

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG - MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Cristiane Ferreira Alfenas

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA
SOBRE BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* NO SISTEMA DE
CANAIS RADICULARES: ESTUDO *IN VITRO***

Juiz de Fora

2012

CRISTIANE FERREIRA ALFENAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA TERAPIA FOTODINÂMICA
SOBRE BIOFILME DE *Enterococcus faecalis* NO SISTEMA DE
CANAIS RADICULARES: ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius Queiróz de Paula

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Mara Soares Bazzoli

JUIZ DE FORA

2012

Alfenas, Cristiane Ferreira.

Atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares: estudo *In Vitro* / Cristiane Ferreira Alfenas. – 2012.

99 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica)-
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Endodontia. 2. Fotoquimioterapia. 3. Laser. I. Título.

CDU 616.314.18

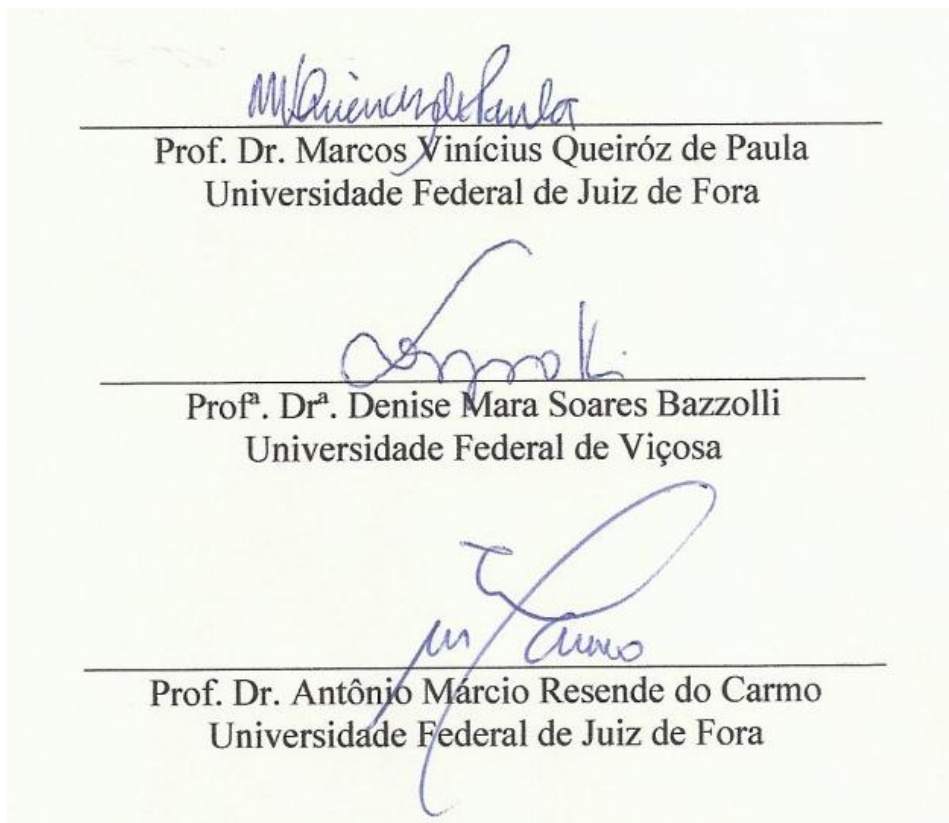
Cristiane Ferreira Alfenas

Atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares: estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos Vinícius Queiróz de Paula
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Denise Mara Soares Bazzolli
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Antônio Márcio Resende do Carmo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta dissertação aos meus pais pelo amor e a atenção dispensada ao longo de toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia, Antônio Márcio Resende do Carmo, pela excelência técnica, científica e estrutural disponibilizada para realização do curso de graduação e pós-graduação em Odontologia.

À coordenadora do curso Pós-Graduação representada pela professora Maria das Graças Afonso Miranda Chaves pela confiança em mim depositada quando da autorização para freqüentar o curso.

Ao meu orientador, Marcos Vinícius, por todo incentivo, apoio e compreensão. Minha eterna admiração pelo exemplo de competência, seriedade e dedicação à profissão.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli pela enorme paciência e orientação microbiológica fundamental para execução desta pesquisa.

Ao professor e amigo Leonardo Lopes Bhering pela ajuda na análise estatística.

Ao professor Celso Neiva Campos pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo e apoio durante todo o mestrado.

Ao grupo de professores da Endodontia: Antônio Márcio, Celso, Anamaria e Wagner pela amizade e colaboração em todos os momentos que precisei.

Aos colegas de pós-graduação, Liza, Bernardo, Mariane, Débora, Isabela e Patrícia Coelho pelo companheirismo que construímos ao longo deste curso.

À Jaqueline pela enorme ajuda durante a etapa laboratorial.

À toda equipe que trabalha no laboratório de Genética Molecular de Microorganismos que por muitos dias dividimos a capela de fluxo laminar. A disposição para pesquisa desta equipe foi um estímulo fundamental no decorrer desta etapa experimental.

À Karla pela paciência durante a etapa da microcopia eletrônica de varredura.

À Wanessa Alonso pela atenção e bons momentos de convivência.

À minha amiga Mônica por todos os momentos de colaboração e companheirismo.

Aos meus pais, irmãos e familiares, pela vibrante torcida em todas as fases da minha vida.

Ao Bruno pelo amor, carinho, pela dedicação e por aceitar todas as minhas decisões. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

E, principalmente, a Deus por permitir realizar mais este sonho.

“PODE-SE VIVER NO MUNDO UMA VIDA MAGNÍFICA
QUANDO SE SABE TRABALHAR E AMAR.... TRABALHAR
PELO QUE SE AMA E AMAR AQUILO EM QUE SE TRABALHA”

TOLSTOI

RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica (PDT) no sistema de canais radiculares, utilizando diferentes concentrações do fotossensibilizante azul de toluidina e doses do laser, sobre biofilme de *Enterococcus faecalis*, ATCC 51299. Foram utilizados 42 dentes extraídos de humanos, unirradiculares e os canais foram devidamente preparados, instrumentados pela técnica de instrumentação rotatória. Os dentes foram autoclavados e os canais inoculados com uma suspensão conhecida de *Enterococcus faecalis* foram incubados por 21 dias. Os espécimes submetidos à PDT, utilizando combinações com diferentes concentrações do fotossensibilizante azul de toluidina (TBO) (0.5, 5 e 10µg/ml) e tempos de irradiação (60, 120, 300 e 600s) equivalentes a doses de energia 6, 12, 30 e 60J, utilizando uma fibra óptica intracanal e irradiação com o laser de diodo (AsGaAl) a 100mW. Os controles, positivo e negativo, não receberam nenhum tipo de tratamento. Amostras do conteúdo intracanal foram coletadas com cone de papel esterilizado, antes e após os respectivos tratamentos e submetidos à cultura contendo ágar BHI. Para determinar o número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Os dados obtidos na análise microbiológica (UFC/mL) foram analisados por meio da análise de variância e teste de Tukey. E para confirmar a formação de biofilme, dois espécimes de cada grupo foram selecionados e analisados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). As combinações de TBO 0.5µg/ml e 600s e 5µg/ml e 10µg/ml em todos os tempos de irradiação testados resultaram em significativa redução dos micro-organismos, sendo que a combinação TBO 5µg/ml e 600s apresentou significativamente a maior porcentagem de redução. Foi possível concluir que a utilização da PDT com o fotossensibilizante TBO e irradiação com laser de baixa potência apresenta ação antibacteriana significativa sobre biofilme de *Enterococcus faecalis*, sendo uma terapia promissora frente aos micro-organismos persistentes ao tratamento endodôntico convencional.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, laser, *Enterococcus faecalis*, endodontia

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate *in vitro* antimicrobial activity of Photodynamic Therapy (PDT) in the root canal system, using different concentrations of photosensitizer toluidine blue (TBO) and laser doses on biofilms of *Enterococcus faecalis*, ATCC 51299. Used 42 extracted human teeth, single-rooted and the canals prepared to rotary instrumentation. The teeth were autoclaved and canals inoculated with a suspension *Enterococcus faecalis* in brain heart infusion and were incubated for 21 days. The specimens were subjected to PDT using combinations with different concentrations of the photosensitizer TBO (0.5, 5 and 10µg/ml) and irradiation times (60, 120, 300 and 600s) equivalent to doses of energy 6, 12, 30 and 60J, using an optical fiber intracanal and irradiation with diode laser (GaAlAs) to 100mW. The controls groups no treatment. Before and after the respective treatments the canal contents were sampled with sterilized paper points, the sample was dispersed in transport medium, serially diluted and culture on blood agar to determine the number of colony forming units per mL (CFU / mL). The data obtained in the microbiological analysis (CFU / mL) were analyzed by analysis of variance and Tukey test. And to confirm biofilm formation, two specimens of each group were selected and analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Combinations of TBO 0.5µg/ml and 600s and TBO 5µg/ml, 10µg/ml and in all irradiation times tested resulted in significant reduction of micro-organisms but the combination TBO 5µg/ml and 600s showed significantly higher percentage of reduction. It was concluded that the use of PDT with the photosensitizer TBO and laser irradiation low power presents significant antibacterial action on biofilm of *Enterococcus faecalis*, is a promising therapy in the face of persistent micro-organisms to conventional endodontic treatment.

Keywords: Photodynamic Therapy, Laser, *Enterococcus faecalis*, endodontics

ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição dos grupos controle (A) e dos grupos experimentais (B) em placas de cultura de células contendo 48 micropoços	52
Figura 2 – Equipamento Photon Lase III (DMC) – laser de diodo de baixa intensidade	54
Figura 3 – Fibra óptica (DMC)	54
Figura 4 – Preenchimento dos canais com azul de toluidina 5µg/mL	55
Figura 5 – Irradiação laser com fibra óptica intracanal	55
Figura 6 – Crescimento de colônias em meio Agar BHI. Plaqueamento por pour plate, alíquota de 0,1mL	59
Figura 7 – Clivagem dos espécimes para posterior visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	60
Figura 8 – Avaliação dos controles experimentais	62
Figura 9 – Sobrevivência bacteriana a diferentes tratamentos realizados a partir das contagens antes e depois dos tratamentos	64
Figura 10 – Representação gráfica das médias de redução de UFC/mL, no tempo 2, ao nível de significância de 5% por meio do teste de Tukey	64
Figura 11 – Representação gráfica das médias das porcentagens de redução de UFC/mL, desvio padrão e análise estatística entre os grupos. Barras representadas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% por meio do teste de Tukey	65
Figura 12: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular com biofilme de <i>Enterococcus faecalis</i> (A - controle negativo; B – controle positivo)	66

- Figura 13: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos grupos que apresentaram redução bacteriana significativa (A – grupo 6, B – grupo 6, C – grupo 7, D – grupo 7, E – grupo 8, F – grupo 8) 67
- Figura 14: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos grupos que apresentaram redução bacteriana significativa (A – grupo 9, B – grupo 9, C – grupo 10, D – grupo 10, E – grupo 11, F – grupo 11) 68
- Figura 15: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos grupos que apresentaram redução bacteriana significativa (A – grupo 12, B – grupo 12, C – grupo 13, D – grupo 13, E – grupo 14, F – grupo 14) 69
- Figura 16: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos grupos que não apresentaram redução bacteriana (A – grupo 3, B – grupo 4 e C – grupo 5) 70

TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais e parâmetros utilizados para realização da Terapia Fotodinâmica	57
Tabela 2 – Médias iniciais e finais das populações de <i>E. faecalis</i> presentes nos espécimes avaliados em valores exponenciais (número), médias das porcentagens de redução (%) e desvio padrão (DP) dos grupos experimentais, incluindo os grupos controles	63

SIGLAS

AsGa	Arseneto de Gálio
AsGaAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain heart infusion (infusão cérebro coração)
°C	Graus centígrados
cm ²	cm ² – centímetro quadrado
E	Energia
Endo-PTC	Peróxido de Uréia, tween 80 e carbowax associados
Er:YAG	Érbio-Ítrio-Arsênio-Gálio
ErCr:YSGG	Érbio-Crômio-Ítrio-Escândio-Gálio-Garnet
He-Ne	Hélio – Neônio
Ho:YAG	Hólmio-Ítrio-Arsênio-Gálio
Hz	Hertz
LASER	<i>Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation</i>
LED	Emissor de luz de diodo
log	Logarítimo
IGaAlP	Fosfeto de Índio Gálio Alumínio
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mm	Milímetro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
min	Minuto
mW	Miliwatt
mW/cm ²	MiliWatts por centímetro quadrado
Nd: YAG	Granada de ítrio-alumínio com neodímio
n°	Número
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Nd:YAG	Neodímio-Ítrio-Arsênio-Gálio
nm	Nanômetro

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
P	Potência
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i> , terapia fotodinâmica
pH	Medida de acidez ou alcalinidade de uma solução
UFC	Unidade formadora de colônia
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
TBO	Azul de toluidina
W	Watts
YAG	Ítrio, alumínio, granada
%	por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 – Infecção endodôntica e <i>Enterococcus faecalis</i>	20
2.2 – Aspectos endodônticos na eliminação microbiana	27
2.3 – Laser e aplicação na Endodontia	32
2.4 – Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em canais radiculares	35
3 PROPOSIÇÃO	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Obtenção e caracterização da amostras	49
4.2 Preparo e instrumentação dos espécimes	49
4.3 Vedamento e impermeabilização externa das raízes	51
4.4 Inclusão em placas de poliestireno	51
4.5 Obtenção da suspensão de <i>Enterococcus faecalis</i>	52
4.6 Contaminação dos espécimes	53
4.7 Caracterização dos grupos experimentais	53
4.8 Condições de coleta das amostras	58
4.8.1 Coleta prévia ao tratamento	58

4.8.2 Coleta pós tratamento	59
4.9 Microscopia eletrônica de varredura	59
4.10 Análise estatística	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Avaliação da contagem das unidades formadoras de colônias	62
5.2 Avaliação ao microscópio eletrônico de varredura	66
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICES	88
ANEXOS	95
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	95
ANEXO B - Declaração do Banco de Dentes	96

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são os principais agentes etiológicos das infecções endodônticas sendo o controle e a eliminação desses micro-organismos importantes durante todo o tratamento endodôntico (AL- HEZAIMI et al., 2006; CARDOSO et al., 2008; DUNAVANT et al., 2006; MENEZES et al., 2004; SIQUEIRA JR.; UZEDA, 1996; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; ZOLETTI; SIQUEIRA JR.; SANTOS, 2006).

Os micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares podem colonizar os túbulos dentinários, canais acessórios, reentrâncias, istmos e deltas apicais dificultando a eliminação pela instrumentação, pelo uso de soluções irrigadoras e pela medicação intracanal. Apesar da efetividade de diversas substâncias irrigadoras e da medicação intracanal, ainda existem vários casos de insucesso (DUNAVANT et al., 2006).

Exemplo disso é a colonização de *Enterococcus faecalis* considerada uma das espécies mais resistentes e persistentes nas infecções endodônticas, que podem ser causadores de falhas em tratamentos endodônticos (BASRANI et al., 2004; DUNAVANT et al., 2006; GOMES et al., 2004; JOHNSON et al., 2006; LIM et al., 2009 RADCLIFFE et al., 2004; STUART et al., 2006). O *E. faecalis* é um micro-organismo anaeróbico facultativo, o qual consegue, muitas vezes, apresentar resistência aos agentes antimicrobianos além de diversos antibióticos. Isso pode ocorrer devido à capacidade dessa espécie de bactéria formar biofilme no canal radicular o que o torna altamente resistente aos antimicrobianos (DUNAVANT et al., 2006; STUART et al., 2006).

Exatamente por todas essas características e fatores de resistência é que o envolvimento de *Enterococcus* spp. está relacionado com os casos mais complicados, e os estudos em Endodontia se preocupam em empregar a espécie na avaliação de seus métodos. Estudos revelam que praticamente todos os casos radiograficamente identificados com periodontite apical possuem isolados de *E. faecalis* (JOHNSON et al., 2006).

As constatações clínicas aliadas ao conhecimento da literatura esclarecem que o insucesso pode ser justificado por falhas no processo de

limpeza e desinfecção (SIQUEIRA Jr., 2001). Além disso, a defesa do hospedeiro ou a administração sistêmica de agentes antimicrobianos não são acessíveis aos micro-organismos remanescentes dentro do sistema de canais radiculares (DUNAVANT et al., 2006; JOHNSON et al., 2006), por isso a necessidade de complementar a terapia endodôntica convencional com novas técnicas que aumentem a ação antimicrobiana.

O uso do laser na Endodontia foi relatado em 1971, por Weichman & Johnson, mas apenas recentemente o seu uso tem sido reconhecido e indicado. Algumas propriedades dos lasers de alta e os de baixa potência permitem seu uso na Endodontia. Tanto os lasers de alta como os de baixa potência, podem ter ações antimicrobianas muito eficazes. Sendo considerado na literatura como um eficiente coadjuvante na redução bacteriana intracanal (WALSH, 2003).

Os lasers de alta potência demonstram resultados promissores na descontaminação dos canais radiculares, no entanto, o aumento de temperatura, inerente ao processo, torna o procedimento criterioso devido à possibilidade de causar injúrias ao tecido adjacente (Wilson et al., 1996). Já os lasers de baixa potência requerem uma tecnologia menos complexa, além de serem mais compactos e com um custo reduzido, favorecendo seu uso na prática clínica (GARCEZ et al., 2003).

A literatura salienta para as vantagens do laser de baixa potência na eliminação microbiana do sistema de canais radiculares (GUTKNECHT et al., 2005), com a Terapia Fotodinâmica. Estudos têm demonstrado resultados satisfatórios, com os quais se consegue uma redução bacteriana significativa no sistema de canais radiculares (SEAL et al., 2002; GARCEZ, 2002; BONSOR et al., 2006; SOUKOS et al., 2006; WILLIAMS et al., 2006). No entanto, o laser de baixa intensidade só consegue ação bactericida se associado a um corante fotossensível (WILSON, 1994).

A utilização de uma fonte de luz específica, como o laser de baixa potência, associado a um corante com características fotossensibilizadoras, chamada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana ou PDT (Photodynamic Therapy), resulta em espécies reativas citotóxicas capazes de inviabilizar as

células (GARCEZ, et al., 2006; MACHADO, 2000). Dessa forma, os micro-organismos em contato com o corante tornam-se susceptíveis a luz a ser irradiada, a qual induzirá uma reação fotoquímica com formação de radicais livres e oxigênio singleto. Estes são os produtos responsáveis pela invasão e ruptura da parede celular bacteriana, levando a destruição do micro-organismo.

A PDT, aliada ao tratamento endodôntico convencional, pode ser uma ferramenta útil na redução microbiana intracanal, com a vantagem de ser seletiva, de fácil aplicação e não promover resistência bacteriana (ALFENAS et al., 2011). Entretanto a seleção e a concentração do corante, o tempo de pré - irradiação, o tempo de irradiação, a potência e o modo de operação do laser utilizados na terapia constituem variáveis, as quais não permitiram ainda estabelecer um protocolo ideal para o uso da Terapia Fotodinâmica.

Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que avaliem sua efetividade, utilizando-se diferentes parâmetros, visto que a PDT tem se mostrado um importante aliado na desinfecção do sistema de canais radiculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÃO ENDODÔNTICA E *Enterococcus faecalis*

Os micro-organismos são os principais agentes etiológicos das patologias pulpares e periapicais e do insucesso do tratamento endodôntico (AL-HEZAIMI et al., 2006; GOMES et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2000; SIQUEIRA e RÔÇAS, 2008). Embora vírus, leveduras e protozoários podem ser encontrados como constituintes da microbiota oral, as bactérias são os habitantes dominantes (SIQUEIRA e RÔÇAS, 2005).

De um total de mais de 500 espécies microbianas que colonizam a cavidade bucal, apenas um número restrito de aproximadamente 150 espécies de amostras dos canais radiculares foi relatado, geralmente em combinação de cinco a sete espécies diferentes, com grande prevalência de anaeróbios estritos, principalmente Gram-negativos (GOMES et al., 2004).

Nas infecções endodônticas primárias a presença de diversas espécies colonizando o sistema de canais radiculares determina a característica polimicrobiana desta condição, com predomínio de anaeróbios Gram-negativos. Nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, nas infecções endodônticas secundárias, há o envolvimento de poucas espécies, com colonização predominante de anaeróbios Gram-positivos (KARIM et al., 2007).

A demanda de oxigênio também determina a composição da microbiota endodôntica. Estudos sobre a dinâmica das infecções endodônticas mostram que existe uma relativa proporção de micro-organismos facultativos na fase inicial, em que o oxigênio está presente em grande quantidade nos tecidos. Com o início da necrose tecidual, a tensão de oxigênio diminui pela ausência de micro circulação e ocorre uma diminuição de bactérias anaeróbias facultativas com um aumento das bactérias anaeróbias estritas. Isto ocorre, principalmente, pelo aumento do consumo de oxigênio, criando condições restritas e sustentando o crescimento da microbiota anaeróbia estrita (MENEZES et al., 2004).

Embora seja fato consolidado na dinâmica da infecção endodôntica o favorecimento das espécies anaeróbias estritas, estudos na literatura mencionam que bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes à atividade dos antimicrobianos,

do que os anaeróbios estritos, o que favorece a persistência desses, mesmo após a terapia endodôntica (VIVACQUA-GOMES et al., 2005).

Os micro-organismos anaeróbios facultativos, como *Enterococcus* spp. podem permanecer em fase latente, com uma baixa taxa metabólica por um período de tempo, mas mudanças ambientais, como uma infiltração coronária, podem modificar as condições nutricionais e contribuir para a ativação destes micro-organismos e conseqüente proliferação dos mesmos (CHÁVEZ et al., 2003).

A presença de *Enterococcus faecalis* influencia o prognóstico do tratamento endodôntico, sendo associada a prognósticos pouco favoráveis. Os estudos evidenciam também a alta prevalência de cepas isoladas de *Enterococcus faecalis* em dentes com lesões perirradiculares associadas, sugerindo ser a espécie envolvida na patogênese das lesões recorrentes (ZOLETTI; SIQUEIRA; SANTOS, 2006).

Os *Enterococcus* são isolados de áreas do corpo ricas em nutrientes, mas pobre em oxigênio, como flora normal do trato gastrintestinal e cavidade oral. As espécies clinicamente importantes e mais freqüentemente isoladas são o *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, responsáveis por grande parte das infecções endodônticas (TORTORA, FUNKE e CASE, 2008).

Akpata e Blechman (1982) investigaram, *in vitro*, a invasão bacteriana no interior da dentina radicular. Quatorze dentes extraídos de humanos, unirradiculares, foram preparados, instrumentados e esterilizados. Uma suspensão bacteriana foi inoculada nos dentes e após incubação de 1, 2 e 3 semanas, foram realizados cortes transversais das raízes e avaliados histologicamente. Quanto maior o período de incubação, maior foi a invasão de *Enterococcus faecalis* nos túbulos dentinários. Até duas semanas, não houve contaminação dos túbulos dentinários no comprimento total da raiz. No entanto, em três semanas de incubação, os túbulos dentinários estavam densamente infiltrados por *Enterococcus faecalis*, tendo maior concentração no terço cervical, menos no terço médio e ainda menos no terço apical. Os resultados evidenciaram a relação existente entre tempo e invasão bacteriana, bem como, o modo de distribuição dos micro-organismos.

Fabricius et al. (1982) deixaram os canais radiculares de 24 dentes de três macacos, expostos à microbiota bucal e após seis meses foi possível observar a grande capacidade do *Enterococcus faecalis* de sobreviver como micro-organismo único, sem relação cooperativa com outras bactérias. Os autores também concluíram que bactérias anaeróbias estritas desempenham importante papel no desenvolvimento e manutenção de periodontite apical.

Haaspalo e Örstavik (1987) propuseram um modelo experimental *in vitro* para desenvolver infecção em túbulos dentinários. Blocos de dentina radicular bovina foram infectados com *Enterococcus faecalis* por três semanas e medicações intracanal a base de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado foram testados. Os autores observaram que a presença de cimento afetava a capacidade das células de *Enterococcus faecalis* infectar a dentina radicular, enquanto a ausência facilitava tal contaminação. Amostras bacteriológicas colhidas no interior dos canais revelaram cultura negativa após exposição às medicações testadas, porém amostras da dentina radicular desses mesmos espécimes revelaram infecção pela bactéria testada. Os resultados indicaram que culturas negativas provenientes de amostras colhidas do canal não significam ausência de micro-organismos, podendo esses estarem alojados no interior dos túbulos dentinários.

Nair et al. (1990) estudaram a presença de bactérias e fungos nos canais radiculares. Foram utilizados nove dentes humanos apicectomizados assintomáticos e resistentes ao tratamento endodôntico. A maioria dos dentes revelou presença de micro-organismos no terço apical, contendo uma ou mais espécies e dois revelaram a presença de fungos. Os autores concluíram que micro-organismos podem resistir à terapia convencional e desempenhar um papel significativo no fracasso do tratamento.

Örstavik e Haaspalo (1990) testaram o efeito de duas substâncias irrigadoras, hipoclorito de sódio e EDTA, em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sanguis* e *Escherichia coli*. O *Enterococcus faecalis* persistiu por, pelo menos, 10 dias após a supressão de nutrientes enquanto os outros micro-organismos perderam a viabilidade entre 4 e 48 horas.

Baumgartner e Falker Jr. (1991) avaliaram a presença de bactérias nos cinco milímetros apicais de canais radiculares infectados de 10 dentes extraídos, com exposição pulpar por cárie ou lesão periapical e a presença de dor era comum em todos eles. Os dentes foram extraídos e, imediatamente, armazenados em tubo de ensaio esterilizado. Após análise microbiológica cinquenta cepas de bactérias foram isoladas e identificadas. As bactérias encontradas em maior número foram: *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacilos*, *Peptoestreptococcus*, *Streptococcus mutans* e *Veilonella*. A presença de bactérias anaeróbias nos cinco milímetros apicais dos canais infectados foi predominante.

Sjögren et al. (1997) investigaram o papel da infecção endodôntica no prognóstico de 55 dentes unirradiculares, com necrose pulpar e evidência radiográfica de lesão periapical. Os dentes foram instrumentados e irrigados com hipoclorito de sódio a 0,5%. Amostras bacteriológicas foram colhidas antes e após a instrumentação dos canais. Em seguida, os dentes foram obturados na mesma sessão. Nos resultados observou-se que todos os dentes estavam infectados antes da instrumentação e que após a instrumentação houve uma redução das espécies bacterianas em 22 dentes. Os pacientes foram acompanhados clínica e radiograficamente por um período de 5 anos. Nos dentes que apresentaram cultura negativa após a instrumentação a completa formação óssea ocorreu em 94% e nos casos onde a cultura foi positiva após a instrumentação, o sucesso ocorreu em 68% dos casos. Os autores enfatizaram a importância da completa eliminação bacteriana antes da obturação do canal, ressaltando que este objetivo pode não ser alcançado em tratamentos realizados em uma única sessão, sem a utilização de uma medicação antimicrobiana.

Sundqvist et al. (1998) selecionaram 54 dentes com lesões persistentes para retratamento. A proposta deste estudo foi determinar o tipo de flora microbiana presente antes e depois do retratamento. Amostras no interior dos canais foram coletadas: uma amostra na primeira consulta após a remoção do material obturador, três amostras na segunda sessão e a última amostra antes da obturação do dente. A microbiota oral predominantemente encontrada foi de bactérias Gram-positivas, sendo *Enterococcus faecalis* a espécie mais encontrada nos casos de insucesso. Os autores associaram essa elevada incidência do *Enterococcus faecalis* à resistência aos medicamentos antimicrobianos usados durante o tratamento e a capacidade de sobreviver em canais radiculares como micro-organismo único, em ambiente escasso de nutrientes.

Love (2001) investigou, *in vitro*, a sobrevivência e o crescimento do *Enterococcus faecalis* em túbulos dentinários. Culturas de *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* ou *Enterococcus faecalis* foram colocadas em meio BHI contendo diferentes concentrações de soro humano. Os resultados permitiram observar que o fator de virulência do *Enterococcus faecalis* pode estar relacionado à capacidade desta bactéria invadir túbulos dentinários e aderir ao colágeno na presença de soro humano. Concluiu que a capacidade dessa espécie, em causar alteração perirradicular e falha no tratamento endodôntico, se deve a sua habilidade de invadir túbulos dentinários e de permanecer viável dentro deles.

Peciulienė et al. (2001) avaliaram o papel das bactérias Gram-negativas e espécies de enterococos de 40 dentes de pacientes com lesões periapicais assintomáticas e a ação antimicrobiana da solução irrigadora iodeto de potássio. Os canais radiculares dos pacientes selecionados foram obturados entre 5 e 10 anos anteriores à pesquisa e as obturações consideradas, pelos autores, insatisfatórias. O retratamento endodôntico foi realizado em condições de assepsia e somente com uso de instrumentos manuais. Após primeira coleta microbiológica, os canais foram limpos e modelados com limas Hedström e irrigados com hipoclorito de sódio a 2,5% e solução de EDTA a 17% foi utilizada para irrigação final. Logo após o preparo químico-mecânico, novas amostras foram colhidas no interior dos canais com auxílio de pontas de papel absorvente. Os dentes foram divididos em dois grupos: A: 20 dentes receberam medicação intracanal com hidróxido de cálcio que permaneceu dentro do canal entre 10 e 14 dias, antes da obturação definitiva dos canais; B: 20 dentes foram irrigados com solução de iodeto de potássio por um período de 5 minutos, antes da obturação definitiva do canal. Uma terceira amostra microbiológica de todos os canais foi colhida antes da obturação final. A análise microbiológica da primeira coleta revelou a presença de fungos, bactérias Gram-negativas facultativas e espécies de enterococos. Na segunda amostra, ou seja, após o preparo químico-mecânico, observou-se a presença de bactérias facultativas e Gram-positivas anaeróbias. Após a coleta da terceira amostra, onde foi realizada a irrigação com iodeto de potássio, a análise microbiológica foi negativa. O *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana prevalente.

Siqueira Jr. e Lopes (2001) avaliaram a presença de bactérias na região apical dos canais radiculares de vinte e sete dentes extraídos apresentando lesão cariosa extensa, lesões radiolúcidas e lesões periapicais. Após a fixação, as lesões foram removidas e os cinco milímetros apicais de cada raiz foi seccionada. As pontas das raízes foram preparadas, desidratadas e examinadas ao microscópio eletrônico de varredura para verificar a presença de bactérias na superfície apical da raiz. Os resultados demonstraram presença maciça de bactérias próxima ao forame apical, restritas à região do canal radicular.

Chávez De Paz et al. (2003) investigaram o tipo de bactéria que se manteve no canal radicular após o preparo químico-mecânico de dentes com patologia periapical. Amostras foram colhidas de duzentos dentes com evidências clínicas e radiográficas de lesão periapical. Os achados bacteriológicos foram associados aos parâmetros clínicos e radiográficos considerando o estado do canal antes do tratamento: polpa

viva, necrosada ou canal obturado. Os resultados permitiram observar que bactérias Gram-positivas foram predominantemente encontradas.

Vivacqua-Gomes et al. (2005), em estudo sobre recuperação de *Enterococcus faecalis* após tratamento endodôntico em única ou várias sessões, além de observarem que não existe diferença na contagem da espécie entre os tipos de tratamento, relatou que após 60 dias de selamento do canal, o *Enterococcus faecalis* continua viável no interior dos túbulos dentinários.

Em 2006, Sedgley et al., utilizando os métodos de cultivo e PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real detectaram a presença de *Enterococcus faecalis* em 67,5% das amostras coletadas de infecções primárias e em 89.6% das 48 amostras coletadas de infecções refratárias. O *Enterococcus faecalis* foi mais prevalente quando baseado na técnica de PCR.

A habilidade do *Enterococcus faecalis* em formar biofilme e a sua resistência aos agentes antimicrobianos podem ser fatores que contribuem para sua persistência após o tratamento endodôntico, o que pode levar a falha da terapia instaurada (KISHEN; GEORGE; KUMAR, 2006). Além disso, o *Enterococcus faecalis* apresenta elevada taxa de sobrevivência, podendo permanecer viável por até 12 meses (JOHNSON et al. 2006).

Gilbert, Das e Foley (1997) em uma revisão de literatura esclareceram os mecanismos pelos quais os biofilmes bacterianos possuem resistência aos agentes antimicrobianos e antibióticos. Os autores relataram que, apesar de alguns aspectos da resistência do biofilme ainda não serem esclarecidos, acredita-se que os mecanismos dominantes estão relacionados a ambientes nutricionalmente modificados e à supressão do crescimento no interior da comunidade. O biofilme favorece as infecções recorrentes devido à sua baixa susceptibilidade aos antimicrobianos.

Costerton, Stewart e Greenberg (1999) definiram biofilme bacteriano como uma comunidade estruturada de células bacterianas, envolvida em uma matriz polimérica hidratada, aderida a uma superfície inerte ou viva. O modo de crescimento bacteriano confere a essas comunidades uma forma de crescimento protegido, que permite sua sobrevivência em ambientes com carência de nutrientes e alta resistência aos agentes antimicrobianos. Os autores ressaltaram que essa formação é encontrada na maioria das raízes com infecções bacterianas persistentes e crônicas e, devido ao crescimento lento, produz sintomas lentamente. Relataram, também, que as células bacterianas

desenvolvidas em uma superfície sofrem adesão, formam um biofilme e adotam um fenótipo diferente de sua célula planctônica.

Distel, Haston e Gillespie (2002) propuseram-se a avaliar a capacidade do *Enterococcus faecalis* de resistir às medicações intracanaís comumente utilizadas e de infectar, cronicamente, o sistema de canais radiculares, através da formação de biofilme. Quarenta e seis dentes anteriores superiores foram colonizados com *Enterococcus faecalis* e medicados com hidróxido de cálcio a fim de serem observados ao microscópio eletrônico de varredura e ao microscópio de varredura a laser confocal. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou colonização de todos os canais medicados com hidróxido de cálcio e do controle positivo, em dois dias. Após 77 dias, verificaram a formação de biofilme nos canais com medicação intracanal de hidróxido de cálcio. A microscopia de varredura a laser confocal mostrou a presença de colônias de *Enterococcus faecalis* viáveis nos canais medicados em 86 dias, e a presença de biofilme nos canais infectados após 160 dias. Esses resultados suportam a hipótese de que há formação de biofilme de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares com medicação intracanal.

Soukos et al. (2003) mencionaram que as principais hipóteses sobre a reduzida susceptibilidade do biofilme aos agentes antimicrobianos é a dificuldade de penetração, possibilidade de inativação do agente e existência de micro-organismos com crescimento lento ou em estado de repouso. Existem evidências de que o biofilme tende a resistir também às forças mecânicas de remoção, além de resistente às defesas específicas e não específicas do hospedeiro.

George, Kishen e Song (2005) examinaram a ultraestrutura do biofilme de *Enterococcus faecalis* formado no canal radicular e a penetração dele nos túbulos dentinários, em diferentes condições nutricionais e ambientais. No experimento, utilizaram 45 dentes hígidos sob condições de anaerobiose, aerobiose, riqueza de nutrientes e carência de nutrientes. Após 21 dias, os dentes analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura a laser confocal, microscopia eletrônica de varredura com energia dispersiva de Raios-X (EDX) e microscopia óptica. Em todas as condições testadas, o *Enterococcus faecalis* invadiu os túbulos dentinários, porém a profundidade de penetração dele nos túbulos foi significativamente maior no meio rico em nutrientes.

2.2 ASPECTOS ENDODÔNTICOS NA ELIMINAÇÃO MICROBIANA

O tratamento endodôntico busca romper o equilíbrio do ecossistema microbiano, através de agentes químicos em associação com técnicas mecânicas, com a finalidade de promover a desinfecção do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA et al., 2000).

A limpeza do canal radicular é alcançada pela instrumentação, irrigação e medicação intracanal. Todos esses procedimentos devem ser usados de forma combinada no tratamento (CARDOSO et al., 2008). Diversos autores consideram que infecções persistentes podem ser causadas por micro-organismos que invadiram os túbulos dentinários, antes ou durante o tratamento endodôntico. Nos canais infectados e nos retratamentos, os micro-organismos, principalmente o *Enterococcus faecalis* estão localizados na parede dos canais aderidos na forma de colônias ou de biofilme (TRONSTAD; BARNETT; CERVONE, 1990).

As áreas como istmos, deltas, ramificações, irregularidades e túbulos dentinários são locais complexos do sistema de canais radiculares. Essas áreas são dificilmente alcançadas pelos agentes antimicrobianos utilizados na terapia endodôntica convencional e representam um obstáculo na eficácia do tratamento endodôntico. A resistência a diversos medicamentos antimicrobianos usados na terapia endodôntica e a resistência ao hidróxido de cálcio, por suas características alcalino-tolerantes, são fundamentais no favorecimento da sobrevivência de *Enterococcus faecalis* após o tratamento endodôntico (DUNAVANT et al., 2006).

Byström e Sundqvist (1981) avaliaram a eficiência da instrumentação mecânica na terapia endodôntica e concluíram que a instrumentação sem estar associada a uma solução bactericida não é capaz de eliminar as bactérias, apesar de, em alguns casos, os dentes terem sido submetidos a cinco sessões de instrumentação.

Byström e Sundqvist (1983) realizaram um estudo *in vivo* no qual avaliaram a ação do hipoclorito de sódio a 0,5%. Foram selecionados trinta dentes unirradiculares com polpas necróticas, onde quinze dentes foram irrigados com hipoclorito de sódio a 0,5% durante o tratamento e os outros quinze irrigados com solução salina. O tratamento foi realizado em cinco sessões e a presença de bactérias avaliada em cada sessão. Após a quinta sessão nenhuma bactéria foi isolada em 8 dos 15 canais tratados com solução salina, enquanto 12 dos 15 canais tratados com hipoclorito de sódio a 0,5% apresentavam-se livres de bactérias. Esses resultados sugerem que o hipoclorito de sódio é mais efetivo que a solução salina na irrigação dos canais.

Byström e Sundqvist (1985) investigaram o efeito do hipoclorito de sódio a 0,5 e 5% e do ácido etileno diamino tetracético (EDTA) na eliminação bacteriana em canais radiculares. Sessenta dentes unirradiculares com necrose pulpar com evidência radiográfica de destruição óssea periapical foram divididos em três grupos. Grupo 1: canais irrigados com hipoclorito a 0,5%, grupo 2: canais irrigados com hipoclorito de sódio a 5% e grupo 3: associação do hipoclorito de sódio a 5% e EDTA a 15%. Os resultados indicaram que a combinação do hipoclorito de sódio a 5% e EDTA a 15% foi mais eficiente na descontaminação dos canais e não houve diferença estatística entre os grupo 1 e 2.

Fachin, Hahn e Palmira (1994) afirmaram que a solução irrigadora ideal deve combinar o maior número possível de propriedades, pois é impossível combinar todas simultaneamente. Os autores descreveram que o hipoclorito de sódio possui capacidade de dissolução de tecido necrótico, atribuída a sua alta alcalinidade e propriedade germicida relacionada com a formação de ácido hipocloroso pela liberação de cloro na solução. Os autores indicaram o uso do hipoclorito de sódio a 1% por este apresentar equilíbrio entre suas propriedades.

Siqueira e Uzeda (1996) avaliaram o poder bactericida da pasta de hidróxido de cálcio com soro fisiológico e hidróxido de cálcio com paramonoclorofenolcanforado. Constataram que a pasta com soro fisiológico foi inefetiva para o *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*, mesmo após uma semana de exposição. A pasta com paramonoclorofenolcanforado eliminou bactérias nos túbulos após uma a quatro horas de exposição, exceto para *Enterococcus faecalis* que necessitou de dois dias de exposição.

Estrela et al. (2003) analisaram o tempo necessário para o hidróxido de cálcio eliminar micro-organismos em canais infectados. Um total de cento e sessenta e oito dentes extraídos de humanos foram preparados, instrumentados e autoclavados. Cento e sessenta e dois dentes foram inoculados com suspensões de *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e uma mistura de micro-organismos. Dois grupos controle com três dentes em cada foram usados para testar a esterilização dos canais (controle negativo) e para avaliar a viabilidade dos micro-organismos durante o período experimental (controle positivo). Os canais foram preenchidos com uma pasta de hidróxido de cálcio. Em intervalos de 1 minuto, 7, 15, 21, 27, 30, 45, 60 e 90 dias, a pasta foi removida e amostras coletadas para análise microbiológica. Os resultados indicaram que o efeito antimicrobiano em culturas de *S.aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e em uma cultura mista de canais infectados, ocorreu em 60 dias.

Basrani et al. (2004) descrevem que apesar da limpeza mecânica reduzir consideravelmente o número de micro-organismos, acredita-se que o número de bactérias remanescentes desta etapa possa ser controlado somente com o uso de medicação intracanal durante as sessões de preparo

Menezes et al. (2004), em estudo sobre a efetividade de agentes irrigantes e medicamentos para uso intracanal, relataram a dificuldade da eliminação microbiana dos canais radiculares utilizando-se substâncias irrigadoras durante a instrumentação e medicação intracanal.

Radcliffe et al. (2004) investigaram *in vitro* a eficácia do hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5; 1; 2,5 e 5,25% para eliminar micro-organismos associados a infecções endodônticas refratárias, em diferentes intervalos. Procedeu-se ao teste por contato, nos tempos 0,10, 20, 30, 60 e 120 segundos, e contagem das unidades formadoras de colônias. O hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempos foi testado frente aos micro-organismos: *Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Os resultados indicaram que o aumento da concentração diminui o tempo para redução bacteriana e que em todas as concentrações do hipoclorito de sódio houve uma redução de *Actinomyces naeslundii* e *Candida albicans*, após 10 segundos de exposição e o *Enterococcus faecalis* mostrou ser mais resistente ao hipoclorito de sódio.

Dametto et al. (2005) avaliaram *in vitro* a atividade antimicrobiana do gel de clorexidina a 2% comparado com outros irrigantes endodônticos: solução de clorexidina a 2% e hipoclorito de sódio a 5,25%, em pré-molares extraídos de humanos. Os dentes foram instrumentados, autoclavados e contaminados com culturas de *Enterococcus faecalis* por sete dias e divididos em cinco grupos de acordo com a substância irrigante utilizada durante a instrumentação. Para avaliar a ação das substâncias antimicrobianas, três amostras microbianas foram colhidas. A primeira amostra: antes do preparo biomecânico, a segunda: logo após o preparo biomecânico e a terceira: sete dias após o preparo biomecânico. Todas as amostras foram semeadas e plaqueadas para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados indicaram que o gel e a solução de clorexidina a 2% reduziram significativamente as UFCs de *Enterococcus faecalis* após a análise da segunda e da terceira amostra. A solução de hipoclorito de sódio a 5,25% também reduziu as UFCs após análise da primeira amostra, mas não foi capaz de manter os canais livres de bactérias na segunda e terceira amostras. Os autores concluíram que tanto a solução quanto o gel de clorexidina a 2% foram mais efetivas que o hipoclorito de sódio a 5,25% na redução de *Enterococcus faecalis* após sete dias do preparo biomecânico.

Belber et al. (2006) avaliaram, *in vitro*, a eficácia do hipoclorito de sódio em eliminar *Enterococcus faecalis* dos canais radiculares e dos túbulos dentinários, associado a três técnicas de instrumentação endodôntica. Para este trabalho foram utilizados cento e vinte pré-molares humanos unirradiculares preparados, os quais foram instrumentados pela técnica híbrida, da FOP-Unicamp e instrumentação mecanizada Hero 642. Todos os dentes foram autoclavados e incubados por 48 horas a 37° C para verificação da eficácia da esterilização. Após a contaminação com *Enterococcus faecalis*, os dentes foram divididos em 12 grupos com dez dentes cada e irrigados com três concentrações de hipoclorito de sódio a 0,5%; 2,5% e 5,25%. Amostras foram colhidas do interior dos canais utilizando pontas de papel absorvente. Após diluições seriadas, alíquotas de 0,1mL foram plaqueadas e incubadas por 48 horas a 37°C. As unidades formadoras de colônias foram contadas. Além disso, cada dente foi seccionado em três terços e amostras de dentina do canal removida com brocas de alta rotação. As amostras obtidas de cada broca e de cada terço foram analisadas. Os resultados demonstraram que a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% apresentou maior atividade antibacteriana quando comparado com a mesma solução em outras concentrações testadas, independente da técnica utilizada para instrumentação dos canais.

Vianna et al. (2006) avaliaram, *in vivo*, a redução microbiana após preparo químico-mecânico de canais radiculares humanos com necrose pulpar, utilizando como irrigantes endodônticos, hipoclorito de sódio a 2,5% ou gel de clorexidina a 2%. Trinta e seis dentes com polpa necrosada foram divididos em dois grupos. No grupo 1 os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio a 2,5% e no grupo 2 os canais preenchidos com gel de clorexidina 2%. A presença bacteriana foi determinada por q-PCR e pela contagem de UFC. Ambas as soluções foram eficazes na redução do número de bactérias.

Segundo Schoop et al. (2006) a eliminação microbiana efetiva do sistema de canais radiculares é talvez o maior desafio da Endodontia atual e é de inestimável valor para a preservação do dente tratado endodonticamente.

Em um estudo *in vitro*, Brito et al. (2009) compararam a redução bacteriana intracanal utilizando três diferentes técnicas de irrigação. Sessenta canais de caninos unirradiculares extraídos de humanos foram contaminados com *Enterococcus faecalis* por sete dias e distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: (1) irrigação convencional com agulhas NaviTip; (2) irrigação convencional com agulhas NaviTip seguida pela ativação da substância com EndoActivador e, (3) irrigação com o sistema EndoVac. As substâncias utilizadas, em todos os grupos experimentais, foram o

hipoclorito de sódio a 2,5% e o EDTA a 17%. O grupo controle foi irrigado apenas com solução salina. Amostras coletadas antes e depois do preparo químico-mecânico foram cultivadas e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. A redução da população bacteriana foi altamente significativa em todos os grupos experimentais, não havendo diferenças significativas entre as técnicas testadas.

Gorduysus et al. (2010) compararam, *in vitro*, a redução bacteriana em canais instrumentados com três técnicas de instrumentação rotatória e uma técnica manual. Cento e trinta e cinco pré-molares humanos, unirradiculares, tiveram suas coroas seccionadas com disco diamantado e os espécimes padronizados em 15 milímetros. Os canais foram explorados e instrumentados com uma lima tipo K-file 25, um milímetro aquém do forame. Irrigação realizada com solução salina, seguido da irrigação com EDTA a 17% por 3 minutos e finalmente lavados com água destilada. O forame apical selado e a superfície externa impermeabilizada com verniz de unha. Os espécimes foram autoclavados e divididos em cinco grupos experimentais e um grupo controle. Os dentes, com exceção do grupo controle, foram contaminados com 20µL da suspensão de *Enterococcus faecalis*, contendo, aproximadamente, $1,2 \times 10^9$ UFC/mL. O grupo controle foi preenchido com 20µL de BHI estéril. A cavidade de acesso selada com cimento temporário e os espécimes incubados a 37°C, por sete dias, com substituição do meio BHI após o terceiro dia. G1: instrumentação rotatória sistema Protaper; G2: instrumentação rotatória sistema K3; G3: instrumentação rotatória HeroShaper; G4: instrumentação manual e G5: controle. Durante a instrumentação os canais irrigados com solução salina estéril. Amostras bacteriológicas coletadas com pontas de papel, mantidas no interior do canal por um minuto e transferidas para tubos contendo solução salina. Foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 100µL plaqueadas em ágar BHI, incubadas a 37°C, por 24 horas para contagem das UFC/mL. Todas as técnicas de instrumentação apresentaram redução bacteriana, entretanto a instrumentação com o sistema Protaper foi mais efetivo na redução do número de bactérias quando comparada aos outros grupos.

Retamozo et al. (2010) investigaram a concentração de hipoclorito de sódio e o tempo de irrigação necessários para a desinfecção de blocos de dentina infectados com *Enterococcus faecalis*. Quatrocentos e cinquenta blocos de dentina foram preparados a partir de incisivos bovinos extraídos e tiveram os túbulos dentinários abertos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17% por 4 minutos e hipoclorito de sódio a 5,25%. Os blocos de dentina expostos ao *Enterococcus faecalis* foram incubados por três semanas em meio de cultura BHI (caldo de infusão cérebro

coração). As amostras foram divididas em dois grupos controles (positivo e negativo) e três grupos de acordo com a concentração de hipoclorito de sódio: 1,3%, 2,5% e 5,25%, aplicando 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos em cada concentração testada. As amostras foram incubadas por 72 horas, em um tubo contendo 2mL de BHI e o crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez do meio. Os dados revelaram que a irrigação mais efetiva foi NaOCl na concentração de 5,25% por 40 minutos (100%), enquanto que a irrigação nas concentrações mais baixas foram ineficazes na eliminação de *Enterococcus faecalis* neste mesmo intervalo de tempo. Os autores concluíram que é necessário alta concentração e longa exposição ao NaOCl para eliminação do *Enterococcus faecalis*.

2.3 LASER E APLICAÇÃO NA ENDODONTIA

A irradiação laser tem sido proposta como uma terapêutica a ser associada ao tratamento endodôntico na redução de micro-organismos, em casos de infecção. Estudos demonstraram resultados promissores da irradiação dos lasers de alta e baixa intensidade na redução microbiana dos canais radiculares (BERGMANS et al., 2006; MORITZ et al., 1997; SCHOOP et al., 2004).

Mehl et al. (1999) avaliaram o efeito da radiação do laser de alta intensidade, Er: YAG, em dois tempos de irradiação: 15 e 60 segundos e compararam à irrigação com hipoclorito de sódio 1,25% por dois minutos. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento. Noventa dentes contaminados com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram submetidos aos tratamentos. A irrigação com hipoclorito de sódio a 1,25% foi mais eficiente em reduzir o número de bactérias que o laser, em 15 segundos. Entretanto, quando aumentou a irradiação para 60 segundos não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao hipoclorito de sódio a 1,25%.

Kimura, Wilder-Smith e Matsumoto (2000) verificaram que todos os lasers de alta intensidade apresentam um poder bactericida que varia de acordo com o tipo do mesmo. Citam as desvantagens do uso desse laser: disseminação da contaminação bacteriana do interior do canal para o paciente e para a equipe de trabalho pela nuvem de vapor formada, a injúria térmica aos tecidos periodontais e a dificuldade em remover *smear layer* de todas as paredes do canal.

Kreisler et al. (2003) compararam a eficiência do laser de alta intensidade, GaAlAs, à irrigação com hipoclorito de sódio e água oxigenada em canais radiculares contaminados com *Streptococcus sanguis*. Os dentes foram divididos em três grupos:

1. Controle positivo no qual nenhum tratamento foi realizado, 2. Os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio e água oxigenada e 3. Além da irrigação, aplicaram o laser por 60 segundos, variando a potência de 1.5, 3.0 e 4.5W. O crescimento bacteriano foi avaliado pela contagem das UFCs. A irrigação sozinha diminuiu a viabilidade bacteriana comparada à utilização do laser com 3.0W, enquanto a associação de ambos foi significativamente mais eficiente. Concluíram que a aplicação do laser deve ser feita associada ao tratamento convencional dos canais radiculares.

Walsh (2003) realizou uma revisão de literatura sobre as aplicações do laser em odontologia. O autor relatou que o emprego do laser de alta intensidade, como de CO₂ e Nd:YAG, reconhecidos pelo efeito destrutivo sobre bactérias, geram calor, tornando o procedimento criterioso quanto aos riscos de dano térmico que podem ser induzidos. E relatou também que o laser de baixa intensidade quando usado com um corante sobre a parede da célula bacteriana, a destruição ocorrerá com pequeno ou nenhum dano à polpa ou ao ligamento periodontal devido à baixa energia requerida.

Schoop et al. (2006) testaram a capacidade de diferentes sistemas de lasers em eliminar *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* em cortes de dentina de um milímetro de profundidade. Em relação ao *Enterococcus faecalis*, concluíram que todos os lasers de alta intensidade testados tiveram dificuldade em eliminá-lo. Com 1W de potência os lasers de diodo e ErCr:YSGG foram capazes de reduzir, apenas 1 log na contagem de UFC e os de Nd:YAG e Er:YAG reduziram 2 log na contagem de UFC. Com a potência de 1.5W aumentou o poder bactericida dos lasers. Não houve relação entre o aumento da temperatura e o efeito bactericida.

Eldeniz et al. (2007) testaram o efeito bactericida do laser de alta intensidade ErCr:YSGG comparado com a irrigação com NaOCl a 3% por 15 minutos. Contaminaram 40 raízes com *Enterococcus faecalis* e dividiram em quatro grupos: um grupo controle, um grupo irrigado com NaOCl e dois grupos com diferentes tamanhos de forame apical que foram irradiados com laser. Para coleta microbiana, removeram raspas de dentina das paredes do canal com broca Gates Glidden. Concluíram que o laser de ErCr: YSGG reduziu a viabilidade bacteriana em canais radiculares, mas foi incapaz de eliminar todas as bactérias. O NaOCl a 3% foi capaz de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis* e efetivamente esterilizar todos os canais.

A ação antimicrobiana dos lasers de baixa intensidade tem sido estudada em um processo conhecido como Terapia Fotodinâmica (WILSON et al., 1992).

Lage-Marques e Eduardo (1998) relataram que o laser de diodo de baixa potência, o GaAlAs, é um equipamento prático e de grande valia na clínica endodôntica quando empregado como coadjuvante ao tratamento endodôntico. No entanto, deve ser aplicado com conhecimento e habilidade. Segundo os autores, este aparelho é o de utilização na clínica odontológica pela facilidade de aquisição, pelo baixo custo, e pela obtenção de resultados.

Seal et al. (2002) relataram que a utilização de técnicas coadjuvantes à técnica de instrumentação dos canais radiculares com o uso da irradiação laser de baixa intensidade, são apontadas como novas abordagens para eliminação da infecção do sistema de canais radiculares. Uma vantagem desta técnica é que a complexidade anatômica dos canais não é vista como um obstáculo na eliminação microbiana, já que a luz laser pode ser redirecionada, em virtude de sua transmissão através dos prismas de esmalte e túbulos dentinários, e por agir efetivamente através dos canais de fibra óptica.

Segundo Gutknecht et al. (2005), a maior efetividade da terapia com laser de baixa intensidade em Endodontia, é que são recomendados para redução microbiana sem apresentarem aumento na temperatura do tecido circundante. Os autores concluíram em seus estudos, que a aplicação do laser de baixa intensidade em canais radiculares, não altera a temperatura do tecido circundante em mais de 7° C, impossibilitando qualquer alteração tecidual e favorecendo a utilização para fins endodônticos.

Os lasers de baixa intensidade mais utilizados são os de diodo, com potência média de 30 a 100mW, modo de emissão contínuo ou pulsátil, e comprimento de onda entre 630 e 904 nm . Suas principais aplicações estão baseadas na quantidade de luz absorvida, e não na produção de efeitos térmicos, como os lasers de alta potência (GONÇALVES, 2005). Schoop et al. (2006) relataram que a introdução dos lasers na Endodontia ajudou a contornar o problema da penetração insuficiente dos agentes desinfetantes, melhorando o sucesso do tratamento endodôntico.

Segundo Garcez et al. (2007), a laserterapia utilizando laser de baixa intensidade é avaliada como método alternativo de tratamento antimicrobiano pelo fato de não favorecerem o desenvolvimento da resistência microbiana.

2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA EM CANAIS RADICULARES

Ackroyd et al. (2001) descreveram em uma revisão de literatura sobre a origem e desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica. De acordo com os autores o conceito da Terapia Fotodinâmica é conhecido por mais de 100 anos, quando Oscar Raab (1900) publicou o primeiro artigo sobre os efeitos fotodinâmicos e observou que baixas concentrações do corante de acridina na presença de luz podiam ser letais aos paramécios, o protozoário causador da malária. E este efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila. A primeira aplicação na medicina foi atribuída a Tappeiner e Jesionek em 1903, que utilizaram a aplicação tópica do corante eosina e exposição à luz para tratamento de câncer cutâneo. Em 1907, Von Tappeiner denominou este fenômeno de ação fotodinâmica. Desde então, as pesquisas nesta área, principalmente no combate ao câncer, buscam novos fotossensibilizantes e novas fontes de luz.

A efetividade da Terapia Fotodinâmica requer a presença de fotossensibilização química por luz dotada de comprimento de onda apropriado e a presença de oxigênio. O princípio da terapia é que a energia absorvida via fotossensibilização intracelular é transferida à molécula de oxigênio dando origem a uma reação oxidativa (SCHACKLEY et al., 1999). Como a interação do oxigênio altamente reativo com as moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser alvo em potencial para a Terapia Fotodinâmica. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência bacteriana, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização, além da morte celular. Além disso, o procedimento pode ser repetido várias vezes, uma vez que não há efeitos cumulativos e é, usualmente, não invasivo (CARRÉ et al., 1999).

A Terapia Fotodinâmica tem sido instituída como terapêutica em oncologia, no tratamento da degeneração macular relacionada a idade, em doenças dermatológicas, em artrite reumatóide, doenças coronarianas e muitas evidências apontam para a utilização desta terapia no controle de diversas infecções (CHAVANTES, 2007). Das possibilidades terapêuticas empregando-se a Terapia Fotodinâmica, a utilização na eliminação microbiana é uma das mais discutidas (CAMINOS et al., 2006).

Segundo Gonçalves (2005), na Terapia Fotodinâmica a eliminação de microorganismos está relacionada com a ativação do corante depositado no organismo alvo que após sensibilização transforma oxigênio molecular em oxigênio singleto que é citotóxico. Durante este processo, componentes celulares fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singleto altamente reativo (fotoprocesso tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoprocesso tipo I).

Os produtos gerados nessas reações podem promover diversos danos nos componentes da célula microbiana ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte microbiana (LAMBRECHTS et al., 2005). Em geral, o processo causa danos na via oxidativa, na membrana plasmática e material genético da célula microbiana, mas não são tóxicos às células do hospedeiro (ZANIN et al., 2005).

Dobson e Wilson (1992), em um estudo *in vitro*, analisaram a redução bacteriana por fotossensibilização de biofilme formado pelas espécies *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* por um laser em baixa intensidade. Utilizando sobre amostras de biofilme bacteriano em placas de Petri, uma associação de diversos corantes e um laser de He-Ne de 7,3 mW de potência, os autores concluíram que apenas os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram eficazes em eliminar as quatro espécies de bactérias e os corante ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirina HCl e hematoporfirina éster somente foram efetivos em sensibilizar alguns dos microorganismos. Os autores sugeriram que, baseados em seus resultados, a técnica de Terapia Fotodinâmica é capaz de eliminar bactérias periodontopatogênicas do biofilme bacteriano.

Como a maioria das espécies bacterianas não apresenta componentes fotossensíveis, a utilização de um composto que atraia a luz e inicie a formação de radicais livres é fundamental. A habilidade de um componente em absorver luz incidente não significa necessariamente que ele possa atuar como um fotossensibilizador. Para produzir efeito antimicrobiano, os fotossensibilizadores devem apresentar picos de absorção próximos ao comprimento de onda da luz utilizada e não devem apresentar toxicidade ao hospedeiro (Wilson et al., 1992).

Assim, células desprovidas de componentes fotossensíveis endógenos podem reverter o quadro tornando-se sensíveis a luz quando coradas com substâncias como o azul de toluidina, azul de metileno, eosina e hematoporfirinas (WILSON 1993).

Os corantes fotossensíveis mais utilizados são azul de toluidina e azul de metileno, que são fotossensibilizadores sintéticos. Cada corante fotossensibilizador possui um espectro de ação da luz sobre um comprimento de onda de máxima absorção (SCHACKLEY et al., 1999).

A literatura demonstra que o uso de corantes deve ocorrer de forma que a banda de absorção dos fotoiniciadores esteja em ressonância com o comprimento de onda emitido pela fonte de luz. Para isto, diversos corantes vêm sendo testados. A busca por agentes fotossensibilizadores menos tóxicos e mais ressonantes com o comprimento de onda emitidos pelo laser tem sido uma constante na Terapia Fotodinâmica, tanto para tratamento de neoplasias como para a eliminação de microorganismos. Quanto mais próximos deste ideal o novo agente se mostrar, mais a Terapia Fotodinâmica realizará seu potencial na redução microbiana (KÖNIG et al., 2000).

Gutknecht et al. (2000) avaliaram o efeito antibacteriano do laser de diodo em canais radiculares. Os autores utilizaram cortes de dentina bovina de 100, 300 e 500µm obtidas por corte longitudinal. Essas amostras foram esterilizadas e inoculadas em um lado com uma suspensão de *Enterococcus faecalis*. A radiação laser foi efetuada do lado oposto com laser de diodo, emissão contínua, comprimento de onda de 810nm. A radiação realizada com auxílio de uma fibra de 400µm, por um período de 30 segundos. As bactérias foram retiradas por vibração, cultivadas e plaqueadas e procedeu-se a contagem de colônias. Os resultados permitiram observar que a radiação do laser diodo reduziu o número de bactérias em camadas profundas de paredes dentinárias.

Silbert et al. (2000) testaram a Terapia Fotodinâmica quanto à capacidade de reduzir a contaminação bacteriana em canais radiculares contaminados com *Streptococcus mutans* ou *Enterococcus faecalis*. Utilizaram corante azul de metileno 100µg/mL e quatro minutos de irradiação com laser de He-Ne com fibra óptica. O primeiro grupo foi inoculado com uma suspensão de *S. mutans* e o segundo, com uma suspensão de *E. faecalis*. Nos resultados, obtiveram redução de 100% para o *S. mutans* e de 40% para *Enterococcus faecalis*. Os autores concluíram que a Terapia Fotodinâmica pode ser um método efetivo na redução bacteriana intracanal, mas

parâmetros devem ser ajustados para se obter uma eliminação mais eficaz do *Enterococcus faecalis*.

Seal et al. (2002) compararam, *in vitro*, a eficácia da Terapia Fotodinâmica utilizando o fotossensibilizante azul de orto-toluidina em diferentes concentrações e irrigação com solução de hipoclorito de sódio a 3% em biofilme de *Streptococcus intermedius* nos canais radiculares. O laser utilizado foi o He-Ne com comprimento de onda de 632.8nm e potência de 35mW. Foram utilizados 35 dentes humanos unirradiculares extraídos, preparados endodonticamente, esterilizados e inoculados com *Streptococcus intermedius* por 48 horas até a formação de um biofilme. Quatro dentes receberam solução de hipoclorito de sódio a 3%, por 5 minutos. Quatro dentes foram utilizados para cada concentração do fotossensibilizador azul de O-toluidina (12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com variados tempos (60, 90, 120, 300 e 600 segundos) equivalentes a doses de energia de 2,1J a 21J. Dezesete dentes não receberam nenhum tipo de tratamento. Amostras foram colhidas utilizando pontas de papel absorvente. Os resultados mostraram que a combinação 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de TBO em 600 segundos e dose de energia de 21J, houve uma redução bacteriana significativa, mas não foram tão eficazes como o hipoclorito de sódio a 3%.

Teichert et al. (2002) com o objetivo de avaliar a eficácia do azul de metileno e do azul de toluidina na fotossensibilização de micro-organismos patogênicos, utilizaram estes corantes associados a um laser de Argônio ($\lambda=630\text{nm}$) e um laser diodo ($\lambda=664\text{nm}$) com energia entre 10 e 60J/cm², e potência variando de 50 a 100mW/cm². Os corantes foram aplicados em diferentes concentrações, em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados indicaram que todos os micro-organismos foram eliminados quando expostos ao laser na presença de corantes. No entanto, a fotossensibilização dependeu do corante utilizado, sua concentração, energia e potência do laser e da espécie bacteriana envolvida.

Williams et al. (2003) avaliaram a efetividade da Terapia Fotodinâmica em suspensão planctônica de *Streptococcus mutans*. Os micro-organismos foram corados com azul de O-toluidina e irradiados com laser de diodo (633nm), com ponta de fibra óptica de 800 μm , alterando a dose de energia de 0.4J e 4.8J e o tempo de irradiação entre 5 e 60 segundos. A ação bactericida foi diretamente proporcional à dose de energia. Doses de energia iguais ou superiores a 1.8J eliminaram 100% das bactérias presentes. O uso do laser e o corante isoladamente não apresentaram ação bactericida significativa.

Garcez et al. (2003) apresentaram as principais indicações da Terapia Fotodinâmica na odontologia, assim como os principais fotossensibilizantes e fontes de luz encontrados. O agente fotossensibilizador ideal deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficiente, seletivo para a célula-alvo e minimamente tóxico aos tecidos. Os principais fotossensibilizantes são os derivados da hematoporfirina com banda de absorção de 620-650nm, com emprego na PDT antineoplásica; fenotiazinas (azul de toluidina e azul de metileno), com banda de absorção de 620-700nm, mais usados na cavidade oral; cianinas (indocianina verde), com banda de absorção de 600-805nm, utilizada para tratamento de tumores e infecções mais profundas; fitoterápicos (azuleno), com banda de absorção de 550-700nm, usados na cavidade oral; ftalocianinas com banda de absorção de 660-700nm agem na desinfecção por inativação viral de produtos sanguíneos. Para os autores, a Terapia Fotodinâmica não deverá substituir os antibióticos, agentes antimicrobianos ou qualquer tratamento convencional, mas deve ser vista como uma modalidade de tratamento de infecções localizadas e uma terapia complementar e eficiente no tratamento das infecções bucais, principalmente por não apresentar efeitos sistêmicos, além de não haver risco de promover resistência bacteriana. Os autores, através da revisão de literatura, concluíram que o uso da Terapia Fotodinâmica é um eficiente método de redução bacteriana.

Com o intuito de verificar se a Terapia Fotodinâmica causa injúrias aos tecidos adjacentes à terapia, Kömerik et al. (2002), propuseram avaliar a validade da Terapia Fotodinâmica em mucosa bucal de ratos que apresentavam uma doença infecciosa mediada por bactérias. Utilizaram, para tal fim, o corante azul de toluidina em diferentes concentrações (25, 50 e 200 µg/mL) e um laser vermelho (6mm de diâmetro, 630nm) variando-se sua dosimetria (110, 170 e 340 J/cm²) em somente um lado. Para o lado controle, foram utilizados, independentemente, 200µg/mL do corante e uma dosimetria de 340 J/cm² do laser. Todos os ratos foram sacrificados e, após 72 horas, foram obtidas amostras para se realizar o exame histológico e a imagem digital por fluorescência. Verificaram a ausência de mudanças inflamatórias ou necróticas para ambos os lados, concluindo que, nos parâmetros utilizados, a Terapia Fotodinâmica parece ser uma abordagem segura para o tratamento de infecções bucais sem danos aos tecidos adjacentes.

Quanto à utilização da Terapia Fotodinâmica na eliminação de bactérias relacionadas a infecções endodônticas, Walsh (2003) relatou que o laser de baixa intensidade por si só não é letal frente a essas bactérias, mas é usada para ativação fotoquímica do corante liberador de oxigênio. Segundo o autor, o oxigênio singletto

liberado do corante causa injúria na membrana e no material genético dos micro-organismos, inclusive aqueles resistentes à ação de agentes microbianos. Além disso, a Terapia Fotodinâmica não produz efeitos térmicos deletérios, não promove nenhum tipo de sensibilização e morte de células dos tecidos sadios adjacentes ao canal.

Usacheva, Matthew e Teichert (2003) analisaram por espectrofotometria a diferença entre os corantes azul de metileno e azul de toluidina na fotoinativação bacteriana. As investigações apontam que o azul de toluidina é mais eficaz que o azul de metileno, tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas.

Wilson et al. (2005) relataram que, com a Terapia Fotodinâmica, a morte da célula bacteriana ocorre mais rapidamente do que quando empregam os agentes antimicrobianos convencionais e, como não há necessidade da permanência do corante por um período prolongado, como ocorre com os antibióticos, torna o aparecimento de bactérias resistentes menos provável.

Bonsor et al. (2006) experimentaram utilizar azul de orto-toluidina associada à irradiação com laser de baixa intensidade, *in vivo*. Foram eleitos 30 pacientes, de forma randômica, que apresentavam lesão endodôntica. Os dentes foram irradiados com laser de diodo, potência de 100mW, durante 120 segundos, utilizando fibra óptica com movimentos circulares. Foi realizada coleta microbiológica intracanal logo após o acesso, e apenas 20 apresentavam micro-organismos. Destes, 16 dentes apresentaram resultado negativo na cultura de placa após o tratamento endodôntico convencional. Os quatro dentes restantes que ainda apresentavam micro-organismos após o tratamento endodôntico convencional, apresentaram resultado negativo na cultura após aplicação do agente fotossensibilizante irradiado com laser. Os autores concluíram que a Terapia Fotodinâmica proporciona destruição de micro-organismos refratários ao uso de substâncias químicas convencionais usadas na terapia endodôntica.

Caminos et al. (2006) relataram uma outra vantagem da Terapia Fotodinâmica. O fotossensibilizador utilizado é seletivo para o micro-organismo através da combinação da droga com baixas doses de luz, já que para promover o mesmo efeito em célula animal é necessário uma dose muito maior e concentrações diferentes do fotossensibilizador. Segundo os autores, os fotossensibilizadores testados até o momento não apresentaram atividade mutagênica ou formação de espécies droga-resistentes.

No ano de 2007, um estudo enfocou a Terapia Fotodinâmica como temática, realizando extensa revisão de literatura acerca do assunto, objetivando a reação

fotodinâmica, a utilização de fotossensibilizante, mecanismo de inativação dos micro-organismos, fontes de luz, efeitos da terapia em biofilmes orais, estudos *in situ* e *in vivo* e perspectivas futuras. Relataram também que a Terapia Fotodinâmica parece oferecer muitas vantagens para o tratamento de infecções originadas por micro-organismos, tais como amplo espectro de ação, a inativação de micro-organismos e o baixo potencial mutagênico nas células expostas. Além disso, tem se mostrado capaz de promover atividades citotóxicas contra uma variedade de bactérias, fungos e protozoários (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007).

A Terapia Fotodinâmica tem sido proposta para desinfecção de canais radiculares também pela atuação sobre os biofilmes presentes nas paredes dentinárias dos canais radiculares. Foi observado que bactérias inseridas nos biofilmes passam a exibir características fenotípicas distintas das culturas planctônicas, resultando no aumento da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos (WILSON, 1999). Em suspensões planctônicas, a chance de sucesso é bem maior quando comparada a bactérias organizadas em biofilmes, devido à reduzida susceptibilidade a agentes antimicrobianos (WILLIAMS et al., 2003).

Gonçalves (2005) afirmam que a Terapia Fotodinâmica é um dos tratamentos que mais se enquadra nas características da busca por um agente antimicrobiano no qual os micro-organismos sejam incapazes de obter resistência. A organização microbiana na forma de biofilme é um fator que determina dificuldade de atuação dos agentes antimicrobianos utilizados intracanal, além de possibilitar resistência microbiana (GARCEZ et al., 2007).

Zanin et al. (2005) avaliaram o efeito antimicrobiano do azul de toluidina associado ao laser He-Ne ou ao LED (emissor de luz de diodo) na viabilidade do biofilme de *Streptococcus mutans* formado em três, sete e dez dias. As densidades de energia utilizadas foram 49J/cm² (cinco minutos), 147J/cm² (15 minutos) e 294J/cm² (trinta minutos). Conferiram que o biofilme formado por maior tempo foi menos susceptível à Terapia Fotodinâmica. O efeito bactericida foi similar com os dois tipos de laser e proporcional à dose de energia.

Soukos et al. (2006) avaliaram os efeitos da Terapia Fotodinâmica sobre micro-organismos patógenos: *Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas endodontalis* e *Enterococcus faecalis*. Em 60 dentes humanos recém-extraídos, foi introduzida solução de azul de metileno, permanecendo em repouso por 5 minutos e, posteriormente, irradiados com laser diodo, comprimento de onda de 665nm e fluência de 30J/cm², através da

introdução de fibra óptica para irradiação tridimensional da luz dentro do conduto. Seguindo este protocolo, todas as bactérias foram eliminadas, exceto *Enterococcus faecalis* (53% de eliminação). Ao aumentar a fluência para $E=222 \text{ J/cm}^2$, houve 97% de eliminação de *Enterococcus faecalis*. Os autores concluíram que a Terapia Fotodinâmica deve ser empregada como coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional.

Garcez et al. (2006) investigaram a ação do laser em baixa intensidade a um fotossensibilizante na redução de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares, *in vitro*. Foram contaminados trinta dentes humanos unirradulares e divididos em dois grupos. O primeiro grupo foi irrigado com NaOCl a 0,5% e deixou-se a solução por trinta minutos. No outro grupo, o canal foi preenchido com o agente fotossensibilizante, azuleno a 25% associado ao ENDO-PTC, mantido por cinco minutos e, logo após, irradiado com laser de diodo de baixa potência, comprimento de onda de 685nm por três minutos, com emprego de fibra óptica. Após os estudos, os pesquisadores afirmaram que o fotossensibilizante ou o laser isolados não apresentam propriedades antimicrobianas. O NaOCl a 0,5%, alcançou 93,25% de desinfecção, enquanto que o laser associado à fotossensibilização obteve 99,2% de sucesso. O estudo afirma que a fotossensibilização foi efetiva durante a redução de *Enterococcus faecalis*, e sugere que seja coadjuvante ao tratamento endodôntico.

Zanin et al. (2006) testaram a ação antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica associando o corante azul de toluidina O (0,1mg/ml) e um laser de diodo ($E=85,7 \text{ J/cm}^2$) sobre biofilmes de *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*. Houve uma significativa redução de, aproximadamente, 95% de *S. mutans* e *S. sobrinus* e de 99,9% para *S. sanguinis*.

No estudo de Prates et al. (2007), foi observada a eficácia do verde de malaquita na Terapia Fotodinâmica sobre a bactéria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, presente no biofilme oral. Culturas desse micro-organismo foram irradiadas com laser de diodo de baixa intensidade de 660nm com 30mW de potência e os grupos foram expostos por 3 ou 5 minutos ($5,4 \text{ J/cm}^2$ e 9 J/cm^2) na presença ou ausência de corante. Os resultados mostraram que o laser ou o corante sozinho não são capazes de eliminar a bactéria e que ambas as fluências foram eficientes na terapia para redução bacteriana, principalmente com a maior dose de energia.

Yamada (2007) apresentou um caso clínico em que foi utilizada a Terapia Fotodinâmica logo após o preparo químico cirúrgico do canal radicular. O autor

observou uma redução microbiana de 99,9% com comprovação da eficácia e rapidez da resolução do caso por acompanhamento radiográfico.

Garcez et al. (2007) estudaram a eficácia da PDT combinada ao tratamento endodôntico convencional em eliminar biofilmes de bactérias presentes em canais radiculares. Dentes humanos extraídos, preparados e inoculados com *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* por três dias foram instrumentados e irrigados com hipoclorito de sódio a 2,5%, seguido de irrigação com peróxido de hidrogênio a 3%. Em seguida os dentes foram submetidos à PDT. Os canais foram preenchidos com 10mL de fotossensibilizante por 10 min e irradiados com laser de diodo, comprimento de onda de 660nm, potência 40mW, utilizando um sistema de fibra óptica de 200µm, com movimentos espirais de apical para cervical. Quando o tratamento convencional foi associado à PDT, houve uma redução bacteriana significativamente maior que a terapia endodôntica sozinha.

Segundo Bagnato (2007), os princípios básicos da Terapia Fotodinâmica são relativamente simples, e isto lhe assegura certo grau de confiabilidade e eficiência. A técnica pode ser bastante eficiente, desde que seja possível garantir que durante a execução da fototerapia estejam presentes: droga, oxigênio e luz suficientes para promoverem danos a célula alvo.

Marotti (2008) relatou que diversos fatores estão envolvidos na Terapia Fotodinâmica: micro-organismos, agente fotossensibilizador (tipo e concentração), fonte de luz (comprimento de onda, potência, dose) e tempo (de irradiação e de contato do microorganismo com o fotossensibilizador). É importante controlar todos esses fatores e adequar os parâmetros de irradiação para o sucesso da Terapia Fotodinâmica.

Garcez et al. (2008) avaliaram o efeito antimicrobiano da Terapia Fotodinâmica (PDT) associada ao tratamento endodôntico convencional. Vinte canais de dentes anteriores de humanos com necrose pulpar ou lesão periapical foram submetidos à análise microbiológica após acesso do canal, tratamento endodôntico e Terapia Fotodinâmica. O tratamento foi realizado em duas sessões, sendo que na primeira sessão foram submetidos ao tratamento endodôntico convencional e à Terapia Fotodinâmica. Na Terapia Fotodinâmica, foi utilizado fotossensibilizante por 2 minutos e os dentes foram irradiados com laser de diodo ($\lambda= 660\text{nm}$ e $P=40\text{mW}$), com fibra óptica de 300µm de diâmetro, com movimentos espirais, ápico-cervical para difusão da luz em todo o sistema de canais radiculares. Após a primeira sessão, os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio e, após uma semana, foi realizada uma segunda

sessão de Terapia Fotodinâmica, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Os resultados indicaram que nenhum dos canais apresentou 100% de redução microbiana após o tratamento endodôntico. Entretanto, dois dentes apresentaram ausência total de micro-organismos após o tratamento endodôntico associado à Terapia Fotodinâmica. Os autores concluíram que a Terapia Fotodinâmica é eficiente, não é tóxica e destrói micro-organismos remanescentes do sistema de canais radiculares após o tratamento convencional.

Bergmans et al. (2008) analisaram o efeito da eliminação de alguns patógenos endodônticos na forma de biofilme, utilizando a PDT. Trinta e oito pré-molares inferiores humanos extraídos foram autoclavados e inoculados com *Streptococcus anginosus*, *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Os dentes foram divididos em grupos de acordo com o tratamento: (A) PDT, (B) laser isolado, (C) corante isolado e (D) controle positivo. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) associada com observações no microscópio eletrônico de varredura (MEV), antes e depois do tratamento, foram avaliadas após 1, 2 e 6 dias de incubação. Nesse estudo utilizou-se o corante azul de toluidina na concentração de 12,7mg/mL irradiado com o laser de diodo (P=100mW, λ =635nm, E=15J) por 150 segundos, com uma fibra óptica de 300 μ m. Os autores concluíram que com a PDT houve uma redução bacteriana significativa, resultando em 93,8% de *S. anginosus*, 88,4% *Enterococcus faecalis* e 98,5% *F. nucleatum*. O laser e o corante sozinhos não apresentaram efeito significativo na redução dos micro-organismos testados. Quando analisados no MEV, as células planctônicas foram facilmente eliminadas com a PDT e quando agrupadas em biofilme a eliminação bacteriana reduziu substancialmente. Para fotossensibilização letal eficaz, é necessário a associação do corante e do laser como uma alternativa na desinfecção dos canais radiculares.

Fonseca et al. (2008) avaliaram em dentes extraídos a redução do número de colônias de *Enterococcus faecalis* após Terapia Fotodinâmica. Sessenta e seis canais foram contaminados, incubados por 48 horas e divididos em dois grupos: grupo controle em que nenhum tratamento foi realizado e outro grupo, canais preenchidos com corante azul de toluidina por cinco minutos e irradiados com laser de diodo com comprimento de onda de 660nm e potência de 50mW. Amostras bacteriológicas coletadas antes e após a aplicação do laser no grupo da PDT e no grupo controle coletaram-se inicialmente e após 48 horas, para contagem das UFCs. No grupo da PDT a redução bacteriana foi de 99,9% enquanto no grupo controle houve um aumento de 2,9%. Concluíram que a PDT é um eficiente agente bactericida para canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*.

Fimple et al. (2008) testaram a eficácia da PDT ao biofilme de *A. israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermédia*. Os dentes foram preparados, instrumentados, contaminados e divididos em grupos: controle, somente corante, somente laser e laser e corante (PDT). Amostras foram analisadas DNA, ao microscópio eletrônico de varredura e microscópio laser confocal. Os autores concluíram que houve uma redução de até 80% de UFC no grupo da PDT.

No estudo de Prates et al. (2010) os parâmetros da Terapia Fotodinâmica foram avaliados em leveduras. Para isso, suspensões de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* foram usadas. A suspensão corada por 10 minutos com azul de metileno. Amostras irradiadas de cima para baixo em placas de microtitulação, com laser GaAlAs, comprimento de onda de 660nm e potência ajustada em 30 e 90mW. Duas taxas de fluência, 100 e 300mW/cm² foram comparadas em 3, 6 e 9 minutos de irradiação, que resultaram em fluências de 0 a 162J/cm². Na comparação dos efeitos de inativação microbiana na fluência de 54J/cm², resultante de dois parâmetros distintos de irradiação, 9min; 100mw/cm² e 3min; 300mW/cm², foi possível observar que mesmo sob uma taxa de fluência menor, o tempo de irradiação influenciou a morte microbiana. O parâmetro de irradiação 54J/cm²; 9 minutos; 100mW/cm² foi mais letal aos micro-organismos quando comparado com tempo menor e taxa de fluência maior, 54J/cm²; 3 minutos; 300mW/cm². A maior taxa de fluência apresentou um aumento da inativação das leveduras. Concluíram que o tempo de irradiação e intensidade tem um papel importante na eficiência da PDT. A fluência não deve ser utilizada como parâmetro único para comparação dos resultados de fotoinativação de leveduras.

Souza et al. (2010) investigaram o efeito antibacteriano da PDT em 60 dentes humanos extraídos, utilizando os corantes azul de metileno (MB) ou azul de toluidina (TB), ambos na concentração de 15µg/mL. Os canais contaminados por sete dias com *Enterococcus faecalis* foram instrumentados, irrigados com NaOCl 2,5% ou NaCl 0,85% e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: MB/NaOCl, TB/NaOCl, MB/NaCl, TB/NaCl. Para PDT, o tempo de pré irradiação do corante foi de 2 minutos, irradiação realizada com laser diodo (P=40mW, λ= 660nm) com fibra óptica de 300µm, realizando movimentos em espiral, de apical para cervical, por um período de 4 minutos. As amostras de cada grupo, coletadas antes e depois da instrumentação/irrigação e após a PDT, foram semeadas e incubadas a 37°C, por 48 horas e as UFC contadas. O irrigante NaOCl foi significativamente mais eficaz que o NaCl. Independente do corante utilizado (MB ou TB), a PDT não aumentou a desinfecção

dos canais após instrumentação e irrigação com NaOCl, sendo necessários mais ajustes no protocolo da PDT antes da utilização na clínica.

Silva et al. (2010) com o objetivo de avaliar, *in vitro*, a efetividade da instrumentação associada à Terapia Fotodinâmica na eliminação de *Enterococcus faecalis*, utilizaram 20 dentes unirradiculares humanos, preparados e padronizados em 16mm. Em seguida, os canais foram instrumentados, ápices selados e a superfície externa impermeabilizada. Os dentes esterilizados foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular fixados com resina acrílica quimicamente ativada. Os canais preenchidos com 10µL de uma suspensão de *Enterococcus faecalis* e incubados a 37° C, por 14 dias sendo que a cada três dias adicionou-se 20µL de meio de cultura para manutenção das condições nutricionais. Após esse período, foi realizada coleta do conteúdo intracanal. Das 20 raízes dentárias humanas, 10 foram utilizadas no grupo teste, em que os canais foram instrumentados e preenchidos com associação do corante azuleno 25% e Endo-PTC durante 5 minutos e irradiados com laser de baixa intensidade ArGaAl, comprimento de onda 685 nm, por 3 minutos, com sistema de fibra óptica de 365 µm. No grupo controle, com 10 dentes, houve somente a instrumentação dos canais e realizou-se a segunda coleta do conteúdo intracanal. Em seguida, os dentes foram incubados por 7 dias e procedeu-se a terceira coleta intracanal. Após esse período, os canais receberam uma medicação intracanal de polimixina B associada a clorexidina gel 2% e foram incubados por 14 dias quando foi realizada a quarta coleta. Finalizando, realizou-se a remoção da medicação intracanal, os espécimes incubados por 7 dias com posterior coleta do conteúdo do canal radicular. Os resultados foram observados por meio da contagem de UFC/ml obtidas nas coletas do conteúdo intracanal, comparando os grupos teste e controle. Concluiu-se que a instrumentação associada à PDT frente ao *Enterococcus faecalis* foi efetiva, mas não eliminou totalmente o biofilme intracanal monoespécie. Após o uso de medicação intracanal, não houve diferença no número de UFCs de *Enterococcus faecalis* entre o grupo tratado com PDT e aquele em que foi utilizada apenas a instrumentação.

Rios et al. (2011) avaliaram o efeito da PDT usando azul de toluidina e emissão de luz com LED, no espectro vermelho e potência de 628nm, após desinfecção dos canais com NaOCl a 6%. Dentes extraídos tiveram suas coroas seccionadas e as raízes padronizadas em 12mm. Os canais foram instrumentados e irrigados com hipoclorito de sódio a 6% durante a instrumentação. Os ápices foram selados com cimento de ionômero de vidro. Os canais preenchidos com EDTA a 17%, por 3 minutos, seguido da lavagem final com NaOCl 6%. Os dentes foram autoclavados e

uma suspensão de *Enterococcus faecalis* inoculada por 2 semanas. As raízes foram divididas aleatoriamente nos seguintes grupos: (1) somente NaOCl; (2) somente TBO; (3) somente luz; (4) TBO/luz e (5) NaOCl/ TBO/ luz. Amostras bacteriológicas foram coletadas para contagem e cálculo das unidades formadoras de colônias e uma amostra de cada grupo selecionada e preparada para exame ao microscópio eletrônico de varredura. Os canais tratados com a PDT exibiram taxa de sobrevivência de 2,9% de *E. faecalis* enquanto a combinação de NaOCl seguido por PDT reduziu para 0,1%. Os autores concluíram que a PDT proporciona uma significativa redução adicional após a irrigação com NaOCl e pode ser um método efetivo na redução bacteriana do sistema de canais radiculares.

Carvalho et al. (2011) avaliaram a eficácia de algumas substâncias químicas na remoção do azul de metileno após a PDT. Quarenta dentes unirradiculares preparados foram preenchidos com azul de metileno (MB) 0,01% por 1 minuto e irradiados com laser diodo, $\lambda=660\text{nm}$, $P= 40\text{mW}$, por 240 segundos ($E=9,6\text{J}$). os espécimes foram divididos em 4 grupos de acordo com a substância utilizada para remover o corante: (1)NaOCl 2,5%; (2) NaOCl e Endo PTC; (3) álcool etílico 70% e (4) solução salina (controle). As coroas foram seccionadas e fixadas em um dispositivo. Fotografias foram tiradas antes da PDT, imediatamente após a PDT e após a remoção de corante. As alterações cromáticas foram avaliadas usando o Adobe Photoshop e valores foram determinados em quatro pontos fixos de cada coroa. Segundo os autores, protocolos para remover corantes devem ser aplicados após PDT a fim de minimizar o manchamento dental. Os protocolos testados neste estudo utilizando NaOCl 2,5%, associado ou não ao Endo-PTC, foram eficazes em evitar a coloração dos dentes causada pela MB durante PDT.

Alfenas et al. (2011) em uma revisão de literatura relataram que a PDT não deve substituir os procedimentos dos tratamentos convencionais, mas deve ser aprimorada e ser coadjuvante ao tratamento convencional, já que o laser de baixa intensidade é seguro, de fácil manipulação e aceitação pelo paciente, além de promover atividade antimicrobiana quando associado a um corante fotossensibilizador. As etapas de instrumentação, irrigação e medicação intracanal durante o tratamento endodôntico são essenciais para sucesso do tratamento, entretanto o melhoramento da técnica vem de encontro ao objetivo de proporcionar sempre um tratamento de maior qualidade.

3 PROPOSIÇÃO

O propósito do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* do sistema de canais radiculares, utilizando-se diferentes combinações da concentração do fotossensibilizante azul de toluidina e doses do laser diodo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora em março de 2011, Protocolo nº 306/2010 (Anexo A). O experimento foi desenvolvido no laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, BIOAGRO e no Núcleo de Microscopia e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa.

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Neste estudo foram utilizados 42 incisivos superiores extraídos de humanos, unirradiculares, obtidos junto ao Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (Anexo B), que apresentavam dimensões aproximadas, ápices completos e sem tratamento endodôntico prévio. Os dentes foram selecionados radiograficamente, com radiografias realizadas no sentido mesio-distal e vestibulo-lingual, e foram excluídos dentes com curvaturas ou dilacerações, com presença de lesões cariosas ou fraturas na porção radicular e com canal radicular de dimensões não apropriadas à padronização do estudo (SOUZA et al., 2010). Após remoção dos debris orgânicos remanescentes, os dentes cedidos foram armazenados em solução salina estéril para hidratação e estocados a 4°C até o momento do uso, quando foram esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos (BERGMANS et al., 2008; SCHOOP et al., 2006).

4.2 PREPARO E INSTRUMENTAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Para o preparo dos espécimes, os dentes selecionados foram seccionados transversalmente na região do limite amelocementário com disco diamantado de 0,2 mm de espessura dupla face (K.G. Sorensen Ind. Com.

Ltda, São Paulo, Brasil) acoplado a um mandril em micromotor, obtendo espécimes radiculares com comprimento padronizado em 15 mm (GORDUYSUS et al., 2010). Em seguida, foram realizados sulcos longitudinalmente nas raízes, no sentido vestibulo-lingual, de aproximadamente 0,5 mm, com o mesmo disco diamantado de tal modo que os espécimes pudessem ser clivados após o tratamento, para serem avaliados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) quanto à presença ou ausência de biofilmes bacterianos nos túbulos dentinários de acordo com Fimple et al. (2008) e Soukos et al. (2006).

Os canais foram explorados com lima Kerr calibre 10 (Dentsply/ Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça) e o comprimento real de trabalho foi determinado pela odontometria visual subtraindo-se 1,0mm no momento em que se observasse a lima no forame apical. Assim, estipulou-se o limite da instrumentação a um milímetro aquém do forame apical (GORDUYSUS et al., 2010).

O preparo do orifício do canal (3 mm) foi realizado com broca Gates-Glidden nº 3 (Dentsply/ Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça) (CARDOSO et al., 2008) e os canais instrumentados com limas rotatórias de níquel titânio do sistema ProTaper Universal (Dentsply/ Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça) utilizando-se o motor X-Smart (Dentsply/ Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça), de acordo com as recomendações do fabricante. Durante a instrumentação, uma lima tipo Kerr número 15 (Dentsply/ Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça) foi introduzida no canal até o nível do forame apical, procurando padronizar seu diâmetro e remover raspas de dentina e outros detritos que pudessem ser levados à porção apical do canal pelas manobras do preparo biomecânico. O preparo apical foi realizado até a lima F3.

Durante toda a instrumentação as limas foram intercaladas por irrigação com hipoclorito de sódio a 1% (Fórmula & Ação – São Paulo – Brasil), injetado nos canais por meio de seringa hipodérmica de 3mL e agulha intramuscular 20 x 5,5mm (BD – Paraná – Brasil), a cada troca de instrumento (ESTRELA et al., 2003).

Após o preparo biomecânico, os canais foram preenchidos com solução de ácido etilenodiaminotetraacético 17% (Biodinâmica Química e

Farmacêutica, Paraná, Brasil), por três minutos, para remoção da *smear layer*. Em seguida, os canais radiculares foram secos com cones de papel absorvente e preenchidos com 1mL da solução de hipoclorito de sódio 1% para neutralização (GORDUYSUS et al., 2010; SOUKOS et al., 2006).

Posteriormente, os canais foram lavados com solução salina estéril e secos com cones de papel F3 (Dentsply/ Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça).

4.3 VEDAMENTO E IMPERMEABILIZAÇÃO EXTERNA DAS RAÍZES

Todas as raízes dos dentes tiveram seu forame apical selado com resina composta fotopolimerizável (Filtek Z 250 – 3M, Campinas, Brasil) de acordo com a técnica preconizada para a confecção de restaurações dentárias, seguindo as instruções do fabricante (GARCEZ et al., 2007).

Em seguida, as raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de verniz de unha (Colorama - L'Oréal Brasil Comercial de Cosméticos Ltda – Rio de Janeiro – RJ – Brasil) aplicadas com o auxílio de um pincel, em toda extensão radicular, exceto na região cervical na entrada do canal, respeitando-se o tempo de trinta minutos entre a aplicação das mesmas (GARCEZ et al., 2007; GORDUYSUS et al., 2010; ZANIN et al., 2006).

Após o preparo biomecânico, o vedamento da região apical e a impermeabilização externa das raízes, todas as amostras foram imersas em recipiente com água destilada e autoclavadas a 121°C por 15 minutos (GARCEZ et al., 2007; GORDUYSUS et al., 2010; SEAL et al., 2002).

4.4 INCLUSÃO EM PLACAS DE POLIESTIRENO

Depois de esterilizadas, as raízes foram distribuídas aleatoriamente em placas de poliestireno para cultura de células (Greiner Bio-one, Americana, São Paulo, Brasil) e incluídas assepticamente com resina acrílica quimicamente ativada (Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, Brasil) nos 5mm apicais

(CARDOSO et al., 2008; SILVA et al., 2010). Foram utilizadas nove placas de cultura de 48 poços, de modo que duas placas continham três espécimes e as outras sete placas com seis espécimes em cada. As duas placas com três espécimes foram utilizadas para os grupos controle e as demais para os grupos experimentais (Figura 1). Os espécimes foram intercalados nos orifícios, para facilitar o tratamento.

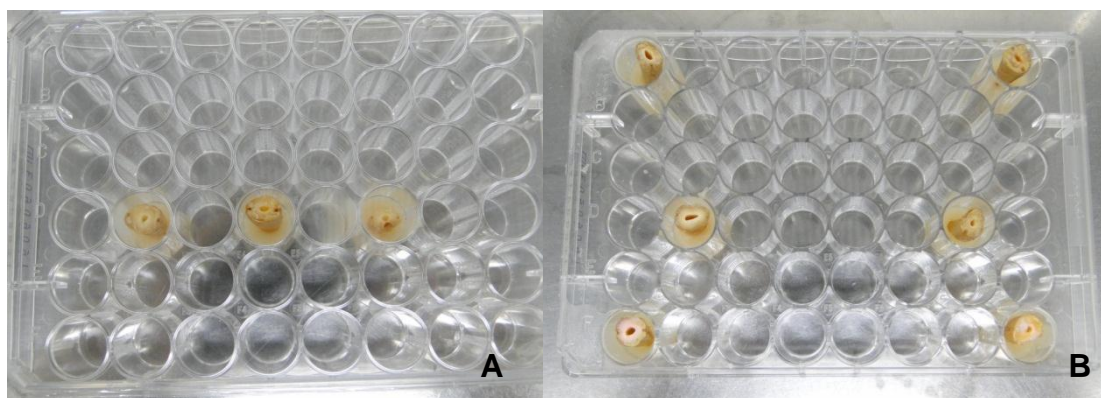


Figura 1 – Distribuição dos grupos controle (A) e dos grupos experimentais (B) em placas de cultura de células contendo 48 micropoços

4.5 OBTENÇÃO DA SUSPENSÃO DE *Enterococcus faecalis*

Colônias isoladas da cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) foram reativadas em 3 mL de BHI (*Brain Infusion Hearth*) (Himedia – Curitiba – PR – Brasil) e mantidas a 37° C, 150 rpm, por 12 horas. Após este período foi realizada diluição seriada da suspensão bacteriana, e estas plaqueadas por *pour plate* em meio Ágar BHI. As placas foram submetidas à temperatura de 37 °C por 18-24 horas e as placas contendo 25 a 30 colônias foram selecionadas para contagem e posterior cálculo de UFC/mL da amostra original. A cultura utilizada apresentava 1×10^9 UFC/mL.

4.6 CONTAMINAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Todos os espécimes dos grupos experimentais e do grupo controle positivo, foram preenchidos com soro fetal bovino, mantidos em temperatura ambiente por 12 horas antes da contaminação dos mesmos, em condições de assepsia. Dez microlitros da suspensão de *Enterococcus faecalis* (1×10^7 UFC/mL) foram injetados dentro do sistema de canais radiculares por meio de seringa para insulina de 0.3 cc (BD Ultra-Fine – New Jersey – Estados Unidos). A suspensão bacteriana foi levada em todo o comprimento do canal, com auxílio de uma lima estéril tipo Kerr calibre 15 (SOUZA et al., 2010). Em seguida, os poços adjacentes aos espécimes foram preenchidos com solução salina 0,85% estéril para assegurar a umidade do ambiente. A tampa da placa foi fechada, vedada com papel-filme, e o conjunto mantido em estufa a 37°C. Após 24 horas, mais dez microlitros da mesma suspensão de *Enterococcus faecalis* foram injetados dentro do sistema de canais radiculares e a solução salina presente nos poços foi trocada. Para manutenção das condições nutricionais, a cada 48 horas foram acrescentados 20µL de meio BHI líquido estéril no interior dos canais, com o auxílio de uma seringa de insulina. A solução salina presente nos poços das placas também foi renovada a cada 48 horas ao longo de 21 dias. Depois deste período procedeu-se aos tratamentos descritos a seguir.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As quarenta e duas raízes foram divididas aleatoriamente em dois grupos controle e doze grupos experimentais, com três amostras cada, de acordo com o tratamento a ser realizado (Tabela 1).

Grupo 1 (controle negativo): as raízes não foram contaminadas com a suspensão bacteriana e não receberam nenhum tipo de tratamento. Este grupo foi realizado para verificar a ausência de bactérias nos canais radiculares.

Grupo 2 (controle positivo): as raízes foram contaminadas com a suspensão bacteriana, mas não receberam nenhum tipo de tratamento com laser ou

fotossensibilizador. Este grupo foi realizado para o controle da contaminação dos canais radiculares.

Grupo 3: os canais contaminados foram submetidos à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando o corante azul de toluidina a 0,5µg/mL (Fórmula & Ação – São Paulo – Brasil), como fotossensibilizante e a irradiação com laser de baixa intensidade.

O equipamento utilizado nesse estudo para PDT foi o laser de diodo AsGaAl (arseneto gálio alumínio), de baixa intensidade, modelo Photon Lase III (DMC Equipamentos Ltda. – São Carlos – SP – Brasil) atuando na faixa espectral do vermelho com comprimento de onda de 660 nm (vermelho) com uma banda de ± 10 nm e potência de 100 mW (PRATES et al., 2010) (Figura 2). Um sistema de fibra óptica foi acoplada à ponta da caneta do laser (Figura 3).

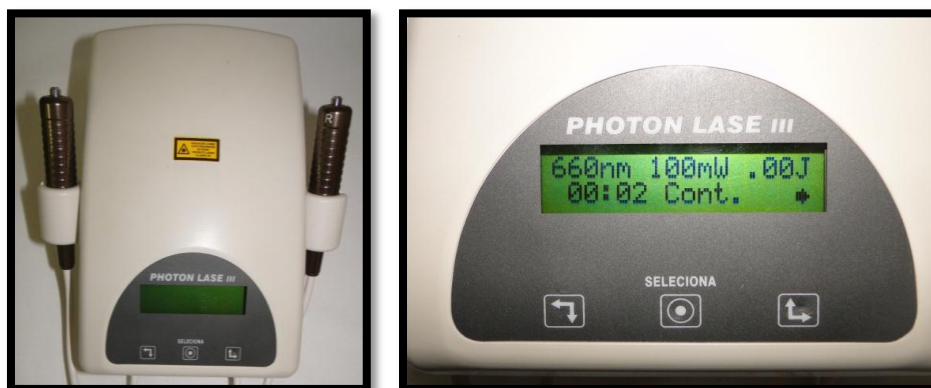


Figura 2 – Equipamento Photon Lase III (DMC) – laser de diodo de baixa intensidade.

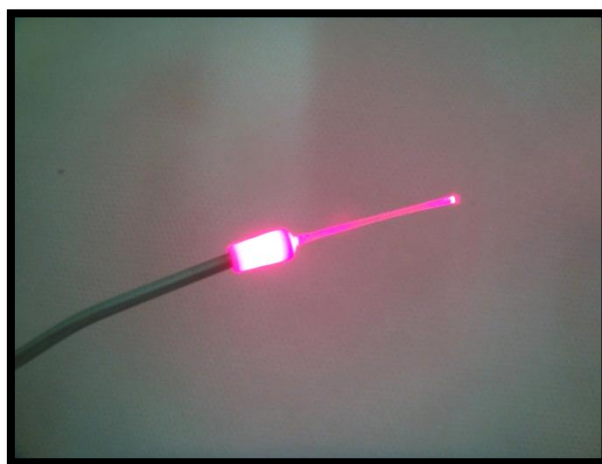


Figura 3 – Fibra óptica (DMC).

Seguindo o protocolo preconizado por Soukos et al. (2006), os canais foram preenchidos com azul de toluidina (TBO) 0,5 μ g/mL, por meio de uma seringa para insulina de 0.3 cc (BD Ultra-Fine – New Jersey – Estados Unidos), por um período de 5 minutos (Figura 4) em condições de assepsia, em capela de fluxo laminar.

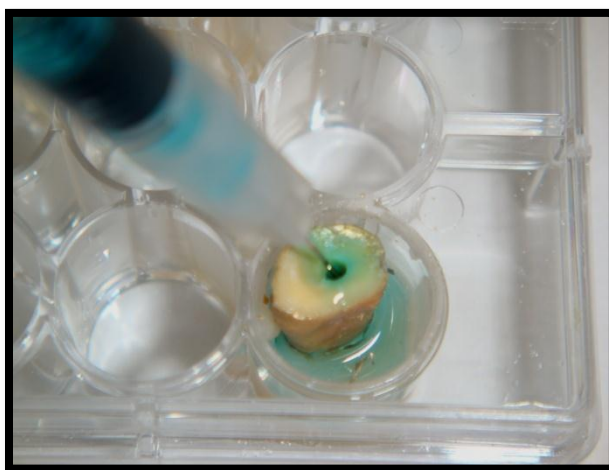


Figura 4 – Preenchimento dos canais com azul de toluidina 5 μ g/mL.

Em seguida, os espécimes foram irradiados com laser de diodo, no comprimento de onda 660nm, utilizando o sistema de entrega por fibra óptica de 600 μ m e abertura numérica de 0,48 (Figura 5). A irradiação foi realizada por 60 segundos seguindo a técnica helicoidal sugerida por Gutknecht et al. (2005), na qual a fibra é inserida a um milímetro aquém do ápice e recuada em movimentos helicoidais possibilitando a irradiação em todas as paredes do canal radicular.

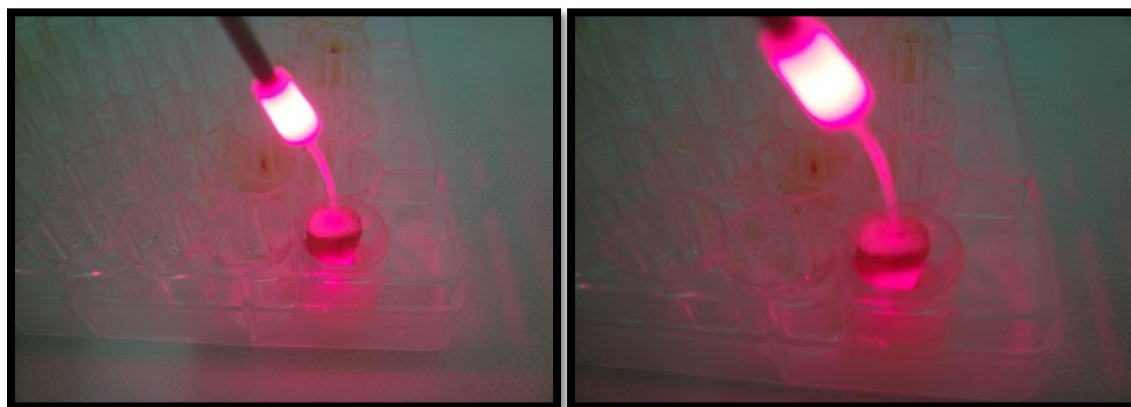


Figura 5 – Irradiação laser com fibra óptica intracanal.

Grupo 4 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 0,5µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados do mesmo modo que o grupo 3, por um período de 120 segundos.

Grupo 5 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 0,5µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 300 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 6 - os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 0,5µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 600 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 7 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 5µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 60 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 8 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 5µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 120 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 9 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 5µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 300 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 10 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 5µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 600 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 11 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 10µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 60 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 12 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 10µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 120 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 13 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 10µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 300 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Grupo 14 – os canais contaminados foram corados com azul de toluidina 10µg/mL como descrito no grupo 3 e irradiados com laser por 600 segundos, do mesmo modo que o grupo 3.

Tabela 1 – Grupos experimentais e parâmetros utilizados para realização da Terapia Fotodinâmica

GRUPO	CONCENTRAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZANTE	TEMPO DE IRRADIAÇÃO DO LASER	DOSE DO LASER
1	—	—	—
2	—	—	—
3	TBO 0,5µg/mL	60 segundos	E = 6J
4	TBO 0,5µg/MI	120 segundos	E = 12J
5	TBO 0,5µg/mL	300 segundos	E = 30J
6	TBO 0,5µg/mL	600 segundos	E = 60J
7	TBO 5,0µg/mL	60 segundos	E = 6J
8	TBO 5,0µg/mL	120 segundos	E = 12J
9	TBO 5,0µg/mL	300 segundos	E = 30J
10	TBO 5,0µg/mL	600 segundos	E = 60J
11	TBO 10µg/mL	60 segundos	E = 6J
12	TBO 10µg/mL	120 segundos	E = 12J
13	TBO 10µg/mL	300 segundos	E = 30J
14	TBO 10µg/mL	600 segundos	E = 60J

Após o tratamento com PDT, todos os espécimes foram lavados com 3mL de solução salina estéril para remoção do corante utilizado (GARCEZ et al., 2006).

Antes e após a realização dos tratamentos, as amostras intrarradiculares foram coletadas, diluídas, semeadas e incubadas por 24 horas para a contagem das colônias bacterianas para calcular o número de UFC/mL, em todos os grupos estudados.

4.8 CONDIÇÕES DE COLETA DAS AMOSTRAS

4.8.1 COLETA PRÉVIA AO TRATAMENTO

Antes da realização de cada tratamento todos os espécimes foram lavados com solução salina 0,85%.

Após 21 dias de contaminação experimental (HAASPALO e ÖRSTAVIK, 1987), foi introduzido no interior de cada canal radicular um cone de papel absorvente esterilizado Protaper F2 Maillefer (Dentsply/ Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça), durante um minuto. Com auxílio de pinça clínica estéril, cada cone retirado do canal foi colocado em Eppendorf contendo solução salina 0,85% esterilizada e agitados por trinta segundos em Vortex. Esse procedimento permite a liberação de bactérias absorvidas pelo cone de papel e a dispersão das mesmas. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI. Todas as placas semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica 37°C por 24 horas e, após esse período, procedeu-se a contagem e o cálculo do número de unidades formadoras de colônias por mL (GARCEZ et al., 2006; GORDUYSUS et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

4.8.2 COLETA PÓS TRATAMENTO

Imediatamente após término dos tratamentos, a coleta foi realizada com cone de papel esterilizado F2 (Dentsply/Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça), o qual permaneceu no interior do canal radicular por período de um minuto. Com auxílio de pinça clínica estéril, cada cone retirado do canal foi colocado em microtubos de polipropileno (1,5 mL) contendo solução salina 0,85% esterilizada e agitados por trinta segundos em Vortex. Esse procedimento permite a liberação de bactérias adsorvidas pelo cone de papel e a dispersão das mesmas. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 1mL foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI.

Todas as placas semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica 37 °C por 24 horas e, após esse período, procedeu-se a contagem e o cálculo do número de UFC/ L (Figura 6).

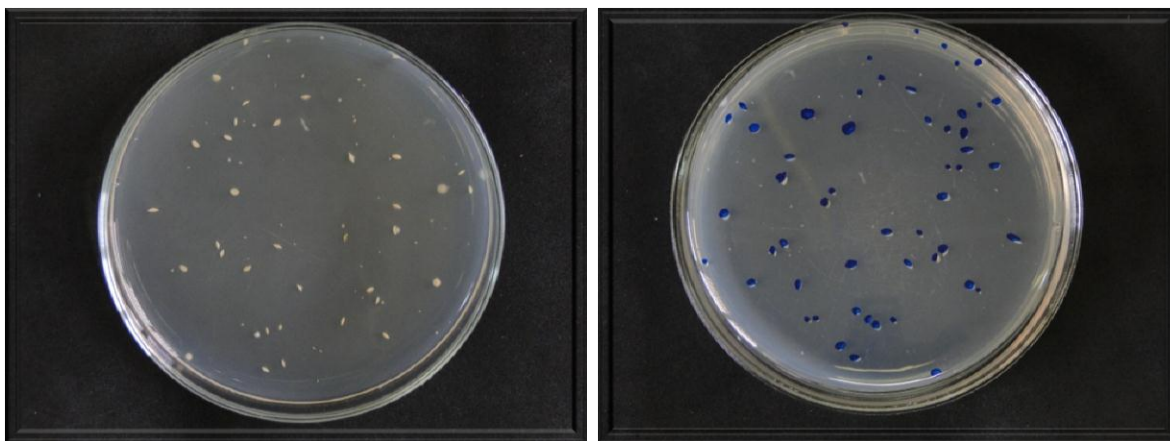


Figura 6 – Crescimento de colônias em meio Agar BHI. Plaqueamento por pour plate, alíquota de 0,1 mL.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para confirmar a formação de biofilme e a colonização das paredes do canal, os espécimes foram preparados para observação em um microscópio eletrônico de varredura (LEO – modelo 1430VP). Foram selecionados

aleatoriamente um espécime de cada grupo controle e dois espécimes de cada grupo experimental para serem analisados no microscópio eletrônico de varredura. Os espécimes selecionados foram preenchidos com uma solução fixadora de glutaraldeído 2,5% por 24 horas. Após este período, os espécimes foram lavados com solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 (RIOS et al., 2011). Em seguida, as raízes foram seccionadas e clivadas, no sentido vestibulo-lingual, com um martelo cirúrgico apoiado em um bisel de aço, seguindo o protocolo realizado por Moreira et al. (2010) (Figura 7).

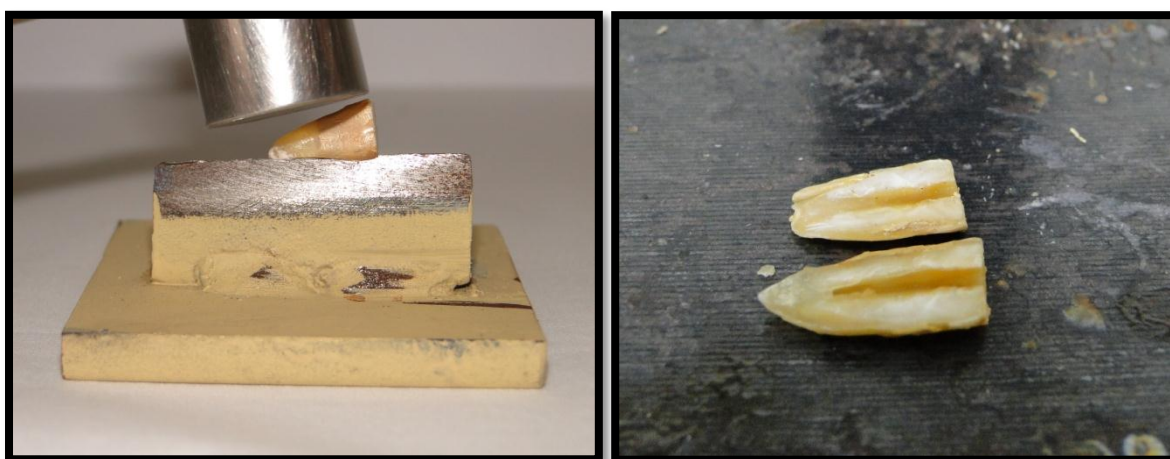


Figura 7 – Clivagem dos espécimes para posterior visualização por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Após a fixação, as amostras foram desidratadas com concentrações ascendentes de etanol 30°, 50°, 70°, 80°, 90° e 100° Gay Lussak - GL com intervalo de 20 minutos entre cada troca. Posteriormente, o material foi transferido para secador ao ponto crítico (critical Point Dryer – CPD®, Bal-Tec 030) para desidratação completa. Ao final desta etapa, o material foi metalizado em metalizadora Balzers® modelo FDU 010 e analisado em um microscópio eletrônico de varredura e as imagens, registradas em computador, nos aumentos de 3000, 5000, 7000 e 10000 vezes.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificação da distribuição amostral, relativo às contagens de unidades formadoras de colônias, foram utilizados os testes de homogeneidade de variância Bartlett e o teste de normalidade de Lilliefors (Apêndice A). O resultado encontrado não foi significativo, pois os dados não possuem variância homogênea. Como possuem distribuição normal, procedeu-se à análise de variância com nível de significância estabelecido em 1% ($p < 0,01$) complementado pela aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey para verificação da diferença de redução bacteriana dentro de cada grupo, antes e depois do tratamento realizado disponibilizados nos Apêndices B e C.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS APLICADOS NA REDUÇÃO DA POPULAÇÃO BACTERIANA

A eficácia antimicrobiana dos tratamentos realizados foi avaliada pela sobrevivência de células de *E. faecalis* após os tratamentos e cálculo e contagem do número de unidades formadoras de colônias de *Enterococcus faecalis* por mililitro (UFC/mL).

No grupo controle negativo não houve crescimento de *Enterococcus faecalis* após o tempo de incubação. No grupo controle positivo e nos grupos experimentais, observa-se o crescimento bacteriano, após o tempo de incubação de 21 dias (Figura 8).

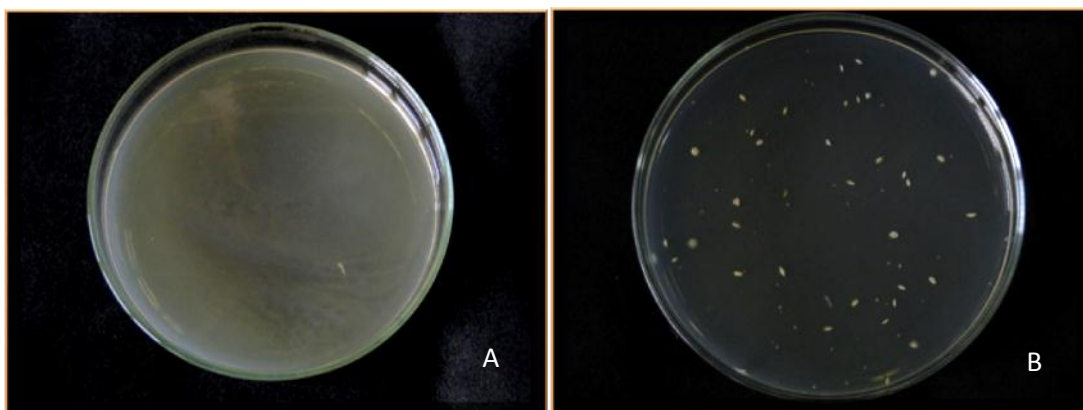


Figura 8 –Avaliação dos controles experimentais. (A) Controle negativo. (B) Controle positivo. O volume de 1 mL foi plaqueado pelo método de pour plate e as placas mantidas à 37°C por 24 horas, diluição 10^3 .

Os resultados relativos aos quatorze grupos foram baseados nas médias do número de UFC/mL de cada diluição para cada tratamento, antes (tempo 1) e depois do tratamento (tempo 2), e no cálculo das porcentagens de redução (Tabela 2). As médias de UFC/mL obtidas para os quatorze grupos, após os tratamentos, estão apresentadas na Figura 9.

Tabela 2 – Médias iniciais e finais das populações de *E. faecalis* presentes nos espécimes avaliados em valores exponenciais (número), médias das porcentagens de redução (%) e desvio padrão (DP) dos grupos experimentais, incluindo os grupos controles

	Número (UFC/mL)		% de redução (X)	DP desvio padrão
	TEMPO 1	TEMPO 2		
G1	$3,8 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	18,59	0.50
G2	0	0	-	0
G3	$2,53 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	-40,86	0.73
G4	$2,4 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	-33,00	0.55
G5	$1,1 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	-22,42	0.16
G6	$3,8 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	57,45	1.53
G7	$1,2 \times 10^6$	$0,80 \times 10^4$	93,18	7.75
G8	$1,2 \times 10^6$	$2,14 \times 10^5$	82,49	7.15
G9	$6,2 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5$	65,43	2.86
G10	$7,1 \times 10^5$	$0,47 \times 10^5$	93,28	4.67
G11	$1,3 \times 10^6$	$2,22 \times 10^5$	82,83	7.57
G12	$0,32 \times 10^6$	$1,87 \times 10^5$	81,86	5.97
G13	$6,6 \times 10^5$	$0,86 \times 10^5$	87,01	4.07
G14	$5,8 \times 10^5$	$0,96 \times 10^5$	83,39	3.43

G1: controle positivo; G2: controle negativo; G3: PDT – TBO 0,5µg/mL / 1min; G4: PDT – TBO 0,5µg/mL / 2 min; G5: PDT – TBO 0,5µg/mL / 5min; G6: PDT – TBO 0,5µg/mL / 10min; G7: PDT – TBO 5µg/mL / 1min; G8: PDT – TBO 5µg/mL / 2min; G9: PDT – TBO 5µg/mL / 5min; G10: PDT – TBO 5µg/mL / 10min; G11: PDT – TBO 10µg/mL / 1min; G12: PDT – TBO 10µg/mL / 2min; G13: PDT – TBO 10µg/mL / 5min; G14: PDT – TBO 10µg/mL / 10min

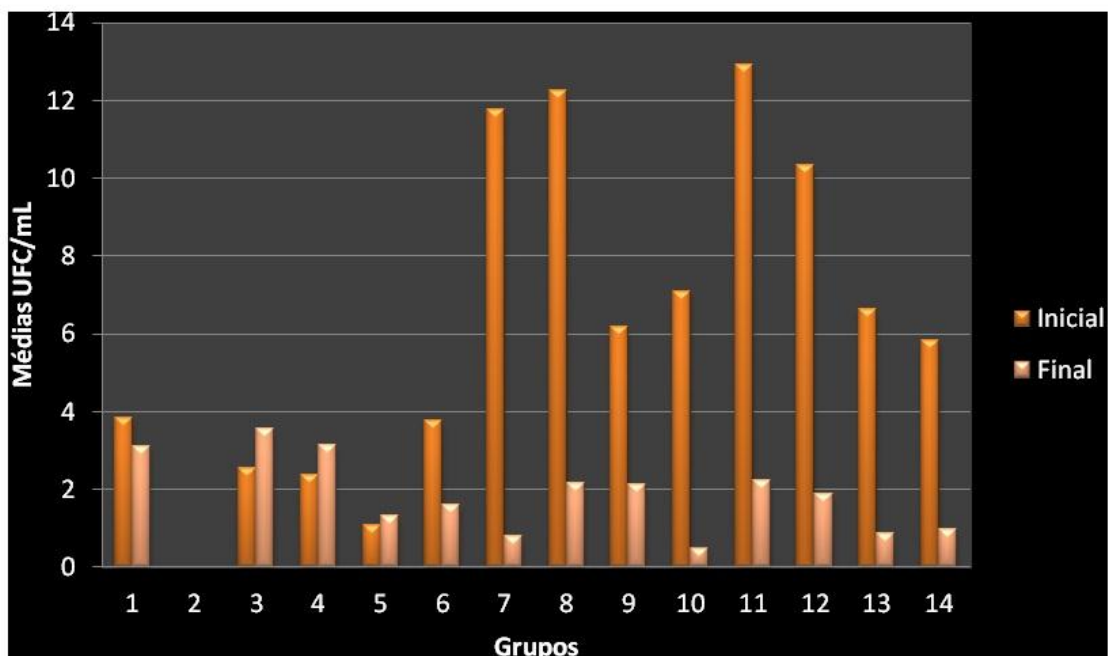


Figura 9 – Sobrevivência bacteriana a diferentes tratamentos realizados a partir das contagens antes e depois dos tratamentos.

Na figura 10 estão ilustradas as médias de redução das unidades formadoras de colônias por mL, após os tratamentos. A diferença mínima significativa (DMS) para esta variável foi de 2.8604.

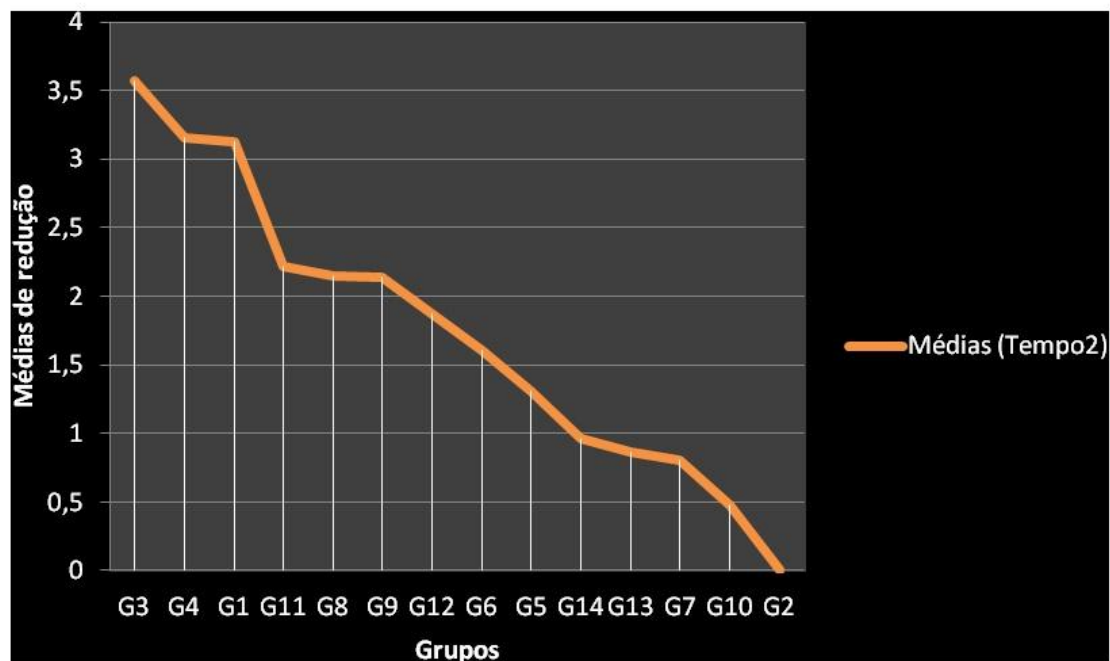


Figura 10 – Representação gráfica das médias de redução de UFC/mL, no tempo 2, ao nível de significância de 5% por meio do teste de Tukey.

Na figura 11 estão ilustradas as médias das porcentagens de redução de UFC/mL, desvio padrão e análise estatística entre os grupos, ao nível de significância de 5% por meio do teste de Tukey

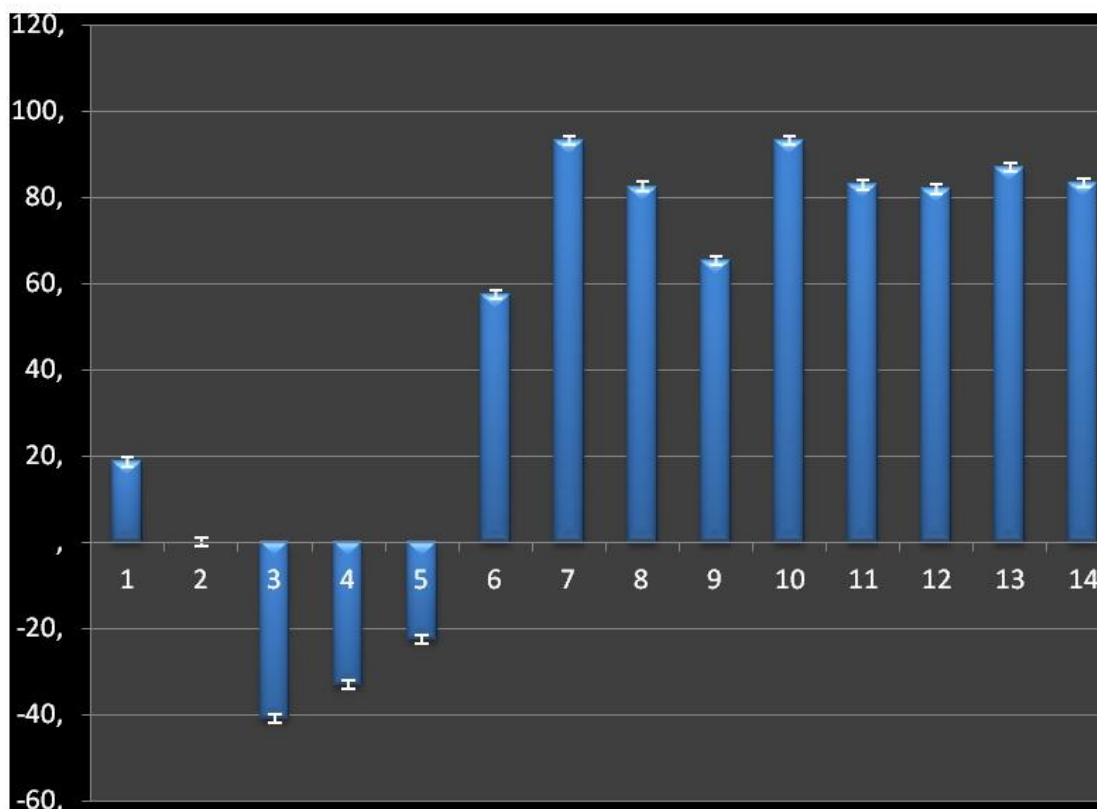


Figura 11 – Representação gráfica das médias das porcentagens de redução de UFC/mL, desvio padrão e análise estatística entre os grupos. Barras representadas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5 % por meio do teste de Tukey.

Nas tabelas 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24, encontram-se os valores absolutos e médias dos micro-organismos, para cada amostra, antes e após os tratamentos, tempo 1 e tempo 2, respectivamente.

5.2 AVALIAÇÃO AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

Observou-se a formação do biofilme de *E. faecalis* na superfície dentinária intracanal, por meio de microscopia eletrônica de varredura, nas amostras analisadas do grupo positivo. No grupo controle negativo, não foi possível detectar bactéria nas amostras analisadas. (Figura 12).

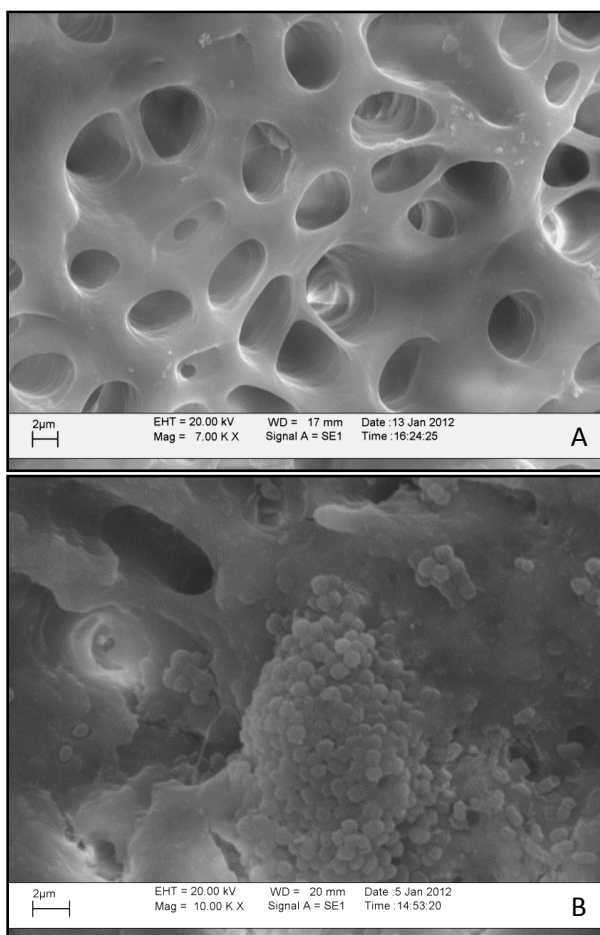


Figura 12: Fotomicrografia eletrônica de varredura da região de dentina radicular. A - controle negativo e B – controle positivo.

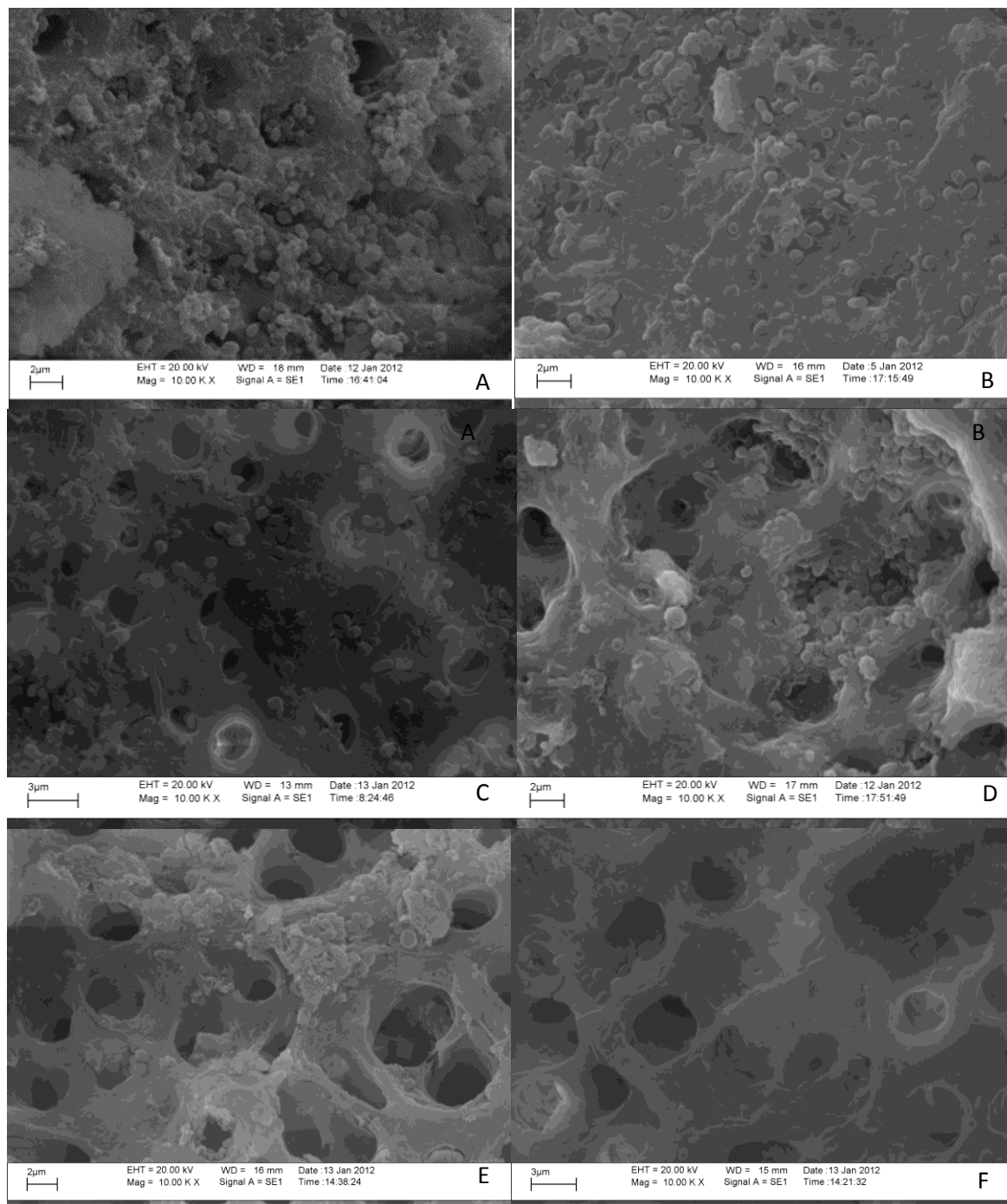


Figura 13: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos dentes de cada grupo que apresentaram redução bacteriana significativa. A - grupo 6, B - grupo 6, C - grupo 7, D - grupo 7, E - grupo 8, F - grupo 8.

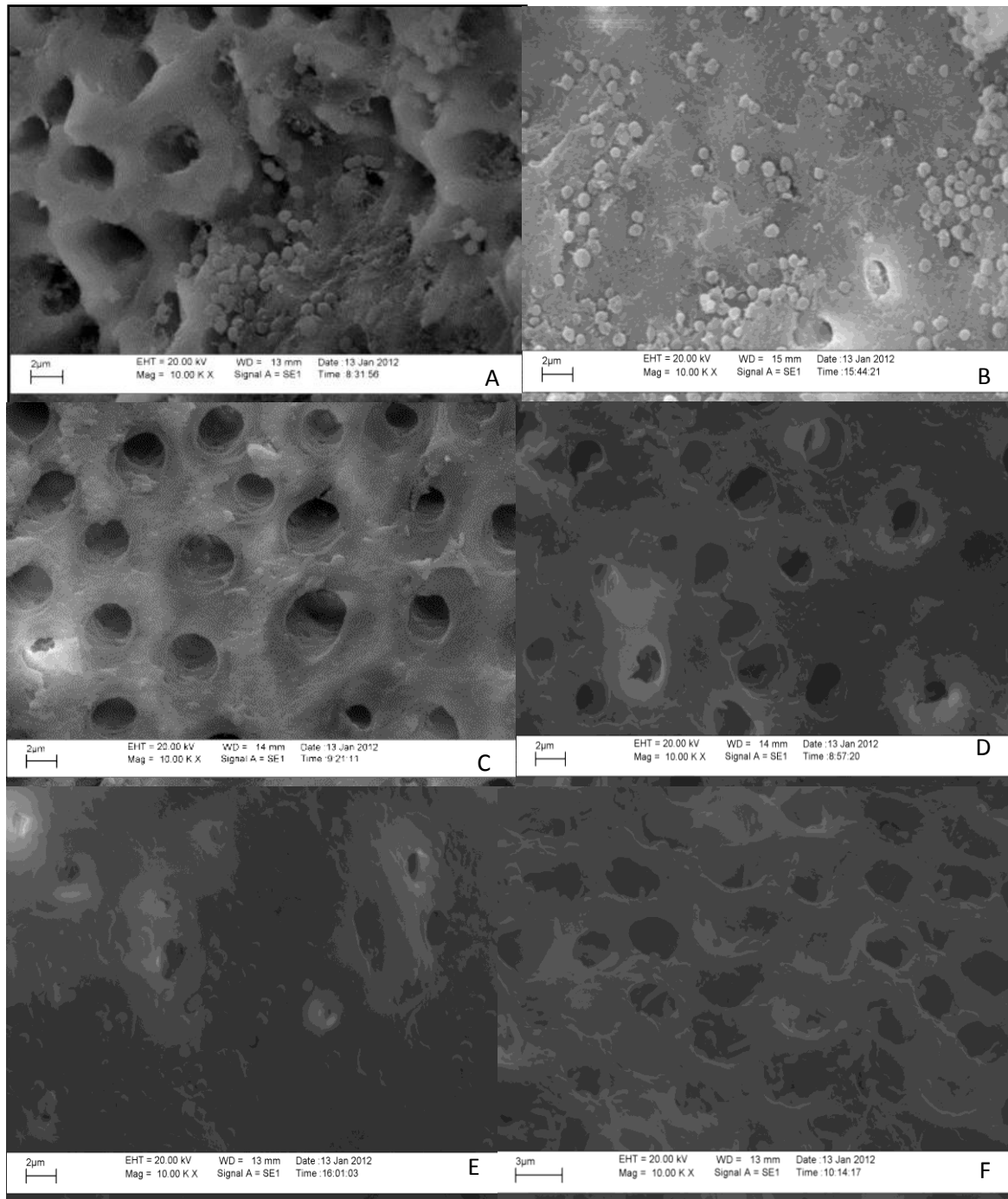


Figura 14: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos dentes de cada grupo que apresentaram redução bacteriana significativa. A - grupo 9, B - grupo 9, C - grupo 10, D - grupo 10, E - grupo 11, F - grupo 11.

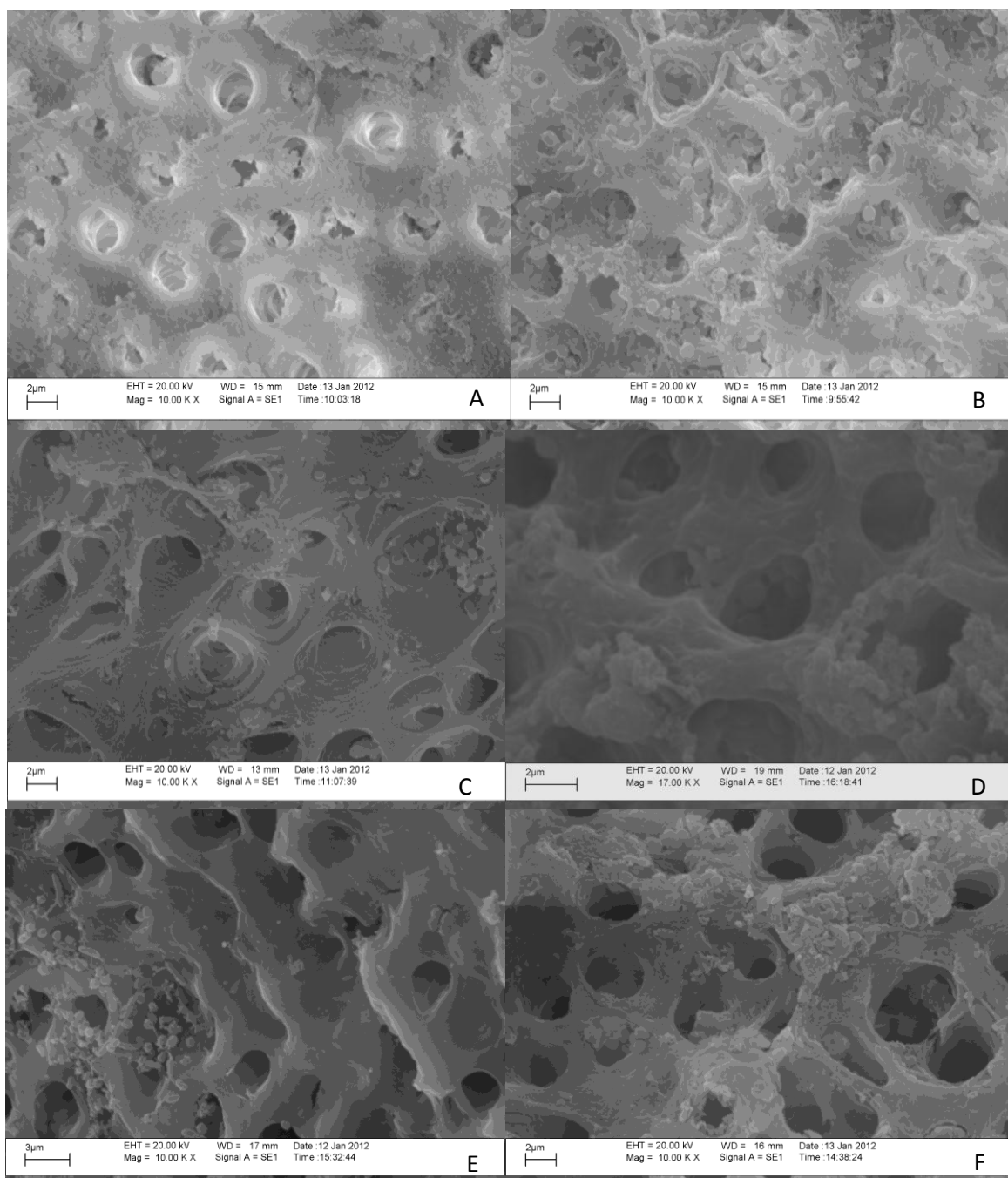


Figura 15: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos dentes de cada grupo que apresentaram redução bacteriana significativa. A - grupo 12, B - grupo 12, C - grupo 13, D - grupo 13, E - grupo 14, F - grupo 14.

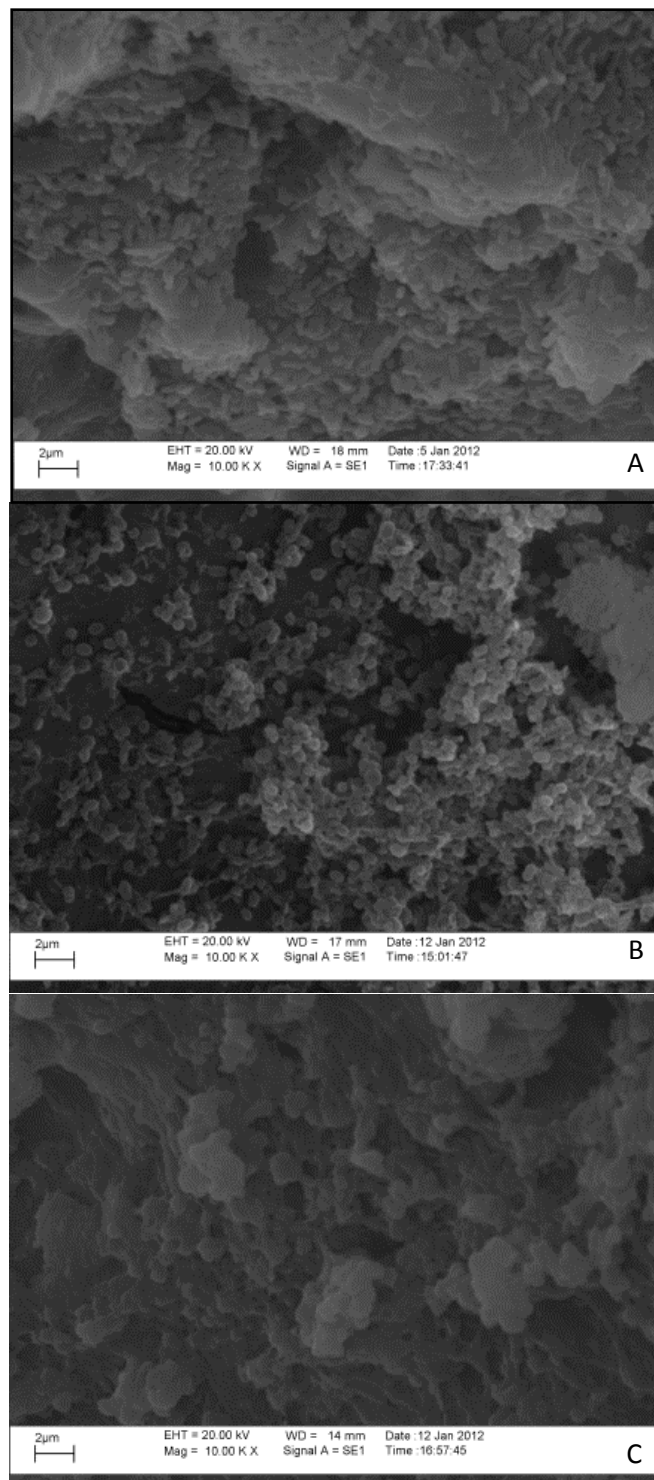


Figura 16: Fotomicrografia eletrônica de varredura na região de dentina radicular dos grupos que não apresentaram redução bacteriana (A – grupo 3, B – grupo 4 e C – grupo 5).

6 DISCUSSÃO

A ocorrência e a freqüência da infecção endodôntica estimularam a busca para obtenção de novos sistemas, novas técnicas e substâncias antimicrobianas, que sejam aplicáveis na Endodontia, especialmente no que se refere ao controle microbiano do complexo sistema de canais radiculares visando melhores resultados no tratamento.

Dessa forma, a laserterapia vem conquistando seu espaço. Tanto o laser de alta como o de baixa intensidade podem ter ações antimicrobianas muito eficazes sendo considerados na literatura como eficiente coadjuvante na redução microbiana intracanal (BERGMANS et al., 2006; ELDENIZ et al., 2007; KREISLER et al., 2003; MORITZ et al., 1997; SCHOOP et al., 2004; SCHOOP et al., 2006; WALSH, 1997). A vantagem da utilização do laser é que a complexidade anatômica dos canais não é vista como obstáculo, já que a luz pode ser redirecionada em virtude da sua transmissão através dos prismas de esmalte e túbulos dentinários (SEAL et al., 2002).

A desvantagem do laser de alta intensidade é que pode gerar um aumento de temperatura indesejado. Já o laser de baixa intensidade tem a capacidade de alterar células, sem aumento da temperatura. No entanto, o laser de baixa intensidade só consegue ação bactericida se associado a um agente fotossensibilizante (WALSH, 1997), sendo denominada de Terapia Fotodinâmica (em inglês *Photodynamic Therapy* – PDT). Esta técnica é bastante indicada na eliminação de micro-organismos, por apresentar atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas antibiótico-resistentes, leveduras, vírus e parasitas (SCHACKLEY et al., 1999).

O processo da PDT é relativamente simples em que a eliminação dos micro-organismos está relacionada com a associação de um agente fotossensibilizante com uma fonte de luz que produz espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, que são tóxicas para os micro-organismos (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007).

A PDT está sendo estudada como uma terapia promissora para erradicar bactérias patogênicas, devido à sua seletiva ação antimicrobiana, pois em baixas concentrações apresenta-se letal aos micro-organismos sem causar injúrias ao hospedeiro (KÖMERIK et al., 2002). Outra vantagem apresentada é que até o momento não existem evidências de resistência microbiana utilizando esta técnica. Como a morte da célula microbiana é rápida, não é necessária a manutenção do agente químico por longos períodos no local do tratamento (WILSON et al. 2005).

Diante do exposto, justifica-se a utilização da PDT como complemento ao tratamento endodôntico convencional na eliminação de micro-organismos resistentes e persistentes no sistema de canais radiculares.

Neste estudo foram utilizados dentes humanos extraídos, conservados em solução salina e refrigerados a 4°C até o momento do uso, conforme protocolo utilizado por Bergmans et al. (2008) e Schoop et al. (2006).

Antes da instrumentação dos canais realizou-se o alargamento cervical inicial com broca Gates-Glidden nº 3 facilitando a ação dos instrumentos rotatórios (CARDOSO et al., 2008). A instrumentação rotatória além dos objetivos de ampliação e modelagem do canal diminui o tempo despendido na instrumentação. Os valores de velocidade e torque foram estabelecidos pelo fabricante. A instrumentação complementada pela irrigação com hipoclorito de sódio 1% e irrigação final com EDTA 17% e hipoclorito de sódio 1%, permite aumentar a permeabilidade dentinária. Neste estudo, os objetivos da remoção da *smear layer* foram facilitar a contaminação dos canais com a suspensão bacteriana, para melhor penetração das bactérias nos túbulos dentinários e melhorar a penetração do agente fotossensibilizante, no momento da Terapia Fotodinâmica.

O micro-organismo, *Enterococcus faecalis*, foi selecionado para o presente estudo por este estar comumente relacionado às infecções endodônticas persistentes, secundárias, recorrentes e aos dentes obturados com falha durante o tratamento (DUNAVANT et al., 2006; STUART et al., 2006; ZOLETTI et al., 2006). Além da capacidade de penetrar em profundidade nos túbulos dentinários, da habilidade de formar biofilme e da sua resistência aos agentes antimicrobianos na terapia endodôntica convencional (HABASH e REID, 1999; JOHNSON et al., 2006; LOVE et al., 2001; SUNDQVIST et al., 1998; VIVACQUA-GOMES et al., 2005).

O número de UFC/mL observado na literatura varia de 10^4 a 10^9 (GARCEZ et al., 2007; GORDUYSUS et al., 2010; MORITZ et al., 1997; SOUZA et al., 2010; SUNDQVIST, 1992). Nesse experimento, inoculou-se uma quantidade de bactérias de aproximadamente 10^7 UFC/mL, para que permanecessem viáveis até o final do período de incubação.

A suspensão de 10µL inoculada no interior do conduto foi similar à maioria dos estudos nos quais os efeitos bactericidas da PDT foram pesquisados (GARCEZ et al., 2007; MORITZ et al., 1997; PRATES et al., 2010).

O tempo de contaminação experimental dos espécimes foi estabelecido em 21 dias de acordo com Haapasalo e Orstavik (1987). Esses autores, bem como Akpata e

Blechman (1982), verificaram que o tempo de infecção prolongado leva a uma maior quantidade de túbulos infectados. No entanto, verifica-se na literatura diferenças metodológicas relativas ao tempo de permanência do inóculo no interior dos canais, como 24 horas (GARCEZ et al., 2006), 48 horas (FONSECA, 2008; SEAL et al., 2002), 72 horas (SOUKOS et al., 2006; GARCEZ et al., 2007; ZANIN et al., 2005), 7 dias (SOUZA et al., 2010; RIOS et al., 2011; ZANIN et al., 2005), 10 dias (ZANIN et al., 2005) E 14 dias (RIOS et al., 2011).

O grupo controle negativo foi inoculado apenas com meio de cultura estéril, sem suspensão bacteriana e nenhum tratamento foi realizado. Quando avaliado pela contagem e cálculo das unidades formadoras de colônias, como esperado não apresentou crescimento em nenhuma das diluições realizadas. O cultivo de bactérias utilizando meios de cultura é empregado por mais de um século na identificação dos micro-organismos patogênicos e uma vantagem desta técnica é investigar a fisiologia e patogenicidade das espécies microbianas (SIQUEIRA e RÔÇAS, 2005). Esses dados foram confirmados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV).

No grupo controle positivo, os espécimes foram contaminados com a suspensão bacteriana, mas não receberam nenhum tipo de tratamento. Na contagem de UFC/mL houve crescimento bacteriano e ao MEV observou-se a formação de biofilme de *Enterococcus faecalis* com intenso aglomerado bacteriano nas paredes dentinárias do canal.

Atualmente diversos fotossensibilizantes estão sendo empregados nos estudos da PDT, dentre os quais o azul de metileno e o azul de toluidina (TEICHERT et al., 2002; SOUKOS et al., 2006; USACHEVA et al., 2003; WILLIAMS et al., 2003).

A banda de absorção do azul de toluidina está entre 620nm a 700nm, o que possibilitou a fotossensibilização das bactérias no presente estudo com o laser utilizado (GARCEZ et al., 2003).

Diversas pesquisas utilizaram diferentes concentrações do azul de toluidina, de 0,1µg/mL a 200µg/mL (BERGMANS et al., 2008; DOBSON e WILSON, 1992; FONSECA et al., 2008; KÖMERIK et al., 2002; KÖMERIK et al., 2003, SEAL et al., 2002; SOUZA et al., 2010; TEICHERT et al., 2002; ZANIN et al., 2005; ZANIN et al., 2006) apresentando resultados satisfatórios. Cabe ressaltar que existe a possibilidade de manchamento dental pelo azul de toluidina, uma vez que alterações cromáticas coronárias foram constatadas no estudo de Gonçalves (2005). Esta é uma preocupação entre os pesquisadores e estudos têm buscado utilizar menores concentrações (CARVALHO et al., 2011; GARCEZ et al., 2006; GONÇALVES, 2005;

SEAL et al., 2002; SOUZA et al., 2010; ZANIN et al., 2006), para minimizar esse dano. Em vista disso, as concentrações de 0,5µg/mL, 5µg/mL ou 10µg/mL foram utilizadas neste estudo por serem consideradas concentrações baixas.

O tempo necessário para a fixação do fotossensibilizante no interior da bactéria é conhecido como tempo de pré-irradiação (TPI) e é de fundamental importância para a realização do efeito antibacteriano (SEAL et al., 2002; ZANIN et al., 2002). O TPI estabelecido para este estudo foi de 5 minutos, de acordo com as pesquisas de Garcez et al. (2006) e Soukos et al. (1996).

Em relação à fonte de luz utilizada na Terapia Fotodinâmica, são importantes o comprimento de onda que o fotossensibilizador é capaz de absorver, a potência do aparelho e o tempo de exposição. Em função dos valores da potência e do tempo, obtêm-se a quantidade de energia transferida ao alvo.

Na PDT qualquer fonte de luz pode ser utilizada, desde que seja coerente com o pico de absorção do agente fotossensibilizante. A maioria dos trabalhos associa a Terapia Fotodinâmica com o laser de diodo (GARCEZ et al., 2008; KÖMERICK et al., 2003; PRATES et al., 2006; SOUZA et al., 2006; ZANIN et al., 2006), embora alguns trabalhos demonstrem resultados satisfatórios com o uso do LED (RIOS et al. 2011; ZANIN et al., 2005). No presente estudo utilizou-se o laser de diodo arseneto gálio alumínio (AsGaAl), de baixa intensidade, modelo Photon Lase III (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, SP, BR) de emissão contínua, com comprimento de onda de 660nm (vermelho) e potência de 100mW.

O laser de AsGaAl é vantajoso em relação aos outros com relação ao custo e são comprovadamente eficientes no processo da Terapia Fotodinâmica (LAGE-MARQUES e EDUARDO, 1998; PRATES et al., 2010). Além disso apresentam ressonância ao fotossensibilizante utilizado.

Estudos demonstram uma variabilidade no tempo de exposição ao laser, desde trinta segundos (SILBERT et al., 2000) até trinta minutos (ZANIN et al., 2006). De acordo com os estudos de Williams et al. (2003), Zanin et al. (2005) e Prates et al. (2006), a inativação dos micro-organismos é maior conforme a dose de energia é aumentada. Sabendo-se que a dose de energia é proporcional à potência e ao tempo de irradiação, neste estudo, procurou-se manter a potência e variar o tempo de exposição como realizado por Seal et al. (2002).

Sendo o canal radicular um local de difícil acesso para o spot do aparelho laser, utilizou-se um sistema de fibra óptica acoplada à ponta da caneta do laser com diâmetro de 600µm, e a irradiação foi realizada seguindo a técnica helicoidal sugerida

por Gutknecht et al. (2005), na qual a fibra é inserida a um milímetro aquém do ápice e recuada em movimentos helicoidais favorecendo a distribuição homogênea dos fótons e possibilitando a irradiação em todas as paredes do canal radicular (GARCEZ et al., 2006).

Na análise dos resultados obtidos no presente estudo, frente à eficácia da PDT, foi possível observar diferença estatística significativa na comparação entre a contagem de micro-organismos presentes antes e depois dos tratamentos, pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%, entre os grupos G6, G7, G8, G9, G10, G11, G12, G13 e G14. Demonstrando que a PDT utilizando a combinação TBO 0,5µg/mL – 10 minutos e o fotossensibilizante nas concentrações 5µg/mL e 10µg/mL em todos os tempos testados de irradiação com o laser, apresentaram ação antibacteriana significativa frente ao *Enterococcus faecalis*. Em relação à combinação do TBO 0,5µg/mL nos tempos de irradiação de 1, 2 e 5 minutos, o presente estudo demonstrou que não houve ação antibacteriana eficaz sobre a bactéria testada.

A porcentagem de redução de unidades formadoras de colônias, após os respectivos tratamentos, foi em ordem decrescente: TBO 5µg/mL/10min, TBO 5µg/mL/1 min, TBO 10µg/mL/5min, TBO 10µg/mL/10min, TBO 10µg/mL/1min, TBO 5µg/mL/2min, TBO 10µg/mL/2min, TBO 5µg/mL/5min, TBO 0,5µg/mL/10min, TBO 0,5µg/mL/5min, TBO 0,5µg/mL/2min e TBO 0,5µg/mL/1min.

Resultados semelhantes quanto à porcentagem de redução bacteriana alcançada no presente estudo de aproximadamente 93%, nos grupos 7 e 10, também foram encontrados nos estudos de Bergmans et al. (2008) (98,5%); Garcez et al. (2006) (99,2%); Nikolaos et al. (2006) (97%), 2006; Soukos et al. (2006) (97%) e Zanin et al. 2006 (95%). Entretanto, não houve redução máxima, em nenhum dos grupos testados, como apresentado por Garcez (2002) em que a redução foi de 100% sobre *Enterococcus faecalis* utilizando a Terapia Fotodinâmica.

A análise comparativa da porcentagem de redução de *Enterococcus faecalis*, entre os diferentes grupos, pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%, indicou diferença estatística entre os grupos 3 e 10, sendo que a porcentagem de redução imediata do grupo 10 foi maior que o grupo 3, confirmando que a PDT utilizando TBO 5µg/mL por 10 minutos de irradiação foi melhor que a utilização do mesmo fotossensibilizante na concentração de 0,5µg/mL por um minuto de irradiação laser. O aumento da concentração do fotossensibilizante e o tempo de exposição foram evidentes. Considerando que o tempo de exposição e a atividade antimicrobiana é diretamente proporcional à dose de energia (ZANIN et al., 2005).

Com relação à microscopia eletrônica de varredura, procedeu-se a correlação entre as imagens visualizadas e a contagem das unidades formadoras de colônias dos dentes preparados.

Constatou-se que os tratamentos realizados nos canais radiculares capazes de reduzir, significativamente, a quantidade de bactérias, confirmaram-se ao MEV em todos os aumentos 3000X, 5000X, 7000X e 10000X. As amostras dos grupos experimentais, G6, TBO 0,5µg/ mL – 10min; G7, TBO 5µg/ mL – 1min; G8, TBO 5µg/ mL – 2min; G9, TBO 5µg/ mL – 5min; G10, TBO 5µg/ mL – 10min; G11, TBO 10µg/ mL – 1min; G12, TBO 10µg/ mL – 2min; G13, TBO 10µg/ mL – 5min; G14, TBO 105µg/ mL – 10min, que apresentaram resultados significativos na redução bacteriana, a constatação foi ratificada ao MEV.

Nos grupos da PDT utilizando o fotossensibilizante TBO 0,5µg/mL nos tempos de irradiação com laser de 1, 2 e 5 minutos, grupos G3, G4 e G5, em que não houve redução bacteriana significativa, observa-se nas imagens a presença de um aglomerado bacteriano em todas as amostras.

Apesar dos resultados apresentados serem satisfatórios, outros estudos *in vivo* são necessários e, também, testando a ação cumulativa da Terapia Fotodinâmica e da terapia endodôntica convencional a fim de confirmar a efetividade da mesma e utilizá-la na clínica.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo experimental, *in vitro*, permitem concluir que:

- Os parâmetros utilizados nos diferentes grupos, azul de toluidina 0,5µg/mL e irradiação laser por 10 minutos ou azul de toluidina nas concentrações 5µg/mL e 10µg/mL em todos os tempos testados de irradiação com o laser (1, 2, 5 e 10 minutos), proporcionaram resultados significativos quanto à atividade antibacteriana
- A combinação do fotossensibilizante azul de toluidina 5µg/mL com irradiação laser durante 10 minutos apresentou a melhor redução bacteriana
- A terapia não foi capaz de eliminar 100% do biofilme de *Enterococcus faecalis*

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic. **Photochem Photob**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.
- AKPATA, E.S.; BLECHMAN, H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. **J Dent Res**, Washington, v. 62, p. 435-438, 1982.
- ALFENAS, C. F. et al. Terapia Fotodinâmica na redução de micro-organismos no sistema de canais radiculares. **Rev Bras Od**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 68-71, Jan/Jun. 2011.
- AL-HEZAIMI, K. et al. Comparison of antifungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. **J Endod**, Baltimore , v. 32, n. 4, p. 365-367, 2006.
- BAGNATO, V.S. Presentes desafios e perspectivas da terapia fotodinâmica. Anais do Congresso de PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER JR., W. A. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. **J Endod**, Baltimore, v. 39, p. 10-17, 2006.
- BASRANI, B.; GHANEM, A.; TJÄDERHANE, L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. **J Endod**, Baltimore, v. 30, n. 6, p. 413-417, June 2004.
- BERBER, V. B. et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **Int Endod J**, Oxford, v. 39, p. 10-17, 2006.
- BERGMANS L. et al. Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. **Int Endod J**, Oxford, v. 39, p. 547-57, 2006.
- BERGMANS, L. et al. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **Int Endod J**, Oxford, v. 41, p. 227-239, 2008.

BONSOR, S. J.; NICHOL, R.; REID, T. M. S.; PEARSON, G.J. Microbiological evaluation of phot-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). **Br Dent J**, London, v. 200, p. 337-341, 2006.

BRITO, P. R. R. et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an *in vitro* study. **J Endod**, Baltimore, v. 35, n. 10, p. 1422-27, Oct. 2009

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 89, n. 4, p. 321-328, Aug. 1981.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.55, p. 307-12, 1983.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases endodontic therapy. **Int Endod J**, Oxford, v.18, p. 35-40, 1985.

CAMINOS, D.A.; DURANTINI, E.N. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. **Bioorg Med Chem.**, Oxford, v. 14, p. 4253-4259, 2006.

CARRÉ, V. et al. Chronology of the apoptotic events induced in the K562 cell line by photodynamic treatment with hematoporphyrin and monoglucosylporphyrin. **Photochem Photob**, Oxford, v. 69, n.1, p. 55-60, 1999.

CARDOSO, M. G. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 105, p.e85-e91, Mar. 2008.

CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int Endod J**, Oxford, v. 36, p. 500-508, 2003.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, p. 1318-22, 1999.

DAMETTO, F.R. et al. *In vitro* assessment of immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.99, p.768-2, 2005.

DISTEL, J. W.; HATTON, J. F.; GILLESPIE, M. J. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod**, Baltimore, v. 28, n. 10, p. 689-693, 2002.

DOBSON, J.; WILSON, G. Sensitization of oral bacterial in biofilmes to killing by light from a lower-power laser. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 37, p. 883-887, 1992.

DUNAVANT, T.R. et al. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. **J Endod**, Baltimore, v. 32, n.6, p. 527-531, June 2006.

EDUARDO, C.P.; GOUW-SOARES, S. The use of lasers for endodontic application in dentistry. **Med. Laser Appl**, Jena, v. 16, p. 231-243, 2001.

ELDENIZ, A.U. et al. Bactericidal efficacy of Er,Cr:YSGG laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation: an *ex vivo* pilot study. **Int Endod J**, Oxford, v. 40, p. 112-119, 2007.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; PÉCORA, J.D. A study of the time necessary for calcium hydroxide to eliminate microorganisms in infected canals. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v.11, n.2, p.133- 137, 2003.

FABRICIUS, L. et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 90, n. 3, p. 200-206, Jan. 1982.

FIMPLE, J. L. et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. **J Endod**, Baltimore, v. 34, p. 728-734, 2008.

FONSECA, M. B. et al. Photodynamic Therapy for Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*. **Photomed Laser Surg**, Larchmont, v.26, n.3, p.209–13, 2008.

GARCEZ, A.S. et al. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization of the reduction of *Enterococcus faecalis* *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 102, p. 93-98, 2006.

GARCEZ, A.S. et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **J Endod**, Baltimore, v. 34, n. 2, p. 138-142, Feb. 2008.

GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Surg Med**, New York, v.39, p. 59-66, 2007.

GARCEZ, A. S. et al. Terapia fotodinâmica em odontologia – laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev APCD**, v. 57, n. 3, p. 223-226, 2003.

GEORGE, S.; KISHEN, A.; SONG, K. P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, Baltimore, v. 31, n. 12, p. 867-872, 2005.

GILBERT, P.; DAS, J.; FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Adv Dent Res**, Washington, v. 11, p. 160–167, 1997.

GONÇALVES, L. Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal. São Paulo, 2005. 126p. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

GOMES, B. P. F. A. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, Los Angeles, v.19, p. 71-76, 2004.

GORDUYSUS, M. et al. A comparison of three rotary systems and hand instrumentation technique for the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal. **Aust Endod J**, Melbourne, v. 37, p. 128–133, 2011.

GUTKNECHT, N. et al. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. **Lasers Med Sci**, London, v. 20, p. 99–103, 2005.

GUTKNECHT, N. et al. Diode laser radiation and its bacterial effect in root canal wall dentin. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 18, n. 2, p. 57-60, 2000.

HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, Washington, v. 66, p. 1375-1379, 1987.

JOHNSON, E. M.; FLANNAGAN, S. E.; SEDGLEY, C. M. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. **J Endod**, Baltimore, v. 32, n. 10, p. 946-950, Oct. 2006.

KARIM, I. E.; KENNEDY, J.; HUSSEY, D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 103, p. 560-569, Apr. 2007.

KIMURA, Y. WILDER-SMITH, P. MATSUMOTO, K. Lasers in Endodontics: a Review. **Int Endod J**, Oxford , v.33, n. 3, p. 173-185, May 2000.

KISHEN, A.; GEORGE, S.; KUMAR, R. *Enterococcus faecalis* – mediated biomineralized biofilm formation root canal dentine *in vitro*. **J Biomed Mater Res A**, Hobosken, v. 77, p. 406-415, 2006.

KÖMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **J Appl Microbiol**, Oxford, v. 92, p. 618-623, 2002.

KÖNIG, K. et al. Red light kills bacteria via photodynamic action. **Cell Mol Biol**, Elmsford, v. 47, p. 1297-1303, 2000.

KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res**, Washington, v. 86, n. 8, p. 694-707, 2007.

KREISLER, M. et al. Efficacy of NaOCl/H₂O₂ irrigation and GaAlAs Laser in decontamination of root canals *in vitro*. **Lasers Surg Med**, New York, v. 32, p.189-196, Sep. 2003.

LAGE-MARQUES, J. L.; EDUARDO, C. P.; MATSUMOTO, K. Study of microscopic changes of apical and intracanal surface after laser irradiation. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 13, n. 3, p. 113-115, 1995.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic Study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 49, n. 5, p. 2026-34, 2005.

LIM Z., et al. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. **Aust Dent J**, Sydney, n. 54, p. 108-14, 2009.

LOVE, R.M. Enterococcus faecalis - a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 399-405, Jul. 2001.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MAROTTI, J. et al. Terapia fotodinâmica no tratamento da periimplantite. **ImplantNews**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 401-405, 2008.

MEHL, A. et al. Bacterial effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs. **J. Photochem. Photobiol. B**, Amsterdam, v. 5, n. 3-4, p. 281-293, May. 1990.

MENEZES, M. M. et al. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **Int Endod J**, Oxford, v. 37, p. 311-319, 2004.

MORITZ, A. et al. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. **Quintessence Int.**, Berlin, v. 28, n. 3, p. 205-209, 1997.

NAIR, P. N. R. et al. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod**, Baltimore, v.16, n. 12, p. 580-588, 1990.

ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dent Traumatol**, Denmark, v. 6, n. 3, p. 142-9, 1990.

PECIULIENE, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J**, Oxford, v.34, p. 429-434, 2001.

PRATES, R. A. Parâmetros de irradiação influenciam na inativação de leveduras tratadas com terapia fotodinâmica. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n.1, p.53-7, 2010.

RADCLIFFE, C. E. et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J**, Oxford, v. 37, p. 438–446, 2004.

RETAMOZO, B. et al. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, Baltimore, v. 36, p. 520–523, 2010.

RIOS, A. et al. Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light-emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth. **J Endod**, Baltimore, v. 37, n. 6, p. 856-59, June. 2011.

SCHACKLEY, D.C. et al. Photodynamic therapy. **J R Soc Med**, London, v. 92, p. 562-565, Nov. 1999.

SCHOOP, U. et al. Bacterial effect of different laser systems in deep layers of dentin. **Lasers Surg Med**, New York, v. 35, p. 111-116, Aug. 2004.

SCHOOP, U. et al. Innovative Wavelengths in Endodontic Treatment. **Lasers Surg Med**, New York, v. 38, p. 624-630, 2006.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. **J. Endod**, Baltimore, v. 32, n. 3, p. 173-177, Mar. 2006.

SEAL, G.J. et al. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **Int Endod J**, Oxford, v. 35, p. 268-274, 2002.

SILBERT, T. et al. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization. **J Dent Res**, Washington, v. 79, p. 569, May. 2000, Issue special.

SILVA, F. C. et al. Análise da efetividade da instrumentação associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana e a medicação intracanal na eliminação de biofilmes de *Enterococcus faecalis*. **Braz Dent Sci**, São José dos Campos, v. 13, n. 5, p. 31-38, Jan/Jun. 2010.

SIQUEIRA JR., J. F. A etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J**, Oxford, v. 34, p. 1-10, 2001.

SIQUEIRA JR., J. F. et al. Chemomechanical reduction of the bactericidal population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5%, and 5,25% sodium hypochlorite. **J Endod**, Baltimore, v. 26, n. 6, p. 331-4, 2000.

SIQUEIRA JR., J. F.; UZEDA, M. Disinfection by calcium hydroxide paste of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **J Endod**, Baltimore, v. 22, p. 674-676, 1996.

SIQUEIRA JR., J. F.; UZEDA, M.; FONSECA, M. E. F. A scanning electron microscopy evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. **J Endod**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 308-310, June. 1996.

SIQUEIRA JR., J. F; ROÇAS, I.N. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. **J Endod**, Baltimore, v. 34, n. 11, p.1291–1301, 2008.

SIQUEIRA JR., J. F; ROÇAS, I.N. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 2—Redefining the Endodontic Microbiota. **J Endod**, Baltimore, v.31, n. 7, p. 488-98, July. 2005.

SJÖGREN, U. et al. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, Oxford , v.30, p. 297-306, 1997.

SOUKOS, N. et al. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. **Lasers Surg Med**, New York, v. 33, p.161-168, 2003.

SOUKOS, N.S. et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **J Endod**, Baltimore, v. 32, n. 10, p. 979-984, Oct. 2006.

SOUZA, L. C., et al. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, Baltimore, v. 36, n. 2, p. 292-96, Feb. 2010.

STUART, C.H. et al. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod**, Baltimore, v. 32, n. 2, p. 93-8, Feb. 2006.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re- treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan. 1998.

TEICHERT, M.C. et al. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v.93, n. 2, p.155-60, 2002.

TORTORA, G. J. FUNKE, B. F., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol**, Denmark, v. 6, p. 73-77, 1990.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, N. C.; BIEL, M. A. The role of the methylene blue and toluidineblue monomers and dimmers in the photoinactivation of bacteria. **J Photochem Photobiol**, Oxford, v. 71, p. 87-98, 2003.

VIANNA, M. E. et al. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **Int Endod J**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 484-492, Jun. 2006.

VIVAQUA-GOMES, N. et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single-or-multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. **Int Endod J**, Oxford, v. 38, p.697-704, 2005.

ZANIN I. C., et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. **J Antimicrob Chemother**, London, v. 56, p.324–30, 2005.

ZANIN, I.C.J. et al. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.114, p. 64-69, 2006.

ZANIN, I.C.J. et al. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. **J Antimicrob Chemother**, London, v. 56, p. 324-330, 2005.

ZOLETTI, G.O.; SIQUEIRA Jr., J.F.; SANTOS, K.R.N. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and—independent approaches. **J Endod**, Baltimore, v. 32, n. 8, p. 722-726, Aug. 2006

WALSH, L.J. The current of laser applications in dentistry. **Aust Dent J**, Australia, v. 48, n. 3, p.146-155, Sep. 2003.

WILLIAMSON, A.E. et al. Effect of root canal filling/sealer systems on apical endotoxina penetration: a coronal leakage evaluation. **J Endod**, Baltimore, v. 31, n. 8, p. 599-604, Aug. 2005.

WILLIAMS, J.A. et al. The effect of Variable Energy Input from a Novel Ligth Source on the Photoactivated Bactericidal Action of Toluidine Blue O on *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, Switzerland, v. 37, p. 190-193, 2003.

WILLIAMS, J. A.; PEARSON, G. J.; COLLES, M. J. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. **J Dent**, Bristol v. 34, n. 6, p. 363-371, 2006.

WILSON, B.D. et al. Photodynamic therapy for treatment of basal cell carcinoma. **Arch Dermatol.**, Chigaco, v. 128, p. 1597-1601, 1992.

WILSON, M.; DOBSON, J.; HARVEY, W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. **Curr Microbiol**, New York, v. 25, n.2, p. 77-81, Aug. 1992.

WILSON, M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol.**, Oxford, v. 3, p. 412-418, 2004.

WILSON, M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 299-306, Oct. 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados da análise estatística para verificação da distribuição amostral, relativo às contagens de unidades formadoras de colônias.

TESTE DE NORMALIDADE

Variável - x 1			
Teste de homogeneidade de variância - Bartlett			
X ² calculado 10.5635	= GL = 13		Probabilidade= .6473 ns
Curtose Valor(3+c)= 3.4112	V(c)= .5136	t= .5738	Probabilidade = .5735 ns
Simetria Valor(s)= .4117	V(s)= .1335	t= 1.1268	Probabilidade = .2591 ns
Teste de normalidade - qui-quadrado			
Número de observações(erros)	42		
Média	.0		
Variância	1.5828		
Desvio-padrão 1.2581	1.2581		
Qui-quadrado: 13.5214	GL : 16		Probabilidade (%) = 63.4324
Teste de Lilliefors			
D calculado máximo (Apenas classes)	.1095		
D calculado máximo (Todas observações)	.1305		
D tabelado (20%)	.1139		
D tabelado (15%)	.1185		
D tabelado (10%)	.1242		
D tabelado (5%)	.137		
D tabelado (1%)	.1591		
Se Dcal > = Dtab Rejeita-se Ho			
Ho: é razoável estudar os dados por meio da distribuição normal			

APÊNDICE B – Resultados da análise estatística pela análise de variância da variável, com nível de significância a 1%

FV	GL	SQ	QM	F	Probab
Tempo	1	416.45792	416.45792	78.99336	.0
Tratamento	13	368.7825	28.36788	5.38079	.0
TempoXTratamento	13	382.4144	29.41649	5.57969	.0
Resíduo	56	295.2355	5.27206		
Total	83	1462.8903	17.62518		
Média	3.95909523809524				
CV (%)	57.9955038759414				

APÊNDICE C – Resultados da análise estatística entre os grupos pelo teste de Tukey, com nível de significância 5%

VARIÁVEL : MORTALIDADE
GLRes : 56 QMR : 1 q : 2.8343 DMS : 1.6364

3.8367 A	3.1233 A
.0000 A	.0000 A
2.5367 A	3.5733 A
2.3733 A	3.1567 A
1.0700 A	1.3100 A
3.7767 A	1.6070 B
11.7667 A	.8017 B
12.2600 A	2.1467 B
6.1900 A	2.1400 B
7.0867 A	.4760 B
12.9333 A	2.2200 B
10.3267 A	1.8733 B
6.6233 A	.8600 B
5.8200 A	.9667 B

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na HORIZONTAL não diferem estatisticamente entre si.

VARIÁVEL : MORTALIDADE
GLRes : 56 QMR : 1 q : 4.9543 DMS : 2.8604

3.8367 cd	3.1233 ab
.0000 e	.0000 c
2.5367 de	3.5733 a
2.3733 de	3.1567 ab
1.0700 de	1.3100 abc
3.7767 cd	1.6070 abc
11.7667 a	.8017 abc
12.2600 a	2.1467 abc
6.1900 bc	2.1400 abc
7.0867 b	.4760 bc
12.9333 a	2.2200 abc
10.3267 a	1.8733 abc
6.6233 bc	.8600 abc
5.8200 bc	.9667 abc

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na VERTICAL não diferem estatisticamente entre si.

APÊNDICE D – Contagem das UFC.mL⁻¹ de *Enterococcus faecalis* dos grupos 1, 2, 3 e 4 antes e após os tratamentos

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 1	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	3,12 x 10 ⁵	2,20 x 10 ⁵
2	2,91 x 10 ⁵	1,69 x 10 ⁵
3	5,48 x 10 ⁵	5,48 x 10 ⁵
Média	3,83 x 10 ⁵	3,12 x 10 ⁵

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 2	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	0	0
2	0	0
3	0	0
Média	0	0

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 3	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	1,20 x 10 ⁵	1,97 x 10 ⁵
2	3,08 x 10 ⁵	3,60 x 10 ⁵
3	3,33 x 10 ⁵	5,15 x 10 ⁵
Média	2,53 x 10 ⁵	3,57 x 10 ⁵

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 4	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	2,32 x 10 ⁵	3,11 x 10 ⁵
2	2,20 x 10 ⁵	3,16 x 10 ⁵
3	2,60 x 10 ⁵	3,18 x 10 ⁵
Média	2,37 x 10 ⁵	3,15 x 10 ⁵

APÊNDICE E – Contagem das UFC.mL⁻¹ de *Enterococcus faecalis* dos grupos 5, 6, 7 e 8 antes e após os tratamentos

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 5	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	0,81 x 10 ⁵	1,07 x 10 ⁵
2	2,07 x 10 ⁵	2,61 x 10 ⁵
3	0,33 x 10 ⁵	0,25 x 10 ⁵
Média	1,07 x 10 ⁵	1,31 x 10 ⁵

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 6	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	6,12 x 10 ⁵	2,94 x 10 ⁵
2	4,15 x 10 ⁵	1,83 x 10 ⁵
3	1,06 x 10 ⁵	0,05 x 10 ⁵
Média	3,77 x 10 ⁵	1,60 x 10 ⁵

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 7	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	1,18 x 10 ⁶	3,00 x 10 ⁴
2	1,09 x 10 ⁶	8,00 x 10 ⁴
3	1,25 x 10 ⁶	1,30 x 10 ⁵
Média	1,17 x 10 ⁶	8,00 x 10 ⁴

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 8	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	1,01 x 10 ⁶	4,14 x 10 ⁵
2	8,36 x 10 ⁵	2,00 x 10 ⁴
3	1,82 x 10 ⁶	2,10 x 10 ⁵
Média	1,22 x 10 ⁶	2,14 x 10 ⁵

APÊNDICE F – Contagem das UFC.mL⁻¹ de *Enterococcus faecalis* dos grupos 9, 10, 11 e 12 antes e após os tratamentos

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 9	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	$1,70 \times 10^5$	$6,30 \times 10^4$
2	$1,26 \times 10^6$	$1,57 \times 10^5$
3	$4,27 \times 10^5$	$4,22 \times 10^5$
Média	$6,19 \times 10^5$	$2,14 \times 10^5$

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 10	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	$7,10 \times 10^5$	$1,17 \times 10^5$
2	$6,56 \times 10^5$	$1,00 \times 10^3$
3	$7,60 \times 10^5$	$2,40 \times 10^4$
Média	$7,08 \times 10^5$	$4,70 \times 10^4$

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 11	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	$1,23 \times 10^6$	$1,82 \times 10^5$
2	$1,34 \times 10^6$	$3,45 \times 10^5$
3	$1,31 \times 10^6$	$1,39 \times 10^5$
Média	$1,29 \times 10^6$	$2,22 \times 10^5$

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 12	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	$8,68 \times 10^5$	$8,30 \times 10^4$
2	$1,38 \times 10^6$	$3,52 \times 10^5$
3	$8,50 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$
Média	$10,32 \times 10^5$	$1,87 \times 10^5$

APÊNDICE G – Contagem das UFC.mL⁻¹ de *Enterococcus faecalis* dos grupos 13, 14, antes e após os tratamentos

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 13	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	6,60 x 10 ⁵	1,19 x 10 ⁵
2	1,25 x 10 ⁶	1,28 x 10 ⁵
3	7,30 x 10 ⁴	1,10 x 10 ⁴
Média	6,62 x 10 ⁵	8,60 x 10 ⁴

Amostras	Tempo 1	Tempo 2
Grupo 13	UFC.mL⁻¹	UFC.mL⁻¹
1	3,30 x 10 ⁵	1,50 x 10 ⁴
2	6,74 x 10 ⁵	1,71 x 10 ⁵
3	7,42 x 10 ⁵	1,04 x 10 ⁵
Média	5,82 x 10 ⁵	9,60 x 10 ⁴

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Título do Projeto de Pesquisa				
Avaliação in vitro da terapia fotodinâmica contra <i>Enterococcus faecalis</i> na desinfecção de canais radiculares.				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	03/11/2010 11:35:18	02/03/2011 16:23:29		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
3 - Protocolo Aprovado no CEP	02/03/2011 16:23:29	Folha de Rosto	306/2010	CEP
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	02/11/2010 22:51:36	Folha de Rosto	FR383282	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	03/11/2010 11:35:18	Folha de Rosto	0202.0.180.000-10	CEP

ANEXO B – Declaração do Banco de Dentes

Anexo IVa

31

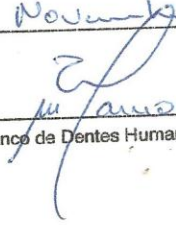


UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
BANCO DE DENTES HUMANOS

DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Banco de Dentes Humanos da FO-UFJF declara que fornecerá 40 dentes, necessários para o desenvolvimento do trabalho de pesquisa intitulado: Atividade antimicrobiana da PDT no SR, a ser realizado por Austiane Ferreira Silva e orientado pelo Prof. (a) Dr. (a). Marcelo Luiz de Almeida após aprovação do projeto por esse Comitê.

Juiz de Fora, 07 de Novembro de 20 10.


Responsável pelo Banco de Dentes Humanos da FO-UFJF