

## Efetividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica contra patógenos endodônticos

### *Antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy against endodontic pathogens*

Michelly Caroliny Francisco de Castro<sup>1</sup>, Milena Samistraro Cenci<sup>1</sup>, Lysa Ribeiro da Silva<sup>2</sup>, Magali Parizzi<sup>3</sup>, Cleonice Gonçalves da Rosa<sup>3\*</sup>, Anelise Viapiana Masiero<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Curso de Odontologia, Universidade do Planalto Catarinense, Lages-SC, Brasil

<sup>2</sup> Curso de Biomedicina, Universidade do Planalto Catarinense, Lages-SC, Brasil

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde, Universidade do Planalto Catarinense, Lages-SC, Brasil

\*Autora para correspondência: cleo.rosa@uniplaclages.edu.br

### RESUMO

A endodontia tem por finalidade sanificar o canal radicular por meio da instrumentação e do emprego de substâncias químicas. Ainda que, o índice de sucesso seja elevado existem casos que a infecção do sistema de canais persiste. Assim, o presente estudo se propôs avaliar a eficácia antimicrobiana do azul de metileno em diferentes concentrações associado a terapia fotodinâmica contra patógenos endodônticos. O estudo se caracteriza por um estudo experimental *in vitro*, e foi conduzido utilizando a metodologia de contagem padrão em placas. As amostras analisadas foram distribuídas em dois subgrupos, o primeiro em 0,005% de azul de metileno (MB 0,005%) e o segundo em 0,01% de azul de metileno (MB 0,01%). Em seguida, foi avaliada a ação antimicrobiana frente aos principais patógenos endodônticos: *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *E. faecalis*. Dentre essas concentrações, os melhores resultados foram obtidos na concentração 0,005%, a qual comparada com a concentração 0,01%, apresentou maior efetividade. Diante das condições do presente estudo é possível dizer que os resultados foram satisfatórios principalmente para a concentração 0,005%, a qual é usualmente empregada na Endodontia. A associação do azul de metileno a PDT pode ser considerada uma terapia adjuvante local e não invasiva, favorável ao tratamento endodôntico frente a infecções persistentes, atua na diminuição da resistência antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica. Azul de metileno. Endodontia.

Realização:



Apoio:



## ABSTRACT

Endodontics aims to sanitize the root canal through instrumentation and the use of chemical substances. Even though the success rate is high, there are cases where the infection of the canal system persists. Thus, the present study aimed to evaluate the antimicrobial efficacy of methylene blue in different concentrations associated with photodynamic therapy against endodontic pathogens. The study is characterized by an experimental in vitro study and was conducted using standard plate count methodology. The analyzed samples were divided into two subgroups, the first in 0.005% methylene blue (MB 0.005%) and the second in 0.01% methylene blue (MB 0.01%). Then, the antimicrobial action against the main endodontic pathogens was evaluated: *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *E. faecalis*. Among these concentrations, the best results were obtained at the 0.005% concentration, which, compared to the 0.01% concentration, showed greater effectiveness. Given the conditions of the present study, it is possible to say that the results were satisfactory, mainly for the 0.005% concentration, which is usually used in Endodontics. The association of methylene blue to PDT can be considered a local and non-invasive adjuvant therapy, favorable to endodontic treatment in the face of persistent infections, acts in the reduction of antimicrobial resistance.

**Keywords:** Photodynamic therapy. Methylene blue. Endodontics.

## 1 INTRODUÇÃO

A endodontia tem por objetivo promover a sanificação do sistema de canais radiculares (SCR) e propiciar condições de reparo. Visto que, no interior do SCR existem bactérias virulentas que, por vezes, não são erradicadas complementarmente quando realizado o tratamento convencional, são essas o *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Apesar de um índice de sucesso satisfatório, em algumas situações as infecções persistem, mesmo em canais bem tratados (FERNANDES, 2021). Esta resistência está associada principalmente a ação do *Enterococcus faecalis* (SIQUEIRA JR *et al.*, 2012; GHORBANZADEH *et al.*, 2020). Este microrganismo tem a capacidade de competir com outros microrganismos, invadir os túbulos dentinários e resistir à privação nutricional (STUART *et al.*, 2006).

Realização:



Apoio:



Neste contexto novos procedimentos e substâncias tem sido investigado com o intuito de potencializar a sanificação do SCR. A terapia fotodinâmica, também conhecida como PDT (do inglês *Photodynamic Therapy*), tem se mostrado uma alternativa como tratamento complementar (SIQUEIRA JR *et al.*, 2012; PASSOS, 2014). Esta terapia prevê o uso de um corante fotoativo (fotossensibilizador) que é ativado pela exposição à luz de um comprimento de onda específico na presença de oxigênio.

A ativação do fotossensibilizador resulta em formas tóxicas de oxigênio, como oxigênio singleto e radicais livres. Essas formas químicas muito reativas podem danificar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). Desse modo a utilização combinada da terapia fotodinâmica com o fotossensibilizador, azul de metileno, pode apresentar eficácia no combate de bactérias e outros microrganismos resistentes nas infecções endodônticas.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo é avaliar a efetividade da terapia fotodinâmica envolvendo diferentes concentrações de azul de metileno no tratamento de patógenos endodônticos.

## 2 METODOLOGIA

O estudo se caracteriza por um estudo experimental *in vitro*. O mesmo foi realizado na Universidade do Planalto Catarinense em colaboração com Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC). A análise da efetividade antimicrobiana azul de metileno foi conduzida utilizando a metodologia de contagem padrão em placas de acordo com metodologia descrita por Knorst *et al.* (2019).

As amostras analisadas foram distribuídas em dois subgrupos conforme descrito a seguir: (1) 0,005% de azul de metileno (MB 0,005%); (2) 0,01% de azul de metileno (MB 0,01%). Onde: MB significa *methylene blue*, em português azul de metileno.

A atividade antimicrobiana dos grupos acima foi testada nos seguintes microrganismos *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *E. faecalis*. Para os cultivos das células bacterianas foi elaborada uma suspensão padronizada de 10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup> de microrganismos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) em placa a 37 °C e todos os microrganismos foram padronizados em solução salina pelos parâmetros de turvação com auxílio da escala Mcfairland, conforme descrito por Parizzi (2022).

Realização:



Apoio:



Para a avaliação da atividade antimicrobiana, em uma placa de 96 poços foram adicionados a suspensão microbiana e as amostras na proporção (1:3). Em um primeiro momento os microrganismos ficaram em contato com o azul de metileno durante 5 minutos (tempo de pré-irradiação). Após este período as amostras foram irradiadas (fotossensibilizadas) utilizando como fonte de luz um laser de diodo de baixa potência (DMC - *Therapy*) com comprimento de onda de 660 nm, modo de emissão contínua, potência útil do emissor em 100mW com energia de 9 joules por 90 segundos (KNORST *et al.*, 2019). A ponteira do laser foi localizada a uma distância de 10mm do topo dos poços. Em seguida foi realizada a irradiação, intercalando as amostras entre 4 poços para dar o devido distanciamento da fonte de luz para que não houvesse sobreposição de irradiação entre as amostras (PARIZZI, 2022).

A seguir, as suspensões tratadas (microrganismos + amostras), foram colocadas em solução tampão ( $10^{-1}$ ), realizadas diluições decimais, posteriormente semeadas em ágar Müller Hinton e incubadas a 37 °C por 48 horas. Para *C. albicans* foi realizada a incubação em ágar Sabourad a 37 °C por 48 horas. Os resultados foram expressos por unidade formadora de colônia (UFC), por mL ( $UFC.mL^{-1}$ ) (PARIZZI, 2022).

Os dados obtidos foram expressos como médias e desvio padrão das determinações realizadas em triplicata. Foi realizada à análise de variância dos resultados e a comparação de médias pelo Teste de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%, utilizando o programa STATISTICA 7.

### 3 RESULTADOS

De acordo com o presente estudo, a utilização combinada da terapia fotodinâmica ao azul de metileno fotossensibilizado, mostrou-se eficaz à ação antimicrobiana contra os patógenos *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*, realizando essa combinação com azul de metileno em duas concentrações, 0,01% e 0,005%. Frente a isso, os resultados encontrados foram satisfatórios e os mesmos estão apresentados na tabela 1.

Realização:



Apoio:



**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana do azul de metileno fotossensibilizado contra o *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*.

Amostra	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1 MB 0,01	1,6x10 <sup>5</sup> ±1,4x10 <sup>4b</sup>	9,8x10 <sup>4</sup> ±3,5x10 <sup>3b</sup>	6,8x10 <sup>4</sup> ±3,5 x10 <sup>3b</sup>	1,8x10 <sup>8</sup> ±2,4x10 <sup>8a</sup>	2,5x10 <sup>3</sup> ±7,1x10 <sup>2a</sup>
2 MB 0,005	4,9x10 <sup>5</sup> ±1,7x10 <sup>4a</sup>	6,8x10 <sup>5</sup> ±2,5x10 <sup>5a</sup>	1,3x10 <sup>5</sup> ±2,1 x10 <sup>3a</sup>	2,2x10 <sup>8</sup> ±3x10 <sup>8a</sup>	2,5x10 <sup>3</sup> ±7,1x10 <sup>2a</sup>

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) quando analisado pelo teste de Tukey na coluna.

Dentre as concentrações aplicadas, a que melhor se destaca é a 0,005%, a qual comparada com a concentração 0,01%, apresentou maior efetividade nas bactérias *E. faecalis* (Gram +), *S. aureus* (Gram +), *P. aeruginosa* (Gram -). Em relação ao *E. coli* (Gram -) e *C. albicans* (fungo), não houve diferença no resultado entre as concentrações.

#### 4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos se mostraram efetivos devido ao azul de metileno, que tem uma seletividade de alto nível para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que muitas vezes, é associado com a terapia fotodinâmica. Além disso, é capaz de causar a morte celular, por ser um fotossensibilizador exógeno antropogênico, que origina produtos de oxigenação e de foto oxidação (PARIZZI, 2022).

Em seu estudo, Sebrão *et al.* (2017) apontam que o azul de metileno 0,01% teve uma resposta significativa contra o *E. faecalis*, mas em contrapartida quando comparado com a Rosa Bengala, torna-se menos efetivo. As concentrações recomendadas para a Odontologia são de 0,01% e 0, % 005 (EDUARDO *et al.*, 2015). De acordo com Araujo *et al.* (2021) quando se utiliza uma concentração de azul de metileno muito alta, ocorre a alteração de cor do elemento dental, ou seja, o escurecimento da dentina intrarradicular. O autor também relata que essas altas concentrações ultrapassam o limiar de aceitabilidade clínica.

É possível relatar que os resultados foram favoráveis, onde a menor concentração utilizada, de 0,005%, foi a que melhor se destacou e teve resultado positivo na ação antimicrobiana contra os patógenos analisados. Ainda, existe o risco de alteração de cor

Realização:



Apoio:





do elemento dental quando comparada a de maior concentração, a 0,01% (ARAÚJO *et al.*, 2021).

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo *in vitro* realizado, apontam a eficácia do fotossensibilizador, azul de metileno, quando associado a terapia fotodinâmica contra os patógenos endodônticos, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*.

Dentre as concentrações aplicadas os melhores resultados foram obtidos com o azul de metileno a 0,005%, quando comparado com a concentração 0,01%, apresentou maior efetividade nas bactérias *E. faecalis* (Gram +), *S. aureus* (Gram +), *P. aeruginosa* (Gram -). Em relação ao *E. coli* (Gram -) e *C. albicans* (fungo), não houve diferença no resultado entre as concentrações.

Com base nestes resultados é possível afirmar que a associação do azul de metileno a PDT, uma terapia adjuvante local e não invasiva, favorável ao tratamento endodôntico frente a infecções persistentes, atua na diminuição da resistência antimicrobiana, prometendo maior sucesso quando comparada ao tratamento convencional, utilizando concentrações seguras, de fácil manipulação e acessibilidade aos profissionais.

## AGRADECIMENTOS

Aos editais da FAPESC (CP FAPESC 12/2020 N° Termo de Outorga: 2021TR001430 e CP FAPESC 15/2021-ACAFE - Termo de Outorga N°: 2021TR001220)

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, G. S. *et al.* Effects of methylene blue and curcumin photosensitizers on the color stability of endodontically treated intraradicular dentin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, São Paulo, v. 37, p. 1-5, mar. 2022.

EDUARDO, C. P. *et al.* A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 226- 235, 2015.

FERNANDES, C. M. **Avaliação da eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica no tratamento das infecções endodônticas**. 2021. Trabalho de conclusão de curso

Realização:



Apoio:



(Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Planalto Catarinense, Lages, 2021.

GHORBANZADEH, R. *et al.* Modulation of virulence in *Enterococcus faecalis* cells surviving antimicrobial photodynamic inactivation with reduced graphene oxide-curcumin: An *ex vivo* biofilm model. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Iran, v. 29, p. 1-9, mar. 2020.

KNORST, J. K. *et al.* Antimicrobial effect of methylene blue formulations with oxygen carrier at different pHs: preliminary study. **Brazilian Dental Science**, v. 22, n. 1, p. 39-45, 2019.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**, EUA, v. 86, n. 8, p. 694-1126, mar/jun. 2007.

MELO, W. C. M. A.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Carlos, v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.

PARIZZI, M. **Nanopartículas de Azul de Metileno Fotossensibilizadas para Aplicação na Periodontia: Avaliação Físico-Química e Antimicrobiana**. 2022. Dissertação (Pós-Graduação Stricto Sensu em Ambiente e Saúde) – Universidade do Planalto Catarinense, Lages, 2021.

PASSOS, S. M. **Microbiologia das Infecções Endodônticas**. 2014. Monografia (Pós-Graduação em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ROSA, C. G. *et al.* Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, p.9, 2020.

SEBRÃO, C. C. N. *et al.* Comparison of the Efficiency of Rose Bengal and Methylene Blue as Photosensitizers in Photodynamic Therapy Techniques for *Enterococcus faecalis* Inactivation. **Photomedicine and Laser Surgery**, Curitiba, v. 35, n. 1, p. 1-6, 2017.

SIQUEIRA, J. F. *et al.* Princípios biológicos do tratamento endodôntico de dentes com polpa necrosada e lesão perirradicular. **Revista Brasileira de Odontologia**. Rio de Janeiro, v. 69, n.1, p. 8-14, jan./jun. 2012.

STUART, C. H. *et al.* *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **Journal of Endodontics**, EUA, v. 32, n. 2, p. 93-98, fev. 2006.

Realização:



Apoio:

