



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE RADICULAR APÓS
INSTRUMENTAÇÃO MECÂNICA E APDT COM AZUL DE TOLUIDINA**

NITERÓI

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA SUPERFÍCIE RADICULAR APÓS
INSTRUMENTAÇÃO MECÂNICA E APDT COM AZUL DE TOLUIDINA**

RAQUEL CAMARGO DE ABREU SANT`ANNA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Periodontia e cirurgia bucomaxilofacial

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Barcellos De Santana

NITERÓI

2024

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Ronaldo Barcellos De Santana

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Carolina Miller Matos de Santana

Instituição: Universidade Federal Fluminense

Decisão: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). Marcela Medeiros

Instituição: Marinha do Brasil

Decisão: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que sempre esteve ao meu lado me apoiando e sem a qual nenhuma das minhas conquistas seria possível.

Dedico ainda, ao meu pai, que me ensinou a amar esta profissão e com certeza está em algum lugar no astral cheio de orgulho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter uma vida tão abençoada, repleta de oportunidades e por ter me dado consciência para ter uma vida plena.

Agradeço aos meus pais pela dedicação à minha vida para que eu tivesse a melhor educação possível.

Agradeço aos meus orientadores pela confiança em mim depositada.

RESUMO

Sant'Anna, RCA. Avaliação físico-química da superfície radicular após instrumentação mecânica e apdt com azul de toluidina.(dissertação). Niterói. Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Odontologia; 2024.

Objetivo: Avaliar, in vitro, a influência de diferentes modalidades de tratamento mecânico e agentes de condicionamento radicular nas características físico-químicas das superfícies radiculares. Quantificar as alterações estruturais e químicas que ocorrem na superfície radicular após os diferentes tipos de tratamento, visando estabelecer protocolos de tratamento baseados nas mesmas.

Materiais e Métodos: Oito molares inferiores e doze incisivos inferiores extraídos por motivos de doença periodontal foram coletados e armazenados em solução salina. Todas as amostras tiveram a coroa e o ápice seccionados transversalmente e verticalmente por uma broca diamantada. Cada superfície foi instrumentada aplicando 30 golpes de cureta, em seguida receberam pré irradiação com azul de toluidina por 3min e então foi aplicada a aPDT. Em cada uma destas etapas foram realizadas: avaliação quantitativa da topografia radicular em escala micrométrica com um microscópio confocal de medição a laser 3D, e avaliação da composição química das amostras usando análises de superfície de reflectância total atenuada/espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) por um espectrômetro Bruker Alpha-T ATR- FTIR (Bruker Corporation, Billerica, EUA) Fourier-Transform FT-IR no modo ATR com um elemento de reflexão interna de diamante (IRE).

Resultados: As micrografias CFM demonstraram que antes da instrumentação as superfícies radiculares exibiam uma superfície densa e lisa e não foram observados sinais de fibras colágenas ou túbulos dentinários. Após instrumentação mecânica, todas as amostras foram caracterizadas por uma superfície radicular irregular. Após o condicionamento com aPDT, as amostras eram caracterizadas

por topografia mais lisa do que demonstrada por áreas tratadas apenas com SCR, o smear layer estava ausente na superfície da dentina.

Nenhum dos tratamentos resultaram em alterações químicas nas superfícies radiculares, representadas pela mensuração dos níveis de Amida I, Amida II e Amida III nas superfícies radiculares.

Conclusão: A SCR associada a aPDT fornece mudanças na topográficas das superfícies radiculares, tornando-as mais lisas. A realização de aPDT após SCR foi capaz de remover a smear layer, sem provocar desmineralização adicional.

Palavras-chave: antimicrobial photodynamic therapy; periodontal disease; root surface; toluidine blue dye, physicochemical analysis

SUMÁRIO

	Pág
1- RESUMO	07
2- INTRODUÇÃO	07
3- MATERIAIS E MÉTODOS	11
4- RESULTADOS	15
5- DISCUSSÃO	20
6- CONCLUSÃO	21
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

Resumo

A remoção do biofilme/cálculo é realizada através do debridamento mecânico com o uso, principalmente, de curetas e/ou ultrassom, associado a uma adequada instrução de higiene oral. Este projeto tem como objetivo investigar as alterações estruturais que ocorrem na superfície radicular após os diferentes tipos de tratamento propostos. Serão utilizados 10 incisivos e/ou molares inferiores, divididos em grupos para leituras no FTIR e Microscopia Confocal. Espera-se encontrar rugosidades distintas após os diferentes tipos de intervenções - mecânica e química - aplicadas na raiz dentária, o que irá hipoteticamente gerar alterações no padrão de cicatrização e regeneração dos tecidos periodontais do hospedeiro.

Introdução

A periodontite é um distúrbio inflamatório que causa destruição dos tecidos de suporte e de proteção dos dentes, modulada pelo hospedeiro (Kornman et al 1997). Bactérias específicas, tabagismo e Diabetes melito são os mais importantes fatores de risco estabelecidos para periodontite (Lindhe, et al, cap 7, 2018). O biofilme é considerado o fator etiológico primário tanto para o início da doença quanto para a sua progressão (Teughels et al 2006). A doença periodontal afeta mais de 700 milhões de pessoas, sendo esta, uma das inflamações crônicas de maior prevalência ao redor do mundo (Eke PI et al, 2012).

Na prática clínica, a remoção do biofilme/cálculo é realizada através do debridamento mecânico com o uso, principalmente, de curetas e/ou ultrassom, (Greenstein 2000, Sanz et al 2008), de forma cirúrgica ou não cirúrgica. A completa restauração do periodonto e suas funções originais seria o resultado ideal do tratamento. Porém, em muitos casos, estes métodos também causam uma alteração

nas estruturas periodontais levando à formação de epitélio juncional longo. O que pode alterar a regeneração do ligamento periodontal, que funciona como uma barreira física e biológica. Uma superfície radicular livre de biofilme é o requisito mais importante para a obtermos sucesso na terapia periodontal (Lindhe, 2018, cap 27).

Análises histológicas e ultra estruturais demonstraram que raízes expostas à cavidade oral ou a bolsas periodontais, estão contaminadas por bactérias e seus produtos, além de sofrerem redução na inserção de fibras colágenas e na densidade mineral (Amaral NG et al 2011). O tratamento tradicional da periodontite, baseado estritamente na instrumentação mecânica (Baker et al 2000, Caffesse et al 2000), não é capaz de eliminar completamente a infecção e, sobretudo, impedir a formação da lama dentinária, composta por detritos orgânicos, endotoxinas e substâncias biologicamente ativas, que podem prejudicar a regeneração periodontal (Cafesse et al 2000, Covassin et al 2012, Amaral NG et al 2011, Ishi et al 2008). O tratamento químico radicular desmineralizador foi proposto pois é capaz de eliminar a smear layer e expor matriz colágena, favorecendo a regeneração.

O condicionamento radicular resulta em remoção e desmineralização da lama dentinária por intermédio da exposição da matriz colágena, fornecendo, assim, suporte, migração, proliferação e adesão das células envolvidas nos estágios iniciais do processo de cicatrização periodontal (Fernyhough & Page 1983). Fator importante para o reparo tecidual, assim como para a regeneração periodontal (Fernyhough & Page 1983, Baker et al 2000, Zandin et al 2013). O ácido cítrico, ácido fosfórico, EDTA e tetraciclina são agentes de condicionamento químico frequentemente utilizados clinicamente (Zandin et al 2013, Soares et al 2010). Contudo, a grande variedade de protocolos empregados pelos clínicos e pesquisadores tem impedido comparações consistentes entre eles devido a controvérsias na literatura e a ausência de novos estudos controlados *in vitro* e *in vivo*. O uso do EDTA como agente condicionador da superfície afetou negativamente a regeneração tecidual. O EDTA inibiu a adsorção e adesão de elementos sanguíneos à superfície pela dificuldade de sua completa remoção, deixando resíduos capazes de retardar a coagulação, além de o EDTA quelar o cálcio (Leite et al, 2005). Lan et al avaliaram em 1999, a influência do uso do ácido cítrico na cicatrização tecidual uso do ácido cítrico induziu morte celular .

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) é a associação de luz em um certo comprimento de onda a um agente fotossensibilizante químico para reduzir ou erradicar microrganismos, por meio da produção de espécies de oxigênio reativas como : oxigênio singlete, superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e radical hidroperoxila. Tal fonte oxidativa, acarretará em danos em componentes celulares como membrana citoplasmática e DNA (Nunez et al, 2013) responsáveis pelos danos aos microrganismos que tem sido proposta como tratamento adicional para a doença periodontal, especialmente em dentes com morfologia alterada (Kikuchi et al, 2015). O efeito bactericida/bacteriostático da aPDT está bem estabelecido na literatura (Bhatti et al, 1997; Bhatti et al, 2002; Chan & Lai, 2003), podendo eliminar os microrganismos resistentes ao antibiótico (Maischi, 2009), entretanto, não há informações sobre o desenvolvimento de resistência bacteriana (Giuliani et al, 2010), ao contrário do que ocorre com os antibióticos.

Fotossensibilizadores como Porfirinas, Fitalocianinas e Fenotiazinas (Azul de Toluidina e Azul de Metileno) podem atingir tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (Merchat et al, 1996; Wilson et al, 1995). O Azul de Toluidina interage com lipopolissacarídeos presentes na membrana celular de bactérias Gram-negativas, inclusive na ausência de luz. Numa exposição ao comprimento de onda de 630 nm, o corante tem máxima absorção e boas propriedades fotodinâmicas para matar vários tipos de bactérias *in vitro* (Zeina et al, 2001), enquanto o Azul de Metileno possui máximo grau de absorção com um comprimento de onda de 660 nm (Chan e Lai, 2003). A possibilidade de associar o efeito bactericida da aPDT ao efeito de desmineralização superficial da raiz hipoteticamente promovido pelos corantes (fotossensibilizadores) de pH ácido, promovendo biomodificação radicular foi proposta por Damante et al, 2015. Em um caso clínico a paciente apresentava pigmentações negras recorrentes nas coroas dentárias, ainda que realizasse profilaxias, a manchas reapareciam em 15 a 30 dias. Foram coletadas amostras do biofilme e 5 patógenos periodontais foram identificados: A. Actinomyces comitans, P.gingivalis, P.intermedia, P.melaninogenica e P. nigrescens. O tratamento proposto foram 5 sessões de aPDT com azul de Toluidina O + laser vermelho 660nm, seguida de raspagem e alisamento radicular. A paciente apresentou redução na contagem de todas as bactérias

analisadas e eliminação completa da P. intermedia. Redução do índice de sangramento à sondagem de 46,52% para 13,58%. Houve ocorrência de hipersensibilidade dentinária. O PH encontrado no fotossensibilizante azul de toluidina estava entre 4 e 5 e a partir deste fato o grupo passou a avaliar a capacidade de desmineralização destes corantes, mimetizando assim, o efeito do ácido cítrico comumente utilizado em cirurgias periodontais.

A estimulação de fibroblastos e cicatrização tecidual melhorada (Passanezi et al, 2015) foram relatados com o uso do corante Azul de Toluidina O em concentrações de 100 µg/ml (Damante et al, 2016; Karam et al, 2017; Ferreira et al, 2018). O Azul de Toluidina O (pH 4), *in vitro*, reduziu a dureza superficial da dentina, provavelmente devido a desmineralização superficial, comparável ao ácido cítrico (11,74 µm) (Damante et al, 2016) e esta desmineralização não prejudicou o crescimento de fibroblastos humanos gengivais em cultura (Damante et al, 2016; Karam et al, 2017) e o recobrimento radicular com enxerto de tecido conjuntivo (Damante et al, 2019). Diferentes propostas de intervalo de irradiação com laser, variando de 1 a 5 minutos, têm sido colocadas na literatura (Damante et al, 2016; Karam et al, 2017; Sameron et al, 2013; Giannelli et al, 2012), entretanto o maior efeito de desmineralização foi alcançado quando se utilizou o corante em seu tempo máximo de pré-irradiação (Damante et al, 2016). O uso do ácido cítrico/tetraciclina com a aPDT, resultou em tendência à proliferação de fibroblastos gengivais (Ferreira et al, 2018). A aPDT apresentou estímulo positivo para crescimento de Osteoblastos com Azul de Toluidina O (100 µg/1 ml) associado ao Laser vermelho (660nm) (Ferreira et al, 2018).

Em trabalho realizado por este mesmo grupo, fragmentos de dentina foram avaliados após SCRP + aPDT com azul de metileno. Os autores concluíram que o tratamento proposto modificou seletivamente os componentes minerais e orgânicos da superfície radicular, fornecendo níveis aumentados de colágeno nativo (Coelho, MAG, 2023).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo é avaliar as ações físico-químicas do uso da aPDT com azul de Toluidina em superfícies radiculares previamente expostas à doença periodontal.

Materiais E Métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Naval Marcílio Dias (Rio de Janeiro, Brasil) e registrado sob o número de protocolo CAAE 55234722.6.0000.5256. Dentes elegíveis para o estudo deveriam ser indicados para extração devido à presença de doença periodontal e que não fossem submetidos a tratamento odontológico há menos de um ano e fossem preparados e montados de acordo com as normas internacionais (ISO/TS 11405:2003). Os doadores também foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Oito molares inferiores e doze incisivos inferiores extraídos por motivos de doença periodontal foram coletados e armazenados em solução salina.

Preparação de amostra

Foi utilizado um protocolo padronizado para preparação e posicionamento preciso das amostras, de forma a permitir análises das mesmas superfícies em momentos diferentes (Ferreira et al. 2018, 2020). Todas as amostras tiveram a coroa e o ápice seccionados transversalmente e verticalmente por uma broca diamantada de alta velocidade, sob irrigação contínua de água para evitar superaquecimento. As amostras não tratadas foram o grupo de controle da linha de base.

Tratamentos da superfície radicular

Para determinar os efeitos dos tratamentos mecânicos e químicos nas superfícies radiculares, as amostras foram divididas em dois grupos experimentais de tratamento. Cada superfície experimental foi instrumentada aplicando 30 golpes de

trabalho na direção vertical usando uma cureta de Gracey 7/8 nova e afiada (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc., Chicago, EUA) por um operador (RC) que realizou um planejamento eficaz com um ângulo de trabalho de 60-70° e aplicando uma quantidade adequada de pressão durante os golpes. As curetas foram reafiadas após 10 golpes (grupo experimental 1 - SCRP). As mesmas amostras do grupo experimental I foram então submetidas à aPDT seguindo o protocolo, corante azul de Toluidina 0,01% (Fórmula e Ação Laboratório Farmacêutico Ltda, São Paulo, Brasil) com pH 5,1 de acordo com o fabricante. A pré-irradiação com o corante foi realizada aplicando-o na superfície do dente, deixando o fragmento submerso por 3 minutos e enxaguado abundantemente com solução salina, em seguida, em outra etapa, foram irradiados por um laser de diodo com diâmetro da ponta de 600nm (Laser Duo, MMOptics, São Carlos, Brasil) no comprimento de onda da luz vermelha (660nm, diodo semiconductor – InGaAlP) com potência útil de 100mW irradiada em onda contínua, perpendicular ao fragmento, por 90 segundos (9 Joules) (grupo de teste 2 – aPDT).

Microscopia Confocal

A avaliação quantitativa da topografia radicular em escala micrométrica foi realizada com um microscópio confocal de medição a laser 3D (Olympus LEXT OLS4100). A máquina foi ajustada e calibrada para rugosidade superficial em aumento

de 20x da área focal 1mm² apico-coronalmente na superfície da amostra. Após a leitura topográfica, foi criada uma imagem 3D e uma tabela com dados numéricos de picos e vales, permitindo quantificar a rugosidade raiz aritmética através do software TalyMap Gold versão 2.6 (Taylor Robson Precision, Leicester, Inglaterra).

Avaliação tridimensional de superfícies radiculares tratadas

As superfícies radiculares foram medidas e analisadas antes e depois da instrumentação mecânica da raiz seguida pelo procedimento do aPDT, usando o microscópio digital de varredura a laser confocal 3D (CFM) sem contato Olympus LEXT OLS 4100 (Olympus Corp., Tóquio, Japão) baseado em interferometria de varredura a laser sem contato, operando no modo de varredura XYZ, varredura rápida, com uma lente MPLAPONLEXT 5 usando um zoom de 20X. As áreas de avaliação nas porções centrais das amostras de raiz foram definidas posicionando-se primeiramente as lentes de autofocus do equipamento sobre o ponto de referência inicial, em seguida, a mesa motorizada foi deslocada 8 mm transversalmente, no sentido mesio-distal, para aferição da leitura área no centro da amostra de raiz. As medições foram inicialmente realizadas em uma área de 20x de 1.280 × 1.280 μm², seguida de uma avaliação panorâmica de toda a área instrumentada. A caracterização tridimensional de alta resolução de ambas as áreas é mostrada.

Análises Quantitativas

As análises quantitativas da rugosidade da superfície foram realizadas de acordo com os padrões internacionais (ISO 25178-2:2012 Surface Texture) com base em seis grupos individuais de parâmetros. Os parâmetros de desnível superficial,

focados no deslocamento de altura da área avaliada, incluíram a soma dos valores da maior altura do pico e da maior profundidade do vale (S_z), a altura do pico mais alto (S_p) e o valor absoluto da altura do poço maior vale (S_v), bem como a média aritmética do valor absoluto das alturas (S_a) e raiz quadrada média da altura (S_q). Parâmetros funcionais avaliando a rugosidade antes/depois da abrasão incluíram a diferença entre as alturas mínima e máxima da superfície (S_k), altura de pico reduzida (S_{pk}), profundidade de vale reduzida (S_{vk}), altura extrema de pico (S_{xp}), porção de material de pico ($SMr1$) que é a porcentagem de material que compreende as estruturas de pico associadas a S_{pk} e porção de material de vale ($SMr2$) que é a porcentagem da área de medição que compreende as estruturas de vale mais profundas associadas a S_{vk} . Parâmetros de volume funcional incluíram volume vazio de vale (V_{vv}), volume vazio de núcleo (V_{vc}), volume de material de pico (V_{mp}) e volume de material de núcleo (V_{mc}). Também foram avaliados os parâmetros de assimetria da distribuição de altura (S_{sk}) e curtose (S_{ku}), os parâmetros espaciais de comprimento de autocorrelação (S_{al}) e proporção de textura (S_{tr}). Todos os parâmetros topográficos foram medidos em μm .

Análise química com radiação da transformada infravermelha de Fourier (FT-IR)

A composição química das amostras foi determinada usando análises de superfície de reflectância total atenuada/espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) por um espectrômetro Bruker Alpha-T ATR- FTIR (Bruker Corporation, Billerica, EUA) Fourier-Transform FT-IR no modo ATR com um elemento de reflexão interna de diamante (IRE). As superfícies de dentina foram posicionadas contra o cristal de diamante da unidade ATR/FTIR.

Os espectros da superfície da raiz foram obtidos pela aplicação de pressão com a ponte ATR no diamante FTIR e foram registrados na faixa de 600 a 4000 cm^{-1} a 4 cm^{-1} de resolução. Cada espécime foi escaneado 32 vezes em cada medição FTIR, e o espectro final adquirido foi a média de todas essas varreduras. Para cada amostra, os espectros foram obtidos antes do tratamento, após SCRP e após aPDT e, em seguida, foram registrados e analisados pelo software OPUS 6.5 (Bruker, Ettlingen, Alemanha).

A análise espectral da amostra foi realizada registrando as bandas relacionadas a amida I (1630 cm^{-1}), amida II (1538 cm^{-1}), fosfato (1030 cm^{-1}), carbonato (870 cm^{-1}), amida III (1235 cm^{-1}) e integrando a área sob cada banda após a correção da linha de base e normalização pela área dos modos de vibração ν_1 e ν_3 da banda de fosfato em 1.035 cm^{-1} usando as ferramentas apropriadas do software (Rodrigues et al 2018, Miranda et al 2019, Benetti et al 2015) .

Resultados

Análise morfológica da superfície da raiz

As micrografias CFM demonstraram que antes da instrumentação as superfícies radiculares exibiam uma superfície densa e lisa e não foram observados sinais de fibras colágenas ou túbulos dentinários (Figuras 1A e 2A). Após instrumentação mecânica, todas as amostras foram caracterizadas por uma superfície radicular irregular, com a presença de marcas paralelas, áreas onduladas e sulcos ocasionais induzidos pelos golpes da cureta, smear layer e túbulos dentinários ocluídos (Figura 1B e 2B). Após o condicionamento com aPDT, as amostras ainda eram caracterizadas por superfícies radiculares irregulares e sulcadas, porém com uma topografia mais lisa do que demonstrada por áreas tratadas apenas com SCRP, o smear layer estava ausente na superfície da dentina (Figuras 1C e 2C).

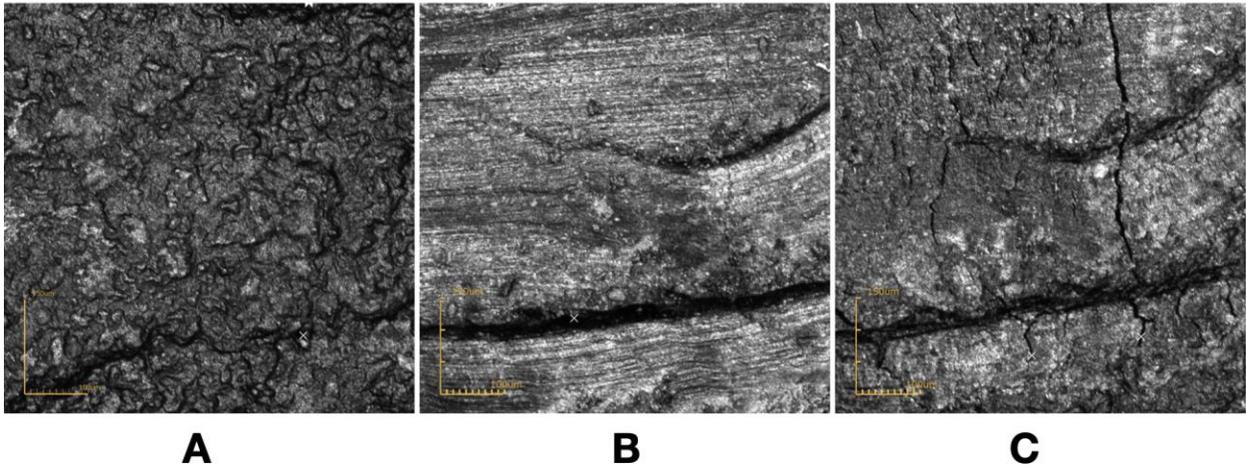


Figura 1 - Imagens obtidas por microscopia confocal mostrando a morfologia das superfícies radiculares na linha de base (A), após SCRCP (B) e após tratamento com aPDT (C). Ampliação 20x

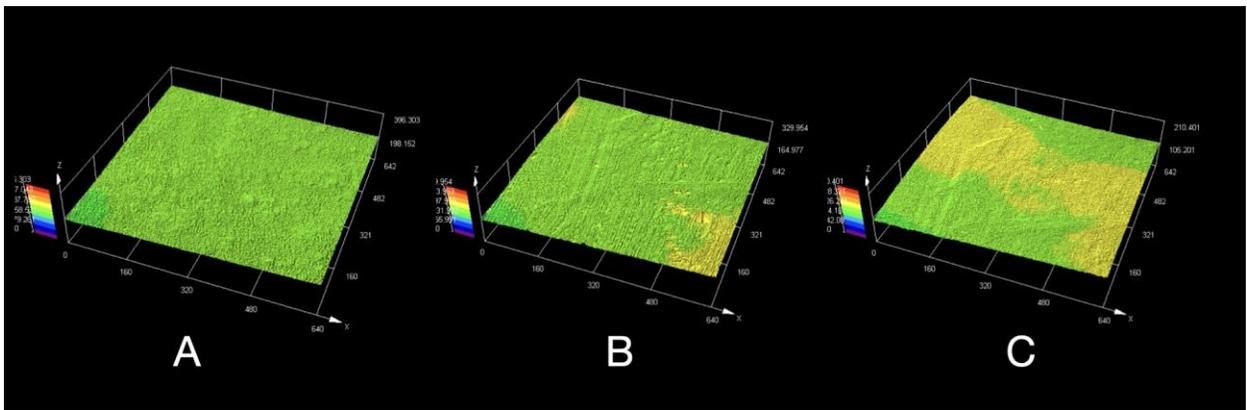


Figura 2 - Imagens tridimensionais obtidas por microscopia confocal mostrando a morfologia das superfícies radiculares na linha de base (A), após SCRCP (B) e após tratamento com aPDT (C). Ampliação 20x

Análise topográfica quantitativa da superfície radicular

As alterações na rugosidade superficial foram avaliadas por dezenove parâmetros individuais, de acordo com normas internacionais (ISO 25178 Surface Texture), e demonstraram que nenhum parâmetro foi significativamente alterado por SCRП e aPDT (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas entre aPDT e SCRП para qualquer parâmetro.

Tabela 1 - Dados quantitativos para alterações da rugosidade topográfica demonstrando os efeitos cumulativos da raspagem e alisamento radicular e aPDT nas superfícies radiculares.

	Baseline	Scaling	aPDT	
Sq[μm]	12.87 \pm 9.98	13.27 \pm 7.99	8.47 \pm 8.12	P= 0.25 NS
Sp[μm]	91.00 \pm 42.63	53.05 \pm 48.97	53.36 \pm 36.56	P= 0.12 NS
Sv	92.11 \pm 53.07	81.82 \pm 36.84	11.80 \pm 4.94	P=0.55 NS
Sa	7.56 \pm 5.89	10.47 \pm 6.32	9.49 \pm 4.67	P=0.47 NS
Sz	187.70 \pm 87.40	140.48 \pm 79.96	141.91 \pm 77.88	P=0.22 NS
Ssk	-0.082 \pm 0.47	0.46 \pm 0.51	0.27 \pm 0.64	P= 0.05
Sku	2.74 \pm 1.37	3.04 \pm 1.83	2.55 \pm 1.97	P= 0.86 NS
Sk	36.69 \pm 27.04	20.53 \pm 12.72	21.39 \pm 18.94	P= 0.07 NS
Spk	12.19 \pm 10.64	10.11 \pm 13.73	10.96 \pm 13.67	P= 0.73 NS

Svk	9.30±5.94	17.59±18.91	16.76±15.78	P= 0.40 NS
SMr1	12.61±9.20	11.68±13.47	10.48±6.61	P= 0.86 NS
SMr2	89.24±5.80	83.536±8.21	75.78±27.78	P= 0.24 NS
Sxp	30.00±25.96	24.93±14.45	20.58±15.19	P= 0.44 NS
Vvv	1.30±0.78	1.85±1.43	1.48±1.05	P= 0.22 NS
Vvc	16.48±14.51	13.16±6.99	19.75±15.03	P= 0.33 NS
Vmp	0.48±0.23	0.29±0.22	0.45±0.43	P= 0.25 NS
Vmc	13.83±9.15	31.56±60.28	8.59±7.02	P= 0.31 NS
Sal	162.29±78.06	164.70±70.18	128.82±81.54	P= 0.53 NS
Str	0.51±0.13	0.39±0.18	0.39±0.18	P= 0.08 NS

Dados apresentados como \pm desvio padrão. a= P<0.05 raspagem versus controle, b= P<0.05 aPDT versus controle, c= P<0.05 aPDT versus raspagem. Medições repetidas (ANOVA) com Levene's test of homogeneity and Greenhouse-Geisser correction. *Post hoc* test using the Tukey's Pairwise test.

Alterações químicas da superfície radicular após debridamento mecânico e Apdt

A composição química da superfície radicular tratada foi determinada por Radiação por Transformada de Infravermelho de Fourier (FT-IR). Como mostrado na tabela 2, nenhum dos tratamentos resultaram em alterações químicas nas superfícies radiculares, representadas pela mensuração dos níveis de Amida I, Amida II e Amida III nas superfícies radiculares. Modificações nas bandas amida do espectro FTIR podem potencialmente indicar alterações na porção orgânica da superfície radicular, particularmente no conteúdo e estrutura do colágeno. Também não foram observadas

diferenças significativas nas medições de fosfato e carbonato para qualquer tratamento em comparação com os controles.

Tabela 2 - Dados quantitativos para alterações químicas determinadas pela radiação de transformação infravermelha de Fourier (FT-IR) demonstrando os efeitos cumulativos da raspagem e alisamento radicular e aPDT nas superfícies radiculares.

Band a	Grupo		Controle	Rasp	aPDT	
870 cm⁻¹	<i>v2 of CO₃²⁻</i>	Carbonato	0.0045±0.0028	0.051±0.029	0.0045±0.0026	P=0.87 NS
1030 cm⁻¹	<i>v3 of PO₄³⁻</i>	Fosfato	0.0074±0.005	0.0049±0.004	0.0059±0.005	P=0.52 NS
1630 cm⁻¹	<i>Collagen</i>	Amida I	0.0028±0.002	0.0039±0.002		P=0.57 NS
1538 cm⁻¹	<i>Type A CO₃²⁻</i>	Amida II	0.0035±0.002	0.0036±0.002	0.004±0.002	P=0.61 NS
1235 cm⁻¹	<i>Collagen</i>	Amida III	0.0038±0.002	0.0021±0.001	0.0030±0.002	P=0.31 NS

Discussão

O uso de agentes químicos para se obter um preparo adequado das raízes no intuito de favorecer a regeneração e evitar a recorrência tem sido motivo de

atenção. Estudos in vitro e in vivo enfatizaram a importância do condicionamento radicular utilizando diferentes métodos para complementar a raspagem e alisamento radicular. Alguns estudos usaram hidrocloreto de tetraciclina HCl para limpar as raízes pelo seu efeito bactericida ⁽⁹⁾.

O uso do EDTA como agente condicionador de superfície afetou negativamente a regeneração e inibiu a adsorção e adesão de elementos sanguíneos à superfície deixando resíduos capazes de retardar a coagulação, além de o EDTA quelar o cálcio ⁽¹³⁾. O ácido cítrico causou morte celular quando em contato com o ligamento e retardou a proliferação de células ⁽¹⁴⁾.

Os dados coletados mostraram que os tratamentos SCRCP e aPDT resultaram em mudanças topográficas significativas nas superfícies radiculares analisadas, porém, sem efeito cumulativo para a associação destes dois tratamentos. A CMF revelou que a aPDT diminuiu as rugosidades superficiais causadas pelos golpes de cureta e se mostrou eficaz na remoção da smear layer, desoclindo os túbulos dentinários, e conseqüentemente, limpando a superfície radicular de endotoxinas, fator importante para favorecer a regeneração periodontal ^(11, 12).

O corante Azul de toluidina não reduziu a dureza superficial da dentina como demonstrado em estudos previamente apresentados ⁽²⁶⁾.

Os tratamentos propostos não provocaram alterações químicas na superfície radicular, ao contrário do que foi encontrado nos resultados de aPDT realizada com azul de metileno em trabalho prévio realizado por este mesmo grupo ⁽³²⁾.

Outros parâmetros, como o tempo de pré irradiação e a energia total aplicada, assim como o número de sessões também devem ser considerados na promoção de um efeito fotobiomodulador adicional.

Conclusão

De acordo com os resultados encontrados, podemos concluir que:

A SCRCP associada a aPDT fornece mudanças na topográficas das superfícies radiculares, tornando-as mais lisas.

A realização de aPDT após SCRCP foi capaz de remover a smear layer, sem provocar desmineralização adicional.

Bibliografia:

1. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS (2000) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 1997(14):33–53
2. Lindhe, Jan, Lang, Niklaus P, Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral, 2018, Ed6, Guanabara Koogam.
3. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 17(Suppl 2):68–81
4. Eke PI, et al. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J. Periodontol.* 2015;86:611–622. doi: 10.1902/jop.2015.140520
5. Greenstein G (2000) Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review.

6. Amaral NG, Rezende ML, Hirata F, Rodrigues MG, Sant'ana AC, Gregghi SL et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. *J Appl Oral Sci* 2011;19:469-475.
7. Baker PJ, Rotch HA, Trombelli L, Wikesjö UM. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. *J Periodontol* 2000;71: 1139-1143.
8. Caffesse RG, De LaRosa M, Garza M, Munne-Travers A, Mondragon JC, Weltman R. Citric acid demineralization and subepithelial connective tissue grafts. *J Periodontol* 2000;71: 568-572.
9. Cavassim R, Leite FR, Zandim DL, Dantas AA, Rached RS, Sampaio JE. Influence of concentration, time and method of application of citric acid and sodium citrate in root conditioning. *J Appl Oral Sci* 2012;20:376-383.
10. Ishi EP, Dantas AA, Batista LH, Onofre MA, Sampaio JE. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:25-33.
11. Fernyhough W, Page RC. Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. *J Periodontol* 1983;54:133-140.
12. Zandim DL, Leite FR, Silva VC, Lopes BM, Spolidorio LC, Sampaio JE. Wound healing of dehiscence defects following different root conditioning modalities: an experimental study in dogs. *Clin Oral Investig* 2013;17:1585–1593.
13. Leite FR, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JE. Blood cell attachment to root surfaces treated with eDTA gel. *Braz Oral Res.* 2005;19(2):88-92.
14. Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dent J.* 1999;44(2):123-30.
15. Nunez S, Aguinaldo Siva Garces, Martha Simões Ribeiro. PDT-Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na odontologia. Elsevier, 2013
16. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, Fujimura T, Fukuda M, Mitani A. Adjunctive Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Nonsurgical

Periodontal Treatment: A Review of Literature Int J Mol Sci. 2015 Oct; 16(10): 24111–24126

17. Bhatti M., MacRobert A., Henderson B., Wilson M. Exposure of porphyromonas gingivalis to red light in the presence of the light-activated antimicrobial agent toluidine blue decreases membrane fluidity. Curr. Microbiol. 2002;45:118–122. doi: 10.1007/s00284-001-0095-4. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Bhatti M., MacRobert A., Meghji S., Henderson B., Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of porphyromonas gingivalis *in vitro*. Photochem. Photobiol. 1997;65:1026–1031. doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb07964.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Chan Y., Lai C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. Lasers Med. Sci. 2003;18:51–55. doi: 10.1007/s10103-002-0243-5. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Maisch T. A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: Antimicrobial photodynamic treatment. Mini Rev. Med. Chem. 2009;9:974–983. doi: 10.2174/138955709788681582. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Merchat M., Bertolini G., Giacomini P., Villanueva A., Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. J. Photochem. Photobiol. B. 1996;32:153–157. doi: 10.1016/1011-1344(95)07147-4. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Wilson M., Burns T., Pratten J., Pearson G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. J. Appl. Bacteriol. 1995;78:569–574. doi: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb03101.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Zeina B., Greenman J., Purcell W.M., Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. Br. J. Dermatol. 2001;144:274–278. doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04013.x.
24. Chan Y., Lai C.H. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. Lasers Med. Sci. 2003;18:51–55. doi: 10.1007/s10103-002-0243-5. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

25. Damante, Carla Andreotti. Desenvolvimento e testes in vitro de um novo corante para terapia fotodinâmica em Periodontia [habilitation thesis]. Bauru: University of São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2015 [cited 2024-03-25].
doi:10.11606/T.25.2015.tde-12112015-142759.
26. Damante CA, Ducati P, Ferreira R, Salmeron S, ZangrandoMS, Rezende ML, Sant'Ana AC, Greggi SL, Magalhães AC (2016) In vitro evaluation of adhesion/proliferation of human gingival fibroblasts on demineralized root surfaces by toluidine blue O in antimicrobial photodynamic therapy. *Photodiagn Photodyn Ther* 13:303–307
27. Karam PSBH, Ferreira R, Oliveira RC, Greggi SLA, de Rezende MLR, Sant'Ana ACP, Zangrando MSR, Damante CA (2017). Stimulation of human gingival fibroblasts viability and growth by roots treated with high intensity lasers, photodynamic therapy and citric acid. *Arch Oral Biol* 81:1–6
28. Ferreira R, Barros RTT, Karam PSBH, Sant'Ana ACP, Greggi SLA, Rezende MLR, Zangrando MSR, Oliveira RC, Damante CA. Comparison of the effect of root surface modification with citric acid, EDTA, and aPDT on adhesion and proliferation of human gingival fibroblasts and osteoblasts: an in vitro study. *Lasers in Medical Science* (2018) 33:533–538
29. Damante CA, Karam PSBH, Ferreira R, Rezende MLR, Greggi SLA, Passanezi ACS, Zangrando MSR. Root surface demineralization by citric acid/tetracycline gel and Apdt associated to subepithelial connective tissue graft improves root coverage outcomes. A 12-month preliminary randomized clinical trial. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 197 (2019) 111528
30. Salmeron S, Rezende ML, Consolaro A, Sant'ana AC, Damante CA, Greggi SL, Passanezi E (2013) Laser therapy as an effective method for implant surface decontamination: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol* 84:641–649
31. Giannelli M, Formigli L, Lorenzini L, Bani D (2012) Combined photoablative and photodynamic diode laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol* 39:962–970.
32. Coelho, MAG, Efeitos Físico-Químicos Do Uso Da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana No Tratamento Da Superfície Radicular, Tese de dissertação para mestrado, 2023, Uff.

33. Rodrigues, R. B. et al. Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strength. Clin. Oral Invest. 22, 875–883 (2018).
34. Miranda, R. R., Silva, A. C. A., Dantas, N. O., Soares, C. J. & Novais, V.R. Chemical analysis of in vivo-irradiated dentine of head and neck cancer patients by ATR-FTIR and Raman spectroscopy. Clin. Oral Invest. 23, 3351–3358 (2019).
35. Benetti C, Ana PA, Bachmann L, Zezell DM. Mid-Infrared Spectroscopy Analysis of the Effects of Erbium, Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium- Garnet (Er,Cr:YSGG) Laser Irradiation on Bone Mineral and Organic Components. Appl Spectrosc. 2015 Dec;69(12):1496-504. doi:10.1366/14-07726.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: **Avaliação físico-química da superfície radicular após instrumentação mecânica e condicionamento químico.**

Pesquisador Responsável: CC (CD) Raquel Camargo de Abreu Sant'Anna

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Clínica de Periodontia da Odontoclínica Central da Marinha.

Telefones para contato:

(21) 976748603

Nome do Voluntário: _____

Idade: _____anos

RG:

Responsável legal (quando for o caso):

RG Responsável legal:

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa **“Avaliação físico-química da superfície radicular após instrumentação mecânica e condicionamento químico.”**, de responsabilidade do pesquisador Marcio Augusto Gonçalves Coelho.

A doença periodontal causa a destruição do suporte dos dentes, e, em casos avançados, pode resultar em grande mobilidade dentária e incômodos na mastigação. Deste modo, o tratamento de muitos destes dentes não é possível, e a sua extração (exodontia) é indicada. Entretanto ao extrair e descartar estes dentes, o estudo das alterações que a doença causou e efeitos de possíveis tratamentos não podem ser avaliados.

A proposição do presente estudo é avaliar as alterações que a doença periodontal tenha causado nos dentes que foram extraídos e o efeito de diferentes tratamentos nestes dentes. Após a extração, os dentes serão tratados, no laboratório de pesquisa, por meio de raspagens, polimento e/ou aplicação das substâncias EDTA, tetraciclina, EMD e GEM21S e serão avaliados em equipamentos para perfilômetria a laser, espectroscopia infravermelho por transformação de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de fluorescência e, por último, cultura de fibroblastos. Os achados deste estudo podem colaborar para prevenir e/ou tratar a doença periodontal, com o objetivo de preservar a dentição e evitar a extração de dentes com a doença periodontal.

O Sr.(a) deve estar ciente que seu(s) dente(s) será(ão) extraído(s), por indicação clínica de doença periodontal avançada, por não haver mais nenhum outro tratamento passível de ser realizado para a sua manutenção na cavidade oral. As extrações foram indicadas por profissionais não envolvidos e por motivos não

relacionados ao presente estudo. **Importante:** o(s) dente(s) que será(ão) coletado(s) seria(m) desprezado(s) em uma cirurgia convencional de extração, não havendo assim, nenhum prejuízo clínico ou biológico para o Sr/Sr^a.

Os procedimentos cirúrgicos de extração (exodontia) serão todos realizados em ambiente ambulatorial, com anestesia local, pelos profissionais que lhe prestam atendimento clínico. Os mesmos serão os responsáveis pelo exame, planejamento, prescrição pré e pós-cirúrgica, orientações pós-operatórias e também acompanhamento pós-operatório, com a frequência e regularidade que me forem estabelecidas ou necessárias. O pesquisador responsável – CC (CD) Raquel Camargo de Abreu Sant’Anna – cirurgião-dentista, Especialista em Implantodontia – CRORJ nº 30303 participará apenas das avaliações dos dentes, em laboratório, após a sua extração.

Após a conclusão da pesquisa, o material coletado será descartado, em observância às normas vigentes. Todos os dados coletados na pesquisa, inclusive os seus pessoais, são de caráter confidencial, e serão utilizados apenas no meio científico.

Endereço do responsável pela pesquisa: Odontoclínica Central da Marinha – Praça Barão de Ladário S/N, Praça Mauá – CEP:20091-000 – Rio de Janeiro – RJ. Telefone para contato: (21) 2104-6596.

Os Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) são compostos por pessoas que trabalham para que todos os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos sejam aprovados de acordo com as normas éticas elaboradas pelo Ministério da Saúde. A avaliação dos CEPs leva em consideração os benefícios e riscos, procurando minimizá-los e busca garantir que os participantes tenham acesso a todos os direitos assegurados pelas agências regulatórias. Assim, os CEPs procuram defender a dignidade e os interesses dos participantes, incentivando sua autonomia e participação voluntária. Procure saber se este projeto foi aprovado pelo CEP desta instituição. Caso haja dificuldade em contato com o pesquisador responsável ou para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, faça contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Naval Marcílio Dias (CEP/HNMD).

Endereço Rua Cesar Zama 185, Lins de Vasconcelos – RJ. Telefone: (21) 2599-5452.
E-mail: hnmd.CEP@marinha.mil.br.

Declaro que fui devidamente esclarecido sobre todas as fases do trabalho e que tive todas as minhas dúvidas sanadas. Estou ciente de poder desistir da participação do trabalho a qualquer instante.

De livre e espontânea vontade, autorizo os procedimentos previamente descritos.

Autorizo também, a divulgação em meio científico de fotos relacionadas ao caso, bem como das lâminas processadas histologicamente.

Eu, _____, declaro ter sido informado e concordo em participar. Como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

—

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

—

Testemunha

Nome e assinatura do responsável por obter o consentimento

—
Testemunha