES FR., MOREIRA EJ, SAMPAIO-FILHO HR, SIQUEIRAJF. (2010). Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplementto instrumentation/irrigation procedures in promotingintra canal 56 *Rev. Investig, Bioméd. São Luís*, 9:49-57, 2017 reduction of Enterococcus faecalis. *Journal of Endodontics*, 36(2), 292- 296.

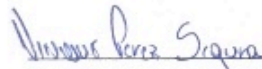
54. SOUZA MA, LIMA G, PAZINATTO B, BISCHOFF KF, PALHANO HS, CECCHIN D. Evaluation of antimicrobial activity of association of chlorhexidine to photosensitizer used in photodynamic therapy in root canals infected by *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017 Sep;19:170.
55. TANOMARU FILHO M, LEONARDO MR, DA SILVA LA. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod*. 28(4):295-299, 2002
56. TIWARI S, AVINASH A, KATIYAR S, AARTHI IYER A, JAIN S. Dental applications of ozone therapy: A review of literature. *The Saudi Journal for Dental Research*. 2017; 8:105-111.
57. UGAZIO, E., TULLIO, V., BINELLO, A., TAGLIAPIETRA, S., & DOSIO, F. (2020). Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques. *Molecules*, 25 (2), 334.
58. VELANO, H.E. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. *Pesq Odontol Bras*, v.15, n.1, p.18-22, jan./mar. 2001.
59. VIANNA ME, GOMES BP, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, DE SOUZA-FILHO FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 97(1):79-84, 2004.

ANEXO 1**DECLARAÇÃO**

O frigorífico Red Beef inscrito no Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal - SISP 0111 DECLARA, para os devidos fins de pesquisa, que o material usado pela Odontóloga **Roberta Mirandola Mile Rossi**, portadora do RG 43.734.135-5 e CPF 310.431.728-31, em sua pesquisa "Avaliação in vitro a redução fúngica de canais radiculares tratados com diferentes terapias", foram retirados de mandíbula de animais abatidos neste estabelecimento sob fiscalização sanitária estadual, por seu médico veterinário credenciado.

Sendo verdade fato e assino o presente.

Valentim Gentil-SP, 16 de março de 2.021



Vinícius Perez Segura
Médico Veterinário
CRMV/SP 41.594

ANEXO 2



RESOLUÇÃO - PARECER
COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTOCOLO Nº 2000086

RESPONSÁVEL

Nome completo	Ricardo S. Navarro
Instituição	Universidade Brasil
Unidade	São Paulo
Departamento / Disciplina	Odontlogia- Pós graduação Bioengenharia e Engenharia Biomédica

TÍTULO DO PROJETO

Avaliação da efetividade de agentes irrigantes e da PDT na descontaminação de canais radiculares contaminados com *Cândida albicans*.

RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 03/07/2020, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura – coordenadora da comissão
Cássia Maria Barroso Orlandi