

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**Lívia Ramos Alvariza**

**CAPACIDADE DE VISUALIZAÇÃO CLÍNICA DO BIOFILME  
ENDODONTÍCO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATRAVÉS DA  
FLUORESCÊNCIA UTILIZANDO DOIS FLUORÓFOROS**

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre  
2021

LÍVIA RAMOS ALVARIZA

**CAPACIDADE DE VISUALIZAÇÃO CLÍNICA DO BIOFILME  
ENDODÔNTICO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATRAVÉS DA  
FLUORESCÊNCIA UTILIZANDO DOIS FLUORÓFOROS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao curso de Pós Graduação em  
Odontologia da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, como requisito parcial para  
obtenção do título de Especialista em  
Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de  
Figueiredo

Porto Alegre

2021

## RESUMO:

Algumas espécies de bactérias, como o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), apresentam maior resistência aos procedimentos terapêuticos endodônticos, podendo sobreviver no sistema de canais radiculares. Bactérias remanescentes no interior de canais radiculares, podem levar a infecções persistentes, tratamentos sem sucesso ou até mesmo a extração do dente. Existe uma grande dificuldade em identificar clinicamente o biofilme e as bactérias no interior do sistema de canais radiculares. Dessa forma, a fluorescência vem como um novo método para reduzir o problema de visualização clínica da infecção endodôntica. O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio da fluorescência, com fluoróforos, a presença de *Enterococcus faecalis* no interior dos canais radiculares. Foram selecionados 18 dentes de origem bovina, com canal único. Os dentes foram descoronados, próximo à junção amelocementária, com tamanhos iguais à 16mm, sulcos no sentido longitudinal foram realizados nas faces vestibular e palatina das amostras e posteriormente feita limpeza e preparo por meio do ultrassom. Os canais radiculares foram infectados com *Enterococcus faecalis* e incubados por 29 dias para que ocorresse o desenvolvimento de biofilme, com renovação do meio de cultivo a cada 48 horas. Após esse período, os dentes foram divididos em 3 grupos: Controle Negativo, grupo Calceína e grupo Qubit Protein. Por fim, os dentes foram visualizados clinicamente por meio do sistema ReVeal, em que consistem em uma lupa de 2,5x de aumento, com fotóforo Ultra Violeta, a fim de observar a efetividade dos fluoróforos nos canais infectado com *Enterococcus faecalis*. Observou-se que ambos fluoróforos funcionam e fluorescem na presença de bactérias, o grupo controle negativo não apresentou fluorescência. A calceína apresentou maior luminosidade, porém com espalhamento de luz. O Qubit Protein apresentou luminescência uniforme sem espalhamento de imagem.

**Palavras-Chave:** *Enterococcus faecalis*, Fluorescência, Biofilme, Endodontia.

## SUMÁRIO

<b>Introdução.....</b>	<b>5</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>8</b>
<b>Material e Método.....</b>	<b>8</b>
Preparo e seleção dos dentes.....	8
Controle de Esterilização.....	11
Crescimento Bacteriano e Infecção do Canal Radicular.....	11
Gram das amostras.....	11
Grupos Experimentais.....	12
Avaliação Clínica.....	12
<b>Resultados.....</b>	<b>12</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>14</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>17</b>
<b>Referências.....</b>	<b>17</b>

## INTRODUÇÃO:

Um dos principais objetivos do tratamento dos canais radiculares é a limpeza e desinfecção do sistema endodôntico, afim de que se consiga a manutenção da estrutura dental. Para que seja possível atingir esse objetivo é fundamental que se consiga sucesso na execução da técnica e que esteja esclarecido a importância que os microrganismos e seus subprodutos possuem em relação ao desenvolvimento e manutenção das doenças pulpares (Kakehashi *et al.*, 1965; Möller *et al.*, 1981).

A invasão por bactérias e seus subprodutos na polpa e nos tecidos periapicais, têm como consequência a periodontite apical e necrose pulpar (Zilm *et al.*, 2017). Assim, a remoção do biofilme é de grande importância para que se consiga atingir sucesso do tratamento (Bukhary e Balto, 2017).

Os biofilmes têm como componentes primários proteínas extracelulares e polissacarídeos, os quais possuem papel fundamental para sobrevivência celular, persistência microbiana e interação celular. Além disso, protegem as bactérias de agentes antimicrobianos, estresse ambiental, tornando-as de 10 a 1000 vezes mais resistentes (Kumar *et al.*, 2019).

*Enterococcus faecalis* é uma espécie de bactérias que se mostra mais presentes em canais radiculares de dentes, os quais estão associados às falhas endodônticas e lesões periapicais persistentes (Molander *et al.*, 1998). Sua resistência decorre da sua habilidade de sobreviver em ausência prolongada de substrato nutricional e ocorre independente da utilização de soluções irrigadoras, medicamentos intracanaís e antibióticos, tendo a capacidade de invadir profundamente os túbulos dentinários (Jhamb *et al.*, 2020). Dessa forma, *Enterococcus faecalis* é caracterizado como um patógeno oportunista, na qual a sua persistência no interior do canal radicular reflete um problema terapêutico significativo (Evans *et al.*, 2002).

A doença endodôntica é uma infecção na qual o grande mediador é o biofilme bacteriano. A detecção de biofilme bacteriano é importante para o manejo clínico de doenças e para que se consiga sucesso no tratamento (Ricucci e Siqueira, 2010).

A bioluminescência é a luz visível gerada por um organismo vivo, por meio de uma reação química. Todas as bactérias luminosas, até agora conhecidas, utilizam a mesma reação enzimática para produção de luz, baseada na luciferase bacteriana (Robertson *et al.*, 2011)

Já a fluorescência é um processo em que substâncias emitem luz, dessa maneira elas absorvem luz de um comprimento de onda mais curto e a reemitem num comprimento de onda mais longo (Jia e Ionescu, 2015). A fluorescência vermelha origina-se de compostos porfirínicos, os quais são sintetizados por alguns microrganismos presentes no biofilme (Lee *et al.*, 2018). Contudo, o *Enterococcus faecalis* não consegue sintetizar porfirinas, assim não possuem fluorescência. Dessa forma, é essencial a utilização de fluoróforos para a sua visualização e detecção (Frankenberg *et al.*, 2002).

Os fluoróforos são excitados por uma variedade de comprimentos de onda. As fontes de luz usadas para fluorescência devem produzir luz dentro da região de absorção do fluoróforo de interesse, numa intensidade suficiente. Para observar a fluorescência, são usados filtros ópticos, que passam nos comprimentos de onda de fluorescência (Shakibaie e Walsh, 2016).

As porfirinas possuem uma estrutura molecular aromática com uma grande quantidade de elétrons no seu sistema conjugados que, fora de sua localização, pulam nas bandas orbitais e estabilizam a energia absorvida resultando na fluorescência (Fyrestam *et al.*, 2015).

A fluorescência vermelha está relacionada à cárie e ao potencial cariogênico da placa dentária (Volgenant *et al.*, 2016). De acordo com König e colaboradores (1993), lesões de cárie mostraram uma emissão característica de fluoróforos endógenos na região espectral vermelha, sendo típica de porfirinas fluorescentes, já o tecido dentário duro saudável não exibe tal fluorescência.

O esmalte cariado apresenta fluorescência maior na região espectral vermelha, devido a presença de derivados de porfirinas os quais são produzidos por bactérias (Buchalla *et al.*, 2004). O espectro de fluorescência esteve entre 640 e 655 nm em esmalte e dentina cariada, o que não ocorreu em tecidos saudáveis (Hibs *et al.*, 1999). O cálculo subgingival e cárie radicular, os quais apresentam

dificuldade de detecção visualmente, mostram-se fluorescentes no espectro entre 633–635 nm (Kurihara *et al.*, 2004).

Durante o processo de cárie, a autofluorescência dos tecidos dentários sofre alterações. Assim, qualquer lesão cariosa pode ser detectada pela variação na fluorescência. Essa mudança pode ser explicada devido à modificação nas fibras colágenas ou devido à formação de biofilmes bacterianos com porfirinas endógenas (Slimani *et al.*, 2014).

Estudos recentes mostram como a Calceína pode ser um potente corante para detecção de bactérias vitais dentro do biofilme endodôntico, tendo a capacidade de reduzir infecções persistentes por meio da detecção de células vitais em pouco tempo (Herzorg *et al.*, 2017). Além da Calceína, o Quibit Protein (Invitrogen, Q3321) é uma proteína o qual apresenta sinais fluorescentes (Kuo *et al.*, 2019).

Além disso, bactérias podem transformar o 5-ALA, em derivados de porfirinas por meio de processos biológicos. Além disso, o 5-ALA desempenha um papel de dupla modalidade tendo finalidade de diagnóstico com a capacidade de aumentar a autofluorescência vermelha e para inativação de bactérias (Lashkari *et al.*, 2019).

A fluorescência pode ser utilizada para encontrar e quantificar a profundidade de fraturas radiculares, a fim de que as mesmas são colonizadas por biofilme bacteriano, substituindo dessa forma métodos convencionais de diagnóstico de fraturas (Ku *et al.*, 2018).

Proteínas fluorescentes estão se tornando uma das escolhas de pesquisadores, devido sua alta sensibilidade e a continua melhoria das tecnologias associadas para a sua detecção (Nogales *et al.*, 2014).

“*Fluorescence-enhanced theragnosis*”, descrito primeiramente pelo autor Liviu Steier, possui a finalidade de utilizar um dispositivo para que seja possível aumentar a capacidade de visualização e avaliação, fornecendo orientações para o tratamento em todo o processo, desde o diagnóstico até a diferenciação do tecido doente e saudáveis. Unindo, dessa forma, tanto terapia como diagnóstico (Steier, 2020).

Diante do que foi exposto, justifica-se a necessidade de desenvolver métodos em que seja possível usar a fluorescência com o objetivo de auxiliar no diagnóstico e na detecção de bactérias no interior dos canais radiculares. Afim de que uma das maiores falhas para o insucesso do tratamento de canal é permanência do biofilme bacteriano dentro dos canais.

### **OBJETIVOS:**

Avaliar clinicamente o efeito da aplicação de dois fluoróforos na visualização do biofilme endodôntico de *Enterococcus faecalis*.

### **MATERIAL E MÉTODO:**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa UFRGS número 34070, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

#### *Preparo e seleção dos dentes:*

Dezoito dentes incisivos inferiores permanentes bovinos maduros, de canal único, foram coletados para este estudo. A coleta ocorreu no Frigorífico Gassen de Santa Cruz do Sul. Estes foram coletados e armazenados em água destilada até serem usados, para que depois ocorresse a seleção dos mesmos.

Os critérios de inclusão foram: canais predominantemente retos, os quais possuíam diâmetros similares e que apresentavam ápices desenvolvidos por completo. Os critérios de exclusão foram: dentes com presença de reabsorções dentárias, fraturas de um modo geral, bifurcação dos canais radiculares, calcificações pulpares e dilacerações apicais.

Com as amostras selecionadas, foi realizada a limpeza externa dos dentes por meio de raspagem radicular, com cureta periodontal tipo Gracey nº 13/14 (Hu-Friedy, Rio de Janeiro, Brasil) para promover a remoção do ligamento periodontal remanescente que se encontra aderido às raízes dos dentes.

Após, os dentes foram descoronados, ou seja, suas coroas foram removidas abaixo da junção amelocementária, perpendicular ao longo eixo do dente com o auxílio de um disco diamantado dupla face (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, São Paulo, Brasil) em baixa rotação (NSK, Joinvilli, Santa Catarina, Brasil), assim todas as raízes permaneceram com o mesmo comprimento de 16mm. Também em baixa rotação e com o mesmo disco

diamantado, foram realizados sulcos no sentido longitudinal nas faces vestibular e lingual das amostras, de forma que o interior do canal radicular não fosse atingindo para que posteriormente as raízes fossem separadas em duas partes.

Para o preparo dos dentes utilizamos: hipoclorito de sódio a 2,5% (Soda Clorada Asfer 2,5%, Dental Marc, Caxias do Sul, Brasil), EDTA trissódico 17% (Iodontec Indústria e Comércio de Produtos Odontológicos Ltda, Porto Alegre, Brasil), água destilada (Asfer, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil), cera utilidade new wax u (Technew Comércio e Indústria Ltda, Quintino Bocaiuva, RJ, Brasil), limas tipo K 21mm calibre 30 (Maillefer Dentsply, Catanduva, SP, Brasil). Previamente ao preparo foi procedida a exploração dos canais das amostras. Os canais foram explorados com limas tipo k calibre 30, posteriormente, colocamos uma porção de cera utilidade na região correspondente a apical de cada dente buscando vedamento apical. Os dentes foram dispostos em uma morsa com recipiente disposto embaixo para descarte de água e resíduos orgânicos. As faces vestibular e lingual com os sulcos longitudinais ficaram presas perpendicularmente aos dentes da morsa.

Para a desinfecção dos canais, foi utilizado um protocolo adaptado de Grundling et al (2011). O inserto ultrassônico Helse E1 Irrisonic (Helse, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil) foi posicionado a 3mm do comprimento de trabalho, sendo ativado na potência de um terço do equipamento Ultrassom Mini Endo II (SybronEndo, São Paulo, São Paulo, Brasil), o qual se iniciou com irrigação com água destilada e ativação por 3 segundos, logo após irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% e ativação por 3 segundos sem água, irrigação com água destilada e ativação por 3 segundos, EDTA trissódico a 17% e ativação por 3 segundos sem água. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Por fim, foi realizada lavagem final com água destilada.

Para facilitar o manuseio das amostras, estas foram posicionadas em frascos de eppendorf de 1,5 ml (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com a porção correspondente a cervical para cima. Nas tampas safe lock dos frascos eppendorf, foi realizado um pequeno orifício para posicionar os dentes. Em seguida, o conjunto contendo os frascos eppendorf fechados com os dentes posicionados foi revestido com micropore (Fita Micropore Bege Nexcare de 25MM X 1,35M, Sumaré, SP, Brasil), com objetivo de diminuir a contaminação.

Na lateral foi marcado com caneta permanente o local dos dois orifícios para que a troca do meio de cultura de BHI pudesse ser realizada. Assim, foram posicionados em caixas de propileno (Cralplast, Cotia, SP, Brasil), embaladas individualmente em embalagens para autoclave (Hospflex, Sorocaba, São Paulo, Brasil) e posteriormente esterilizados em autoclave (Vitale 12- Cristófoli, Curitiba, Paraná, Brasil). O tempo de esterilização das amostras ocorreu em um ciclo de 40 minutos à temperatura de 126° C e 20 psi de pressão.

#### *Controle de Esterilização:*

Antes de iniciar a inoculação das amostras, as mesmas passaram pelo teste de esterilidade, em que cones de papel absorventes (Diadent, São Paulo, Brasil) estéreis foram molhados em solução salina e introduzidos dentro do canal radicular realizando movimentos suaves para que o maior número de paredes pudesse ser tocado. Este cone de papel foi transferido para um tubo de 3ml de BHI, incubados a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas, esse processo foi realizado em todos os dentes das amostras. Não havendo crescimento bacteriano no caldo, as amostras seguiam para a próxima etapa do experimento. Se notássemos crescimento seria realizada nova autoclavagem e o procedimento, também, seria repetido.

#### *Crescimento Bacteriano e Infecção do Canal Radicular*

*Enterococcus faecalis* é a cepa bacteriana selecionada para este experimento. Estas foram cultivadas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul em meio BHI contendo 17,5 g/L infuso cérebro-coração, 10,0g/L peptona, 5,0 g/L cloreto de sódio, 2,5 g/L fosfato dissódico, 2.0 g/L glicose, a 37° durante 24horas (PUC-RS).

A cada 48horas, realizava-se a troca do meio de cultivo, com auxílio de agulhas 0,80 x 25mm (BD, Curitiba, PR, Brasil) e seringas descartáveis luer lock de 5ml (Injex, Ourinhos, SP, Brasil). A maior parte do caldo BHI que estava contido nos tubos frascos de eppendorf era removido através dos orifícios laterais e desprezado. Em seguida, um novo meio de cultivo era inserido no seu interior pelos mesmos orifícios laterais, e incubados novamente em estufa a 37°C por 48 horas, até nova troca por um período de 29 dias. As trocas foram

realizadas dentro da capela de fluxo laminar, a fim de que todas as amostras fossem manipuladas em condições assépticas.

#### *Gram das amostras:*

A fim de que se tenha maior controle da contaminação dos dentes, semanalmente durante a troca de meio de cultivo uma gota do material coletado do interior dos frascos eppendorf era disposto em placa ágar sangue (Laborclin, Pinhais, Parana, Brasil) conforme os grupos, e levados à estufa a 37°C por um período de 48 horas para coleta e análise de Gram.

Dessa forma, após crescimento bacteriano na placa, com auxílio de uma alça bacteriológica esterilizada parte da colônia era coletada e espalhada em uma placa com solução salina estéril, a mesma foi passada no calor três vezes com o objetivo de fixar o esfregaço. Em seguida, as placas foram cobertas por violeta genciana durante um minuto, após esse tempo a solução foi removida da placa e aplicado lugol para que o corante fosse fixado, por um minuto, depois aplicado álcool-acetona e feita lavagem final com água. Por fim, foi colocado corante vermelho safranina sobre a lâmina por trinta segundos, após lavada e colocada sobre uma folha de papel. Com as lâminas secas, as mesmas foram observadas no microscópio óptico com objetiva de imersão (100X).

Na terceira semana de troca de meios, por meio da análise do gram, constatou-se que 8 amostras presentes em uma das caixas foram contaminadas com *Staphylococcus*, após a confirmação microscópica essas amostras tiveram que ser excluídas do estudo. Além disso, durante a clivagem dos dentes, uma amostra do estudo foi perdida.

#### *Grupos Experimentais:*

Devido a contaminação das amostras, restaram 10 dentes para o estudo e os mesmos foram divididos em grupos:

**C:** Calceína (n=3): amostras inoculadas com *Enterococcus faecalis* e observadas com luz UV e Calceína (Sigma, San Luis, Missouri, Eua) como fluoróforo.

**QP:** Qubit Protein (n=3): amostras inoculadas com *Enterococcus faecalis* e observadas com luz UV e Qubit Protein Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) como fluoróforo.

**CN:** Controle Negativo (n=3): amostras não foram inoculadas. Foram observadas com luz UV e Qubit Protein Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) como fluoróforo.

#### *Avaliação Clínica:*

Após 29 dias de contaminação, os dentes foram removidos dos frascos eppendorf e seccionados em duas partes, por meio dos sulcos longitudinais. O equipamento utilizado para avaliação clínica das amostras foi o sistema ReVeal (Design for Visions, New York, USA) (Figura 1) que consistem em uma lupa de 2,5x de aumento, com fotóforo Ultra Violeta 450nm de comprimento de onda.



Figura 1 – Lupas com magnificação 2,5x e fotóforo UV 450nm (ReVeal, Design for Visions, New York, USA)

## **RESULTADOS:**

Constatou-se que tanto a Calceína como Qubit Protein possuem relevância e funcionam como bons fluoróforos, sendo possível mapeá-los. Comparando ambos, observou-se maior espalhamento de imagem na Calceína (Figura 3) e além disso, mostrou-se mais fluorescente. Já o Qubit Protein, possui mais

precisão e delimita melhor o espaço do canal radicular (Figura 4). Também, observou-se que o grupo Controle Negativo, não teve fluorescência (Figura 2), concluindo, assim, que os fluoróforos não brilham e não emitem fluorescência quando não há presença de bactérias no interior do canal radicular.

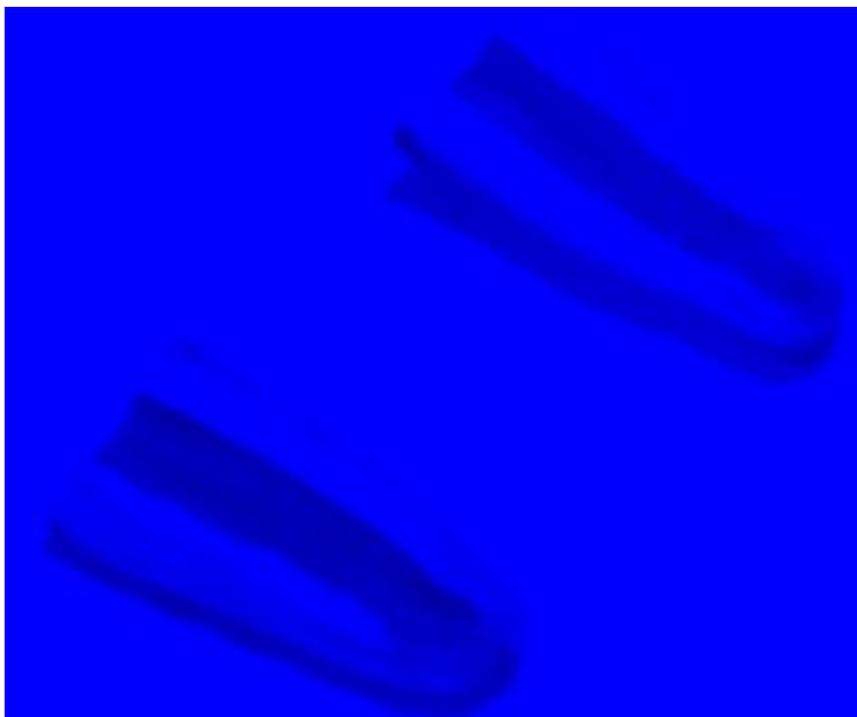


Figura 2. Grupo Controle Negativo – ausência de fluorescência

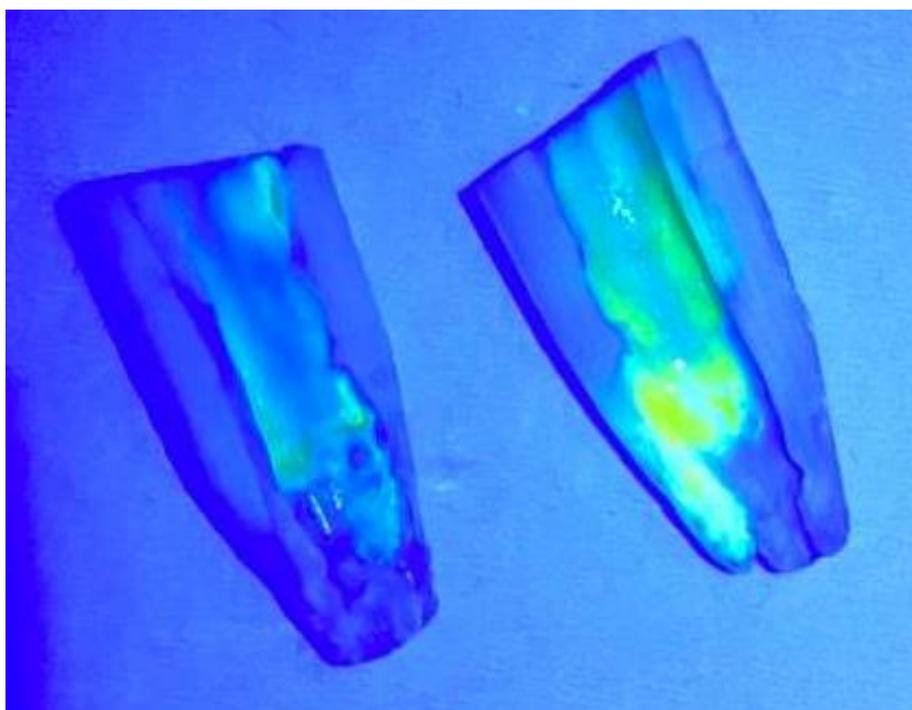


Figura 3. Grupo Calceína – fluorescência em alto brilho e com espalhamento de imagem



Figura 4. Grupo Qubit – menor brilho, mas com definição de ocupação de imagem dentro do canal radicular, sem espalhamento.

## DISCUSSÃO

Já está bem definido que a doença endodôntica é uma infecção na qual o mediador é o biofilme (Ricucci e Siqueira, 2010). Temos como as bactérias a principal causa da periodontite apical. Portanto, a eliminação de biofilmes bacterianos é essencial para o sucesso do tratamento endodôntico (Bukhary e Balto, 2017). O número de casos de infecções periapicais persistentes ocasionadas pela sobrevivência de bactérias no interior do sistema de canais radiculares, sob forma de biofilme ainda é relevante (Ward et al., 1992). Assim sendo, o principal agente etiológico de todas as lesões periapicais é considerado bacteriano (Nair et al., 1987).

A opção da utilização de dentes bovinos, se deu devido à semelhança na morfologia com os dentes humanos. A disponibilidade dos mesmos em quantidade e em idades similares, permitindo a padronização das amostras, faz dos dentes bovinos uma alternativa robusta para pesquisas odontológicas. (CAMPOS et al, 2008)

A fluorescência tem grande importância para avaliação laboratorial e clínica de complexos materiais e misturas, incluindo o biofilme. Os seus princípios podem ser aplicados diretamente a dispositivos que usam a fluorescência para

melhorar o diagnóstico e atendimento clínico na detecção e visualização da presença de bactérias. Além disso, possui aplicações específicas na detecção de bactérias, devido os derivados de porfirinas. (Shakibaie *et al*, 2018)

De acordo com Ku e colaboradores (2019), alguns microrganismos orais são capazes de sintetizar altos níveis de porfirina fluorescente, exibindo autofluorescência na região espectral vermelha. Dessa forma, fraturas radiculares, por exemplo, podem ser detectadas por meio da autofluorescência de forma que quanto mais profunda a fratura, mais bactérias anaeróbias estão presentes e conseqüentemente maior a produção de vitamina k e hemina, assim maior a fluorescência vermelha, devido presença de porfirinas.

O *Enterococcus faecalis* é caracterizado por ser um patógeno oportunista, na qual a sua permanência no interior do canal radicular reflete um problema terapêutico significativo (Evans *et al*, 2002). *Enterococcus faecalis* não sintetizam porfirinas (Frankenberg *et al.*, 2002), assim para o presente estudo foi necessária a utilização de fluoróforos, pois as amostras não apresentariam autofluorescência, devido a essa característica da cepa bacteriana de escolha.

Diante do experimento, a Calceína, mostrou-se um potente fluoróforo. Segundo Herzog e colaboradores (2017), diante de alguns corantes fluorescentes, a calceína é o mais adequado em detectar bactérias em um biofilme maduro e nutricionalmente estressado. Outro fluoróforo testado na pesquisa foi Qubit Protein (Kuo *et al.*, 2019), na literatura não foi encontrada referências na utilização do mesmo em biofilmes endodônticos, reforçando assim a necessidade de mais estudos e pesquisas para comprovar a eficácia desse fluoróforo.

Derivados de porfirina geram emissões vermelhas visíveis de locais contaminados com bactérias, enquanto os locais de tecidos saudáveis que estão livres de bactérias não possuem tal fluorescência, sendo direção chave para trabalhos futuros (Shakibaie *et al*, 2018).

Na endodontia, a fluorescência pode ser um importante recurso de diagnóstico, pois permite identificar bactérias presentes nos canais radiculares durante e após um tratamento endodôntico. Estas estão associadas a alguns casos de infecções persistentes, resultando em insucesso e na necessidade de reintervenção ou, até mesmo, extração. Atualmente, não existe um método

padronizado em uso para detectar a presença de bactérias nos canais. (Herzog *et al.*, 2017). Contudo, a utilização da fluorescência surge como recurso com potencial para minimizar infecções persistentes, o que reduziria os custos do tratamento e evitaria uma visita secundária desnecessária quando nenhuma bactéria fosse detectada. Essa tecnologia pode ser aplicada em diversas especialidades odontológicas, tanto clinicamente como em pesquisa (Shakibaie *et al.*, 2018).

Os resultados do presente estudo permite ensejar objetivos futuros. No que concerne à fluorescência, novos fluoróforos podem ser confrontados com os utilizados no presente estudo. A calceína poderia ser testada em diferentes concentrações, para reduzir o indesejado espalhamento de imagem. O espectro UV, com diferentes comprimentos de onda também poderiam ser comparados. Estes mesmos testes poderiam ser realizados em dentes infectados com bactérias anaeróbias.

Os efeitos biológicos da fluorescência poderiam ser testados in vivo com diferentes modelos animais. Os efeitos pré e pós tratamento endodôntico, se comprovada sua eficácia e segurança, podem evoluir para o uso em pacientes, como método de detectar bactérias no interior dos canais radiculares.

Podemos explorar o uso da fluorescência de diversas maneiras e em diversas áreas, como em uso hospitalar para auxiliar no diagnóstico de câncer, ou seu uso em cirurgias. Espera-se que num futuro próximo, o uso dessa luz se difunda cada vez mais. Ansiamos evoluir o estudo para além de *E.faecallis*, englobando uma porção maior de microrganismos encontrados no biofilme endodôntico.

Esta é uma linha de pesquisa que tem tudo para trazer luz à Endodontia, contribuindo para a teragnóstica, ou seja, a adoção de medidas terapêuticas ao mesmo tempo que se obtém o diagnóstico da infecção endodôntica.

### **CONCLUSÃO:**

De acordo com o presente estudo, tanto a Calceína como o Qubit Protein mostraram-se bons fluoróforos para visualização de *Enterococcus faecalis* juntamente com luz UV.

A calceína apresentou maior luminosidade, porém com espalhamento de

luz. O Qubit Protein apresentou luminescência uniforme sem espalhamento de imagem.

## REFERÊNCIAS:

Buchalla, W.; Lennon, A.M. Attin T. Comparative fluorescence spectroscopy of root caries lesions. *European Journal of Oral Sciences.*, v. 112, n.6 p. 490-496, 2004.

Bukhary, S.; Balto, H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Journal of Endodontics.*, v.43, n. 4, p. 643–647, 2017.

Evans, M.; Davies, J.K. Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal.*, v.35, n.3, p.221-228, 2002.

Fornari, V.J. *et al.* Histological evaluation of the effectiveness of increased apical enlargement for cleaning the apical third of curved canals. *International Endodontic Journal.*, v.43, p.88-94, 2010.

Frankenberg *et al.*, *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. *Journal of Bacteriology.*, v.184, n.22, p. 6351-6356, 2002.

Fyrestam, J. *et al.* Determination of porphyrins in oral bacteria by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, v.407, n.23, p.7013-7023, 2015.

Gründling, G. L. *et al.* Effect of Ultrasonics on *Enterococcus faecalis* Biofilm in a Bovine Tooth Model. *Journal of Endodontics.*, v.37, p. 1128-1133, 2011

Herzog, D. B. *et al.* Bacterial Detection during Endodontic Treatment. *Journal of Dental Research.*, v.96, n.6, p. 626-632, 2017.

Hoffman, R. M. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *J Gen Virol.*, v.5, p.796-806, 2005.

Jhamb, S. *et al.* An in vitro determination of antibacterial effect of silver nanoparticles gel as an intracanal medicament in combination with other medicaments against *Enterococcus fecalis*. *Journal of Conservative Dentistry.*, v.21, n.5, p. 485-490, 2018.

Jia, K.; Ionescu, R.E. Measurement of Bacterial Bioluminescence Intensity and Spectrum: Current Physical Techniques and Principles. In: Thouand G, Marks R.

Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology.,v. 3, p. 25-51, 2015

Takehashi, S.; Stankey, H.; Fitzgerald, R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

König, K. *et al.* In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins. *J Photochem Photobiol.* v.18, n.2, p. 287-290, 1993.

Ku, H. *et al.* Using autofluorescence to detect bacterial contamination in root fractures. *Journal of Dentistry.* V. 86, p. 27-32, 2019.

Kuo, H. *et al.*, Negligible-cost and weekend-free chemically defined human iPSC culture. *Stem Cells Report.* 2020.

Kumar, L.; Cox, C.; Sarkar, S. Matrix metalloprotease-1 inhibits and disrupts *Enterococcus faecalis* biofilms. *Plos One.*, v.14, n.1, p.1-18, 2019.

Kurihara, E. *et al.* . Detection of subgingival calculus and dentine caries by laser fluorescence. *Journal of Periodontal Research.*, v. 39, n.1, p. 59-65, 2004.

Lashkari, S. H. *et al.* Introduction of 5-aminolevulinic acid as a theranostics agent in dentistry. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.*, v.25, p. 336-343, 2019.

Lee, M. *et al.* Fluorescence change of *Fusobacterium nucleatum* due to *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Microbiology.*, v.56, n.9, p. 628-633, 2018.

Molander, A. *et al.* Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal.*, v.31, n.1, p.1-7, 1998.

Moller, Å. J. *et al.* Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.*, v.89, n.6, p. 475-484, 1981

Nogales, A. *et al.* A Novel Fluorescent and Bioluminescent Bireporter Influenza. *Journal of Virology.*, v.93, n.10, p.1-18, 2019.

Robertson, L.A. Beijerinck and the bioluminescent bacteria— microbiological experiments in the late 19th and early 20th centuries. *FEMS Microbiology Ecology.*, v.75, p. 185–194 , 2011.

Ricucci, D.; Siqueira, J. F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endodontic.*, v.36, p.77-88, 2010.

Shakibaie, F. *et al.* Application of Fluorescence Spectroscopy for Microbial Detection to Enhance Clinical Investigations. *Intech Open.*,v.10, p. 226-249, 2018

Steier, L. Reveal: Fluorescence Enhanced Theragnosis by Designs for Vision. *Eur J Dent.*, v.14, n.1, p. 186–188, 2020.

Volgenant, C. M. C. *et al.* Red and green fluorescence from oral biofilms. *PLoS ONE.*, v.11, n.12, p.1-14, 2016.

Walsh, L. J.;Shakibaie, F. Ultraviolet-induced fluorescence: shedding new light on dental biofilms and dental caries. *Australasian Dent Pract.*, v.18, n.6, p.56-60, 2007.

Ward, K. H. *et al.* Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *Journal of Medical Microbiology.*, v.36, p. 406-13,1992.

Zilm, P. *et al.* D-Amino acids reduce *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro and in the presence of antimicrobials used for root canal treatment. *PLoS ONE.*,v.12, n.2, p.1-15, 2017.