

Avaliação, *in vitro*, da terapia fotodinâmica em cultura de *Candida albicans*

Brasil, C.O.;¹ Castro, M.R.;² Khouri, S.;³ Arisawa, E.A.L.⁴

^{1,2,3,4}UNIVAP/FCS- curso de Odontologia, Av.Shishima Hifumi, 2911 CEP:12244-000 - São José dos Campos – SP, cl.brasil@ig.com.br

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 culturas de *C. albicans* inoculadas em raízes de dentes bovinos. Vinte raízes foram inoculadas, confirmando-se a contaminação das mesmas. Estas foram então, divididas em quatro grupos e receberam os seguintes tratamentos: G1- solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos; G2- aplicação isolada do laser; G3- aplicação isolada do corante azuleno 25% / Endo-PTC e G4- corante azuleno 25% / Endo-PTC e irradiação com laser. 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, após incubação a 35°C por 48h. 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, laser de AsGaAl, *Candida albicans*

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

O objetivo do tratamento endodôntico é obter a reparação tecidual, permitindo ao dente retornar às suas funções normais. Uma correta desinfecção dos canais radiculares aumenta significativamente o sucesso da terapia endodôntica. Sendo assim, a intervenção visa eliminar os microorganismos, seus produtos e substrato do sistema de canais radiculares.

Tradicionalmente, a redução ou eliminação microbiana é alcançada por meio do preparo químico-cirúrgico, caracterizado pelo uso simultâneo de instrumentos e substâncias químicas irrigadoras (PAIVA; ANTONIAZZI, 1993). Porém, alguns microorganismos podem permanecer viáveis mesmo quando todos os passos são realizados criteriosamente.

A presença de fungos tem sido observada em infecções primárias e secundárias (persistentes) dos canais radiculares. A espécie mais freqüentemente isolada é a *Candida albicans* (VALERA *et al.*, 2001). Apesar disso, muitos estudos buscam meios de destruir as bactérias presentes no canal e poucos ocupam-se dos fungos.

Atualmente, a capacidade antimicrobiana dos lasers tem sido pesquisada. Sabe-se que os de alta potência destroem microorganismos pelo calor

gerado pela alta energia, enquanto os de baixa potência não apresentam efeito térmico.

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. A PDT parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto não tóxico (fotosensibilizador) e oxigênio resulta em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células, causando a morte de microorganismos. Os lasers de baixa potência são utilizados como fontes de luz.

Neste estudo pesquisou-se o efeito da PDT sobre canais radiculares de dentes bovinos contaminados com *Candida albicans* para avaliar uma possível atividade fungicida ou fungistática.

Materiais e Métodos

O fotosensibilizador usado neste estudo foi o azuleno 25% associado ao Endo-PTC. Esta associação não causa manchamento no dente e apresenta banda de absorção no comprimento de onda de 685nm. O equipamento utilizado foi um laser de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl) com acoplamento de fibra ótica acrílica à peça de mão,

desenvolvida pelo fabricante para utilização em canais radiculares.

Vinte dentes bovinos tiveram suas coroas cortadas com discos de Carborundum. Depois de realizado o acesso cervical, os dentes foram instrumentados com limas seguindo a técnica de PAIVA; ANTONIAZZI, 1993. As raízes tiveram suas superfícies externas impermeabilizadas e os ápices selados. Os dentes foram esterilizados em autoclave.

As vinte raízes foram contaminadas com um inóculo de *Candida albicans* (ATCC 10231) obtido de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland (5×10^5 UFC/mL). Após este período, amostras foram colhidas para confirmar a contaminação dos canais (controle positivo). As vinte raízes comprovadamente contaminadas com a 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 ótica em movimentos helicoidais por 3 minutos. Amostras foram colhidas para verificação da ação isolada do laser.

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.

Grupo 4: as raízes receberam o corante azuleno 25% associado ao Endo-PTC por um período de pré-irradiação de 5 minutos e foram irradiadas com a fibra ótica em movimentos helicoidais por 3 minutos. Amostras foram colhidas após estes procedimentos para avaliação da ação da terapia sobre os fungos.

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

Resultados

Os resultados obtidos permitiram observar que as vinte placas semeadas para controle positivo

apresentaram um número incontável de colônias (superior a 100.000 UFC/mL), confirmando assim a contaminação de todos os canais (Figuras 1-A e 2-A).

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



Figura 1 – Avaliação do efeito do tratamento empregado com hipoclorito de sódio a 1 % e do controle positivo através das UFC/mL: A) Controle e B) 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, apenas fotossensibilizador e terapia fotodinâmica, não se observou descontaminação. As placas provenientes dos Grupos 2 (Figura 2-B), 3 (Figura 2-C) e 4 (Figura 2-D) apresentaram-se com número de colônias superior a 100.000 UFC/mL, semelhantes, portanto, às placas referentes ao grupo controle.

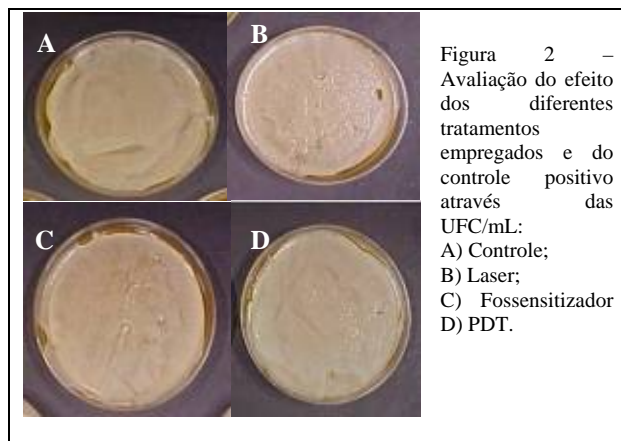


Figura 2 – Avaliação do efeito dos diferentes tratamentos empregados e do controle positivo através das UFC/mL: A) Controle; B) Laser; C) Fossensibilizador D) PDT.

Discussão

As soluções de hipoclorito de sódio, em diversas concentrações, são universalmente utilizadas na desinfecção de canais radiculares. Porém, alguns microrganismos podem permanecer viáveis na profundidade dos túbulos dentinários. Para solução destes casos refratários

ao tratamento convencional, a terapia fotodinâmica tem sido proposta.

No presente estudo, os resultados obtidos com a solução de hipoclorito de sódio a 1% coincidem com aqueles alcançados por D'ARCANGELO *et al.*, 1999, que obtiveram efeito fungicida nos tempos de 10, 20 ou 30 minutos de contato, com diversas concentrações do produto.

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*.

Na ausência do fotossensibilizador, a aplicação do laser por 3 minutos não afetou a viabilidade dos fungos. Utilizando o laser AsGaAl com comprimento de onda de 660nm e potência de 11mW, por 2 minutos, em culturas de *C. albicans*, WILSON e MIA, 1993, também não observaram ação fungicida.

Neste trabalho, a fotoativação do azuleno 25% / Endo-PTC pelo laser AsGaAl (685nm, 5mW, 3 min) não produziu efeito letal em *Candida albicans*.

Diversas variáveis podem afetar o número de células destruídas com o uso de PDT, tais como: concentração e tipo de corante, concentração e estágio fisiológico dos microrganismos, tempo de exposição ao laser e densidade de energia (WILSON e MIA, 1993).

Segundo o fabricante, a potência do equipamento utilizado nesta pesquisa é de 50mW 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 40mW antes e 5mW 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.

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 outra causa para o insucesso da terapia fotodinâmica.

Neste estudo a cultura de *Candida albicans* não foi susceptível à terapia fotodinâmica,

realizada nestes parâmetros. Entretanto, utilizando um protocolo diferente, SOUZA *et al.*, 2006, observaram ação fungicida da PDT em várias espécies de *Candida*, especialmente *C.albicans*. Através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e utilizando outra metodologia, ZEINA *et al.*, 2001, observaram maior efetividade da PDT em bactérias procarióticas do que em espécies eucarióticas como *C.albicans*.

Conclusão

O hipoclorito de sódio a 1% em contato com suspensão de *Candida albicans* durante 15 minutos foi efetivo na descontaminação dos canais radiculares. Entretanto, a PDT realizada utilizando-se fibra ótica (KROMAN®) acoplada ao laser de diodo não apresentou ação fungicida ou fungicida sobre os canais radiculares contaminados com *C.albicans*. 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.

Agradecimentos

A KROMAN® pela cessão temporária de aparelho laser de Arseneto Gálio Alumínio (AsGaAl) com acoplamento de fibra ótica acrílica à peça de mão, desenvolvida pelo fabricante, para utilização em canais radiculares.

Ao apoio técnico de Guilherme Rodrigues Teodoro – Laboratório de Microbiologia – FCS – UNIVAP.

Referências

ACKROYD, R; KELTY, C; BROWN, N; REED, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v.74, n.5, p.656-669, 2001.

D'ARCANGELO, C; VARVARA, G; DE 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.

GARCEZ, A.S. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle

químico. 2002. 91p. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Lasers em Odontologia) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2002.

KÖNIG, R; TESCHKE, M; SIGUSCH, B; GLOCKMANN, E; EICK, S; PFISTER, W. Red Light Kills Bacteria Via Photodynamica Action. **Celular and Molecular Biology**. v.46, n.7, p.1297-1303, 2000.

MACHADO AEH. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova**. v.23, n.2, p.237-243, 2000.

NAVRATIL, L; KYMPLOVA, J. Contraindications in noninvasive Laser Therapy: Truth and Fiction. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v.20, n.6, p.341-343, 2002.

NICOLA, JH; NICOLA, EMD. Wavelength, Frequency, and Color: Absolute or Relative Concepts? **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v.20, n.6, p.307-311, 2002.

OKAMOTO, H; IWASE, T; MORIOKA, T. Dye-Mediated Bactericidal Effect of He-Ne Laser Irradiation on Oral Microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**. V.12, p.450-458, 1992.

PAIVA, JV e ANTONIAZZI, JH. Endodontia. **Bases para a prática clínica**. 2ª edição. Artes Médicas – SP, 1993.

SIBATA, CH; COLUSSI, VC; OLEINICK, NI; KINSELLA, TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. v.33, p.869-880, 2000.

SIQUEIRA JÚNIOR, JF; LIMA, KC; MAGALHÃES, FAC; LOPES, HP; UZEDA, M. Mechanical Reduction of the Bacterial Populations in the Root Canal by Three Instrumentation Techniques. **Journal of Endodontics**. v.25, n.5, p.332-335, 1999.

SIQUEIRA JÚNIOR, JF; RÔÇAS, IN; LOPES, HP; ELIAS, CN; UZEDA, M. Fungal Infection of the Radicular Dentin. **Journal of Endodontics**. v.28, n.11, p.770-773, 2002.

SIQUEIRA JÚNIOR, JF; RÔÇAS, IN; LOPES, HP; MAGALHÃES, FAC; UZEDA, M. Elimination of

Candida albicans Infection of the Radicular Dentin by Intracanal Medications. **Journal of Endodontics**. v.29, n.8, p.501-504, 2003.

SOUZA, SC; JUNQUEIRA, JC; BALDUCCI, I; KOGA-ITO, CY; MUNIN, E; JORGE, AOC. Photosensitization of Different *Candida* Species by Low Power Laser Light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.83, p.34-38, 2006.

TUNÉR, J; HODE, L. It's All in the Parameters: A Critical Analysis of Some Well-Known Negative Studies on Low-Level Laser Therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. v.16, n.5, p.245-248, 1998.

VALERA, MC; REGO, JM; JORGE, AOC. 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, ICJ; BRUGNERA JUNIOR, A; ZANIN, F; GONÇALVES, RB. Terapia Fotodinâmica na Odontologia (T.F.D.). **RGO**. v.51, n.3, p.179-182, jul/ago/set. 2003.

ZEINA, B; GREENMAN, J; PURCELL, W.M; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of dermatology**. v.144, p.274-278, 2001.

WILSON, M; MIA, N. Sensitisation of *Candida albicans* to Killing by low-power laser light. **Journal of Oral Patholog & Medicine**. v.22, p.354-357, 1993.