



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS INTEGRADAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

JEFFERSON DIAZ DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO LASER DIODO EM
DENTINA INFECTADA**

**CUIABÁ
2016**

JEFFERSON DIAZ DE OLIVEIRA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO LASER DIODO EM
DENTINA INFECTADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Integradas, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito para a obtenção do título de mestre no Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas.

Orientadora: Profa. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges

Cuiabá
2016

JEFFERSON DIAZ DE OLIVEIRA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO LASER DIODO EM
DENTINA INFECTADA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Integradas, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas – Área de Concentração Odontologia.

Orientador Profa. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela

Orientadora Profa. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela

Membro Titular Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges

Membro Titular Prof. Dr. Omar Zina

Cuiabá, 11 de maio de 2016

Conceito Final: _____

Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela.

AGRADECIMENTOS

Primeira mente gostaria de agradecer a **Deus** por me proporcionar oportunidades de conhecimentos e de engrandecimento tanto na vida profissional quanto na vida particular.

Ao meu pai **Durvalino de Oliveira** por sempre ter me motivado, me auxiliado, e me proporcionar momentos inesquecíveis na minha vida e me proporcionando realizações de grandes conquistas. Ser a minha maior referência tanto na vida profissional e na particular. Te amo.

A minha mãe **Roxana Diaz J. de Oliveira** por ser o meu porto seguro, por sempre estar me proporcionando momentos mais que inesquecíveis, e me apresentar a mais pura e verdade forma de amor. Te amo.

Ao meu irmão **Marcelo Diaz de Oliveira** por sempre me dar suporte e me ajudar a superar quaisquer obstáculos que por ventura veio a aparecer. Te amo.

A minha orientadora Profa Dra **Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela** por ter sido meu guia, por ter tido paciência e pelos diversos ensinamentos que levarei para a minha vida profissional e pessoal para o resto da minha vida. Todo meu carinho e respeito por você.

Ao meu coorientador Prof Dr **Álvaro Henrique Borges** pelos incentivos nos momentos de dificuldades, obrigado pelos diversos ensinamentos profissionais e pessoais, sempre te admirei e te admiro cada dia mais.

A todos os **professores e equipe** que faz com que o curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas seja um sucesso.

A todos os amigos de turma que sempre teve um espírito de companheirismo.

À **Cátia Balduino Ferreira**, assistente administrativo, do Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas, obrigado por todo auxílio, pela paciência infinita, profissionalismo, carinho e amizade.

À Coordenadoria de pesquisa e pós-graduação,

Na pessoa da coordenadora **Lucelia de Oliveira Santos**.

À Diretoria de pesquisa e pós-graduação,

Na pessoa do diretor **Hélio Hiroshi Suguimoto.**

À Faculdade de Odontologia de Cuiabá da Universidade de Cuiabá (FOC-UNIC),

Na pessoa do Coordenador **Fábio Luís Miranda Pedro.**

À **Universidade de Cuiabá (UNIC),**

Na pessoa do Reitor Fernando Ciriaco Dias Neto.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES,**

Pelo incentivo à pesquisa científica, indispensável ao desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado a todos que, de alguma forma, colaboraram para realização deste trabalho!

“O passado serve para evidenciar as nossas falhas e dar-nos indicações para o progresso do futuro.”

Henry Ford

RESUMO



RESUMO

OLIVEIRA, J. D. **POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO LASER DIODO EM DENTINA INFECTADA**. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Ciências Odontológicas Integradas, Universidade de Cuiabá – UNIC, Cuiabá 2016.

O efeito antibacteriano do laser Diodo associado ou não ao hipoclorito de sódio a 2,5% foi avaliado sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Para tanto, foram utilizados oitenta blocos de dentina confeccionados a partir de dentes humanos unirradiculares. Os blocos de dentina foram esterilizados e, na sequência, inoculados com 0,01 mL do inóculo bacteriano utilizando cultura pura com 24 horas de preparo e ajustada ao padrão 1 de McFarland. Os blocos contaminados foram incubados durante 07 dias, mantidos em meio úmido a 37°C. Dez espécimes não contaminados foram incubados a 37°C durante o período de contaminação, correspondendo ao grupo controle negativo, enquanto o grupo controle positivo foi composto por dez espécimes contaminados. Os blocos de dentina contaminados foram aleatoriamente divididos em seis grupos experimentais: nos quais se empregou: NaOCL a 2,5%; NaOCL a 2,5%+TFD com azul de metileno – laser 18J e 180s; NaOCL a 2,5%+TFD com azul de metileno – laser 8J e 80s; azul de metileno; TFD com azul de metileno – laser 18J e 180s; TFD com azul de metileno – laser 8J e 80s e os controles positivo e negativo. O crescimento microbiano foi analisado pela turbidez do meio de cultura e a concentração microbiana foi analisada utilizando espectrofotômetro UV (ajustado para leitura em comprimento de onda $\lambda = 600$ nm). A determinação qualitativa da contaminação dos blocos de dentina foi feita utilizando microscopia eletrônica de varredura. A terapia fotodinâmica com o laser Diodo em comprimento de onda de 660nm foi eficaz na redução do *Enterococcus faecalis*. Os canais radiculares sanificados com o laser na potência de 18J por 180s apresentaram maior contaminação bacteriana que os grupos em que o hipoclorito foi empregado associado ou não ao laser na potência de 18J por 180s ($p < 0,05$). Estes dados apontam para o desenvolvimento de mais estudos em busca de alternativas mais eficazes para o tratamento endodôntico.

Palavras Chaves: Dentina. Fototerapia. *Enterococcus Faecalis*. Endodontia

ABSTRACT



ABSTRACT

OLIVEIRA, J. D. **DIODO LASER ANTIMICROBIAL POTENTIAL ON INFECTED DENTIN**. 2016. 78 f. Dissertation (Master's Degree in Integrated Dental Clinic) Post-Graduate ProGram, University of Cuiabá – UNIC, Cuiabá, 2016.

This study evaluated the antibacterial effect of Diiodo laser associated or not with 2.5% sodium hypochlorite on enterococcus faecalis (ATCC 29212). Therefore, eighty dentin blocks systematized from single-rooted human teeth were used. The dentin blocks were sterilized and, in sequence, inoculated with 0.01 mL of bacterial inoculum using pure culture within 24 hours of preparation and set to the standard 1 of McFarland. Contaminated blocks were incubated for 07 days, kept in humid conditions at 37°C. Ten uncontaminated samples were incubated at 37°C during the contamination period, corresponding to the negative control group, while the positive control group consisted of ten infected specimens. The contaminated dentin blocks were randomly divided into six experimental groups (n=10) according to the methods of sanification: 2.5% NaOCl; 2.5% NaOCl + PDT with methylene blue - 18J laser and 180s; 2.5% NaOCl + PDT with methylene blue - 8J laser and 80s; methylene blue; PDT with methylene blue - 18J laser and 180s; PDT with methylene blue - 8J laser and 80s, besides the positive and negative controls. Microbial growth was assessed by culture medium turbidity and microbial concentration was analyzed using UV spectrophotometer (adjusted to read at wavelength, $\lambda=600$ nm). The qualitative determination of dentin blocks contamination was accomplished using scanning electron microscopy. Photodynamic therapy with the laser Diiodo at 660nm wavelength was effective in reducing enterococcus faecalis. Root canal sanification with laser, 18J for 180s, had higher bacterial contamination comparing to groups wherein the hypochlorite was used with or without laser power in 18J for 180s ($p<0.05$). These findings indicate the development of further studies in search of better alternatives for endodontic treatment.

Keywords: Dentin. Phototherapy. *Enterococcus Faecalis*. Endodontics.

LISTA DE TABELAS



LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos grupos experimentais	38
Tabela 2	Médias e desvios padrão dos valores de espectrofotometria para os diferentes métodos de sanificação do canal radicular, período inicial (antes da sanificação) e final (depois da sanificação)	42
Tabela 3	Médias e desvios padrão dos valores de espectrofotometria para os diferentes métodos de sanificação do canal radicular, período final (depois da sanificação), após correção pelo método dos mínimos quadrados	44



LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de NaOCl 2,5% n. x.1500); B- Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de NaOCl 2,5% %+TFD com azul de metileno – laser 18J e 180s n. x.1500). C- Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de NaOCL a 2,5%+TFD com azul de metileno – laser 8J e 80s n. x1.500). D- Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação azul de metileno n. x1.500). E- Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de azul de metileno + TFD – laser 18J 180s n. x1.500). F- Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de azul de metileno + TFD – laser 8J 80s n. x1.500). 45
- Figura 2** Imagem em microscopia eletrônica de varredura dos grupos controle positivo e negativo. A- Grupo controle positivo 1.500x. B- Grupo controle positivo 5.000x. C- Grupo controle negativo 1.500x. D- Grupo controle negativo 5.000x. 46



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	American Dental Association
ATCC	American Type Culture Collection
BAGN	Bacilos aeróbios Gram-negativos
BHIA	Brain Heart Infusion Agar (Agar de Infusão de Coração e Cérebro)
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão em Cérebro e Coração)
CAGP	Cocos aeróbios Gram-positivos
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
cm	Centímetro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
E. faecalis	<i>Enterococcus faecalis</i>
et al	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
Go	Goiás
IgA	Imunoglobulina A
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	MiliGramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm³	Milímetro cúbico
N	Amostra
NaOCl	Hipoclorito de sódio
P	Nível de significância
PACT	PhotoDynamic antimicrobial therapy (Terapia fotodinâmica antimicrobiana)
PAD	Photo-Activated Disinfection (Foto ativação de desinfecção)
PDT	Photodynamic therapy (Terapia fotodinâmica)
pH	Potencial hidrogênico
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
TFD	Terapia fotodinâmica
SP	São Paulo
UV	Ultravioleta

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µg	MicroGrama
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
#	Número

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
3	PROPOSIÇÃO	32
4	MATERIAL E MÉTODO	34
4.1	PREPARO DOS BLOCOS DE DENTINA	35
4.2	INDICADOR BIOLÓGICO	36
4.3	CONTAMINAÇÃO DOS BLOCOS DE DENTINA	37
4.3	SOLUÇÃO EXPERIMENTAL	37
4.4	TERAPIA FOTODINÂMICA	37
4.5	DELINEAMENTO	37
4.6	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	39
4.7	ANÁLISE NO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA	39
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	54

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O preparo químico mecânico tem se mostrado efetivo na redução da microbiota presente na luz do canal radicular, no entanto, microrganismos alojados em áreas não trabalhadas mecanicamente pelos instrumentos endodônticos, como por exemplo túbulos dentinários, istmos, canais laterais e ramificações apicais podem se mostrar resistentes ao tratamento devido a organização do biofilme (RICUCCI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Aproximadamente 700 espécies de microrganismos compõem a microflora oral (PASTER *et al.*, 2001; VALERA *et al.*, 2009). O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram positiva que faz parte da microflora intestinal e comumente presente nas infecções, por exemplo, do trato urinário e endocárdio (SANDOE *et al.*, 2002; DENOTTI *et al.*, 2009). Raramente é encontrado nos casos de infecções endodônticas primárias, mas em casos de retratamento, representa entre 38% a 70% da microbiota (NAIR *et al.*, 1990; MOLANDER *et al.*, 1998; LOVE 2001; SIQUEIRA 2001; SUNDQVIST *et al.*, 2004; SIQUEIRA e RÔÇAS 2004). Desempenha papel preponderante na etiologia das infecções endodônticas em razão da sua particular estratégia de formação de placa, fatores de virulência, aderência ao colágeno dentinário, sobrevivência em meios críticos e resistência à terapia endodôntica (Estrela *et al.*, 2010).

O processo de sanificação, a partir da ação mecânica dos instrumentos endodônticos e da ação química dos irrigantes, apresenta grande importância no controle bacteriano. A irrigação é parte fundamental deste processo, pois é esperada a ação da substância irrigadora nas áreas em que o instrumento endodôntico não consegue alcançar (ESTRELA *et al.*, 2012a; BASRANI E HAAPASALO, 2012; HULSMANN 2013). A eliminação da microbiota representa um desafio em função de particularidades do complexo sistema de canais radiculares (ESTRELA *et al.*, 2012a; PÉCORA *et al.*, 2013). Lesões periapicais persistentes que não regrediram depois de adequado tratamento endodôntico são causadas pela permanência de bactérias patogênicas no interior do sistema de canais radiculares (ESTRELA *et al.*, 2009).

Uma variedade de irrigantes tem sido proposta, porém nenhuma detém todas as características desejadas e com isso várias combinações de produtos e protocolos têm sido testadas (HAAPASALO *et al.*, 2010). A terapia fotodinâmica se destaca como proposta terapêutica com a função de melhorar a sanificação do canal

radicular. Esta terapia se baseia na foto-oxidação de material orgânico (CHENG *et al.*, 2012; EICK *et al.*, 2013; CHREPA *et al.*, 2014; TRINDADE *et al.*, 2015), como base no emprego de lasers de baixa potencia associados a fotossensibilizadores, seguido de uma dose de radiação de luz em um comprimento de onda adequado. A absorção da luz ativa o fotossensibilizador, que na presença de oxigênio, produz uma cascata de efeitos fotoquímicos que resultam na produção de oxigênio altamente reativo o qual é tóxico para células tumorais, bactérias e fungos (KONOPKA *et al.*, 2007). Desta forma, conhecer o efeito antibacteriano de diferentes propostas terapêuticas sobre o biofilme bacteriano é de importância para que seja possível alcançar maior índice de sucesso no tratamento endodôntico.



ESIDADE DE CUIA



REVISÃO DE LITERATURA

2- REVISÃO DE LITERATURA

Os microrganismos são os principais agentes etiológicos das alterações dos tecidos pulpar e periapical. As infecções endodônticas são polimicrobianas, podendo-se observar duas situações: infecção primária aparece em necrose pulpar não tratada e é caracterizada pelo predomínio de bactérias anaeróbias Gram-negativas; infecção secundária, que ocorre em dentes submetidos a tratamentos endodônticos associados a fracassos, com o predomínio de bactérias facultativas Gram-positivas (NAIR, 2004). Dentre os diversos microrganismos que compõem a microbiota endodôntica, o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) apresenta destacado papel (MOLLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PORTENIER *et al.*, 2003; SEDGLEY *et al.*, 2005).

O *E. faecalis* é um coco anaeróbio facultativo Gram-positivo, que tem sido isolado de canais radiculares obturados e com patologia periapical crônica. Ele apresenta relevância, uma vez que apresenta capacidade de sobreviver em condições de elevado pH (NAIR *et al.*, 1990; MOLLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; LOVE 2001; SIQUEIRA 2001; SIQUEIRA e RÔÇAS 2004). Este microrganismo apresenta fatores de virulência que incluem enzimas líticas, citolisinas, substância de agregação e ácido lipoteicóico; além de ser capaz de aderir às células do hospedeiro e de expressar proteínas que permitem a competição com outras células bacterianas (STUART *et al.*, 2006). Orstavik *et al.* (1990) observaram que o *E. faecalis* pode invadir os túbulos dentinários, colonizar a luz do canal radicular e sobreviver sem o suporte de outras bactérias.

Uma vez estabelecida o processo de infecção no sistema de canais radiculares, a sanificação do sistema de canais radiculares é determinante para o controle do número de microrganismos. A eliminação da microbiota do canal radicular é um desafio em função da complexa anatomia interna dos canais radiculares (ESTRELA *et al.*, 2012a; PÉCORA *et al.*, 2013), com a presença de istmos e ramificações, que favorecem a formação de biofilme bacteriano, uma vez que estas áreas não são acessíveis aos instrumentos e irrigantes endodônticos (SUNDQVIST *et al.*, 1998; NAIR *et al.*, 2005; ESTRELA *et al.*, 2014).

Os microrganismos da cavidade bucal podem ser encontrados na forma livre, também denominada planctônica ou numa forma agrupada, organizada, o biofilme.

Os microrganismos apresentam grande capacidade de adaptação para manutenção de sua viabilidade e sobrevivência em diferentes tipos de ambiente, inclusive naqueles em que há a presença de medicamentos com potencial antimicrobiano. O biofilme é composto por células incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares em que há a interação entre as células que estão ligadas a um substrato sólido, bem como umas às outras (PEREIRA 2003; MARINHO e ARAÚJO 2007). Esta forma de organização é mais vantajosa aos microrganismos em função de ocorrer em comunidades com estrutura tridimensional com canais para o transporte de substratos e moléculas sinalizadoras (USHA *et al.*, 2010). Ele pode ser formado sobre qualquer superfície e envolve três componentes principais: bactérias, uma superfície sólida, e um meio fluido rico em nutrientes (COSTERTON *et al.*, 1987, 1994). Caldwell *et al.*, (1997) afirmaram que o biofilme deve apresentar capacidade de auto-organização, resistência a perturbações ambientais, eficácia na associação do que em isolamento e ter capacidade de resposta frente as mudanças no ambiente como uma unidade e não como células isoladas.

O mecanismo de formação de biofilme bucal envolve três etapas: formação de película, a colonização bacteriana, e maturação do biofilme. Na fase 1, ocorre a adsorção de moléculas inorgânicas e orgânicas na superfície sólida, por exemplo, o dente. Durante a formação de placa dentária, a superfície do dente está condicionada pela película de saliva. A Fase 2 é caracterizada pela aderência dos microrganismos a um substrato por meio de estruturas de superfície de bactérias, tais como fímbrias, pili, flagelos e glicocalix (GRENIER *et al.*, 1986). Já na fase 3 é formada uma monocamada bacteriana que atrai colonizadores secundários, e dá origem à estrutura final do biofilme (COWAN *et al.*, 1987). Esta comunidade de microrganismos metabolicamente ativa é um biofilme maduro e os indivíduos compartilham direitos e benefícios (BOWDEN *et al.*, 1998). Cabe também ressaltar que os microrganismos organizados em biofilme são mais resistentes (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013) e que as bactérias localizadas nas camadas mais profundas do biofilme também apresentam maior resistência devido a limitação da difusão de substâncias tais como soluções irrigadoras, oxigênio ou fotossensibilizador através de estruturas orgânicas (SOUZA *et al.*, 2010)

Svensäter e Bergenholtz (2004) relataram que a formação de biofilme em canais radiculares tem início após a primeira invasão da câmara pulpar por

microrganismos orais planctônicos depois de alguma ruptura do tecido dentário. O *E. faecalis* apresenta habilidade de formar biofilme em canais radiculares, com e sem tratamento endodôntico (DUGGAN *et al.*, 2007; AL-AHMAD *et al.*, 2009). Este microrganismo apresenta a capacidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio. Ele pode crescer em ambientes com pH extremamente alcalino, na presença de sal, em ambientes com temperatura variada (de 10-45° C), além de também apresentar a capacidade de suprimir a ação dos linfócitos. É o microrganismo mais comumente isolado de dentes com infecções pós-tratamento endodôntico (SEDGLEY *et al.*, 2005). Apresenta fatores de virulência que incluem enzimas líticas, citolisinas, substância de agregação e ácido lipoteicóico e capacidade de aderir às células do hospedeiro e de expressar proteínas que permitem a competição com outras células bacterianas (STUART *et al.*, 2006).

O processo de sanificação, realizado com a ação mecânica dos instrumentos endodônticos e química dos irrigantes, apresenta grande importância no controle bacteriano. A irrigação é parte fundamental deste processo, pois espera-se a ação antimicrobiana também nas áreas em que o instrumento endodôntico não consegue atuar (ESTRELA *et al.*, 2012a; BASRANI e HAAPASALO 2012; HULSMANN 2013). Várias soluções irrigadoras foram propostas, porém nenhuma detém todas as características desejadas e com isso várias combinações de produtos e protocolos têm sido testadas (HAAPASALO *et al.*, 2010). Dentre as características ideais de uma solução irrigadora podem ser citadas a ação antimicrobiana, biocompatibilidade e baixa tensão superficial. Deve ser considerada a possibilidade dessa solução não alterar a coloração do dente.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido a solução irrigadora mais frequentemente utilizada no preparo do canal radicular. Esta substância apresenta atividade antimicrobiana e capacidade de dissolução tecidual (ESTRELA *et al.*, 2002). A capacidade do NaOCl de inativar bactérias é essencial, entretanto sua eficácia depende do contato direto com os microrganismos. Assim, fatores como volume utilizado, tempo de ação, concentração e protocolo de irrigação influenciam diretamente em sua efetividade (ESTRELA *et al.*, 2002; ESTRELA *et al.*, 2003a; ESTRELA *et al.*, 2003b; BASRANI e HAAPASALO *et al.*, 2012; GIARDINO *et al.*, 2014; TIAFENG *et al.*, 2014).

O hipoclorito de sódio é uma base forte (pH>11). Seu mecanismo de ação

envolve a neutralização de aminoácidos com a formação de água e sal. Com a saída de ions hidroxila, há uma redução do pH. O ácido hipocloroso, uma substância presente na solução de hipoclorito sódico, quando em contato com tecido orgânico atua como um solvente, que libera cloro, que quando combinado com o grupo amino da proteína, forma cloraminas. O ácido hipocloroso e os íons de hipoclorito levam a degradação de aminoácidos e hidrólise. A reação de cloraminação entre o grupo cloro e o grupo amino forma cloraminas, que interferem no metabolismo celular. O cloro (oxidante forte) apresenta ação antimicrobiana, inibição de enzimas bacterianas, levando a uma oxidação irreversível do grupo sulfidrilo de enzimas bacterianas essenciais.

Spratt *et al.*, (2001) evidenciaram a eficácia do hipoclorito de sódio a 2,25%, sobre biofilmes de *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, e *E. faecalis*. Estrela *et al.*, (2006) avaliaram o efeito antimicrobiano de algumas soluções irrigantes. Os autores analisaram a água ozonificada, o ozônio, o hipoclorito de sódio a 2,5% e a clorexidina a 2% sobre biofilme de *Enterococcus faecalis* em dentes humanos. Eles observaram que nenhuma das substâncias estudadas foi eficiente para inativar o indicador biológico.

A presença de microrganismos após o preparo do canal radicular tem motivado a constante busca por substâncias, procedimentos e protocolos que promovam redução microbiana (ESTRELA *et al.*, 2007; DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011; GIARDINO *et al.*, 2014). A sua vez, o Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou "amplificação de luz por meio da emissão estimulada de radiações") foi inserido na prática odontológica. Entre suas aplicações pode-se citar a ação antimicrobiana. Deve-se enfatizar a existência de lasers de alta potência (Er:YAG, Er,Cr:YSGG, Nd:YAG, Ho:YAG e diodo) e de baixa potência. O laser de alta potência promove a elevação da temperatura levando a morte dos microrganismos, através da desnaturação de proteínas (GUTKNECHT *et al.*, 1996a; GUTKNECHT *et al.*, 1996b), no entanto a literatura relata riscos de lesões aos tecidos dentais como carbonização da dentina, promoção de anquilose, alteração estrutural de cimento, reabsorção radicular e necrose perirradicular (HARDEE *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1999). O laser de baixa potência não apresenta efeito térmico, não promove alteração morfológica na estrutura dentária, além de ser portátil, de mais fácil manuseio e ter custo reduzido em relação aos lasers de alta potência

(WALSH 1997a; WALSH 1997b; ACKROYD *et al.*, 2001).

A terapia fotodinâmica (PDT – PhotoDynamicTherapy) tem como base o emprego de lasers de baixa potência associados a fotossensibilizadores. O fotossensibilizante ideal deve apresentar características físicas, químicas e biológicas, além de baixa citotoxicidade, baixo tempo de fotossensibilização, estabilidade, capacidade de penetração em células bacterianas (KONOPKA e GOSLINSKI, 2007). Dentre os fotossensibilizadores mais empregados na terapia fotodinâmica estão o azul de metileno e o verde de malaquita. O azul de metileno é um composto hidrofílico de baixo peso molecular, que penetra através das porinas da membrana externa de bactérias Gram-negativas (FIMPLE *et al.*, 2008). Ele não apresenta toxicidade em humanos e é absorvido pelo tecido alvo, necessitando de fonte de luz de baixa intensidade (CHREPA *et al.*, 2014). O verde de malaquita penetra facilmente na membrana celular de bactérias Gram-positivas e negativas. Um aspecto de importância é que após o uso do fotossensibilizador, o período de pré irradiação deve ser aguardado, que corresponde ao tempo entre a aplicação do fotossensibilizador e sua ativação pela luz. Este tempo é necessário para que o fotossensibilizador atinja o alvo antes da irradiação. A ação da terapia fotodinâmica está baseada na administração de um fotossensibilizador, seguido de uma dose de radiação de luz em um comprimento de onda adequado. A absorção da luz ativa o fotossensibilizador, que na presença de oxigênio, produz uma cascata de efeitos fotoquímicos que resultam na produção de oxigênio altamente reativo, o qual é tóxico para células tumorais, bactérias e fungos (KONOPKA *et al.*, 2007).

No geral, as bactérias Gram-positivas são, devido a características estruturais, mais susceptíveis a terapia fotodinâmica (WAINWRIGHT *et al.*, 1998; USACHEVA *et al.*, 2001). A membrana citoplasmática da célula Gram-positiva é rodeada por uma camada de peptídeoglicano e ácido lipoteicóico, o que permite que o fotossensibilizador atravesse as bactérias Gram-positivas. Já as bactérias Gram-negativas apresentam membrana citoplasmática interna e uma membrana externa, separadas pelo espaço periplásmico e o peptídeoglicano, que acabam funcionando como uma barreira física. Os fotossensibilizadores neutros ou aniônicos são eficazes na ligação e inativação de bactérias Gram-positivas. Nas bactérias Gram-negativas, estas moléculas se ligam à membrana externa, não sendo capazes de inativar as bactérias completamente após a aplicação do laser (HAMBLIN e HASAN 2004).

Para inativar uma célula bacteriana, o fotossensibilizador deve ser absorvido pela membrana celular e/ou ser transportado para o citoplasma, levando à inibição de DNA, de RNA e da síntese de proteínas (USACHEVA *et al.*, 2001).

Vários estudos relataram que com exceção da *Candida albicans* (ELDENIZ *et al.*, 2013), todos os demais microrganismos testados apresentaram sensibilidade à terapia fotodinâmica, em diferentes níveis (SEAL *et al.*, 2002; BONSOR *et al.*, 2006a; BONSOR *et al.*, 2006b; GARCEZ *et al.*, 2006; SOUKOS *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007; FOSCHI *et al.*, 2007; FIMPLE *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2011; RIOS *et al.*, 2011; BAGO *et al.*, 2013; GARCEZ *et al.*, 2013; KOMINE & TSUJIMOTO, 2013; STOJICIC *et al.*, 2013). Os resultados também demonstraram que a terapia fotodinâmica é mais eficaz em células planctônicas que em biofilmes (GARCEZ *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006, BONSOR *et al.*, 2006b; LIM *et al.*, 2009; SCHLAFER *et al.*, 2010; SHRESTHA & KISHEN, 2012).

Rios *et al.* (2011) observaram que a associação entre hipoclorito de sódio a 6% e a terapia fotodinâmica resultou em baixa taxa de sobrevivência de *E. faecalis* (0,1%), em canais radiculares de dentes extraídos. Quando o hipoclorito de sódio ou a terapia fotodinâmica foram empregados separadamente, a taxa de sobrevivência deste microrganismo foi igual a 0,66% e 2,9%, respectivamente. Chrepa *et al.* (2014) consideraram a terapia fotodinâmica uma forma adjuvante na desinfecção do sistema de canais radiculares. Trindade *et al.* (2015) relataram que a terapia fotodinâmica associada ao tratamento endodôntico convencional é capaz de promover redução bacteriana em canais radiculares, além de produzir melhores condições para o reparo tecidual através da modulação do processo inflamatório.



PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Presente estudo teve por objetivo a avaliação da eficácia do laser Diiodo em dentina infectada por *Enterococcus faecalis*.



MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás sob número CAAE 19811113.0.0000.5083

4.1 PREPARO DE BLOCOS DE DENTINA

Oitenta blocos de dentina foram confeccionados a partir de dentes humanos unirradiculares recém-extraídos. Os dentes apresentavam indicação de exodontia por motivo periodontal ou protético. Os dentes foram doados após a leitura, compreensão e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, por pacientes maiores de 18 anos, resguardando sigilo quanto a sua privacidade e confidencialidade.

Os dentes selecionados apresentaram ausência de defeitos ou reabsorções radiculares internas ou externas, raízes completamente formadas, canais não calcificados, ausência de coroa protética ou pino intrarradicular, ausência de tratamento endodôntico prévio e um único canal com forame apical único, comprovados por meio de exame radiográfico nos sentidos mesio-distal e vestibulo-lingual, visualização do ápice radicular por meio de lupa e exploração do canal radicular com auxílio de lima tipo K #15.

Os dentes extraídos foram acondicionados em solução de timol a 0,2% até o momento da obtenção dos blocos de dentina. As coroas foram removidas por meio de um corte horizontal com disco de carborundum (Vipi, Pirassununga, São Paulo, Brasil) e os comprimentos das raízes padronizados em 14 mm (desde o ápice radicular até o bordo cervical). Então, as raízes foram seccionadas empregando-se máquina de corte Extec Labcut 1010 Low Speed Saw Diamante (Buehler- Lake Bluff, Illinois, EUA) sob abundante refrigeração ar/água. A partir do terço coronário das raízes foi possível a obtenção de discos de dentina que foram seccionados em quatro espécimes de forma a se obter blocos de dentina com as seguintes dimensões: 4mm de altura x 4mm de comprimento. O tamanho dos blocos foi verificado usando um paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, São Paulo, Brasil) e, quando necessário, as dimensões foram ajustadas com o emprego de disco de polimento fino (3M ESPE Dental Products, St. Paul, MN, EUA).

Após a obtenção dos blocos, a superfície externa foi isolada com duas camadas de esmalte de unha (Max Factor Cosmetics and Fragrances, Londres, Reino Unido) para prevenir infiltrações. Os espécimes foram lavados duas vezes em cuba ultrassônica (Cristófoli Equipamentos, Campo Mourão, Paraná, Brasil) durante 5 minutos empregando-se EDTA a 17% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil) e, em seguida, procedeu-se um banho durante 10 minutos com água destilada esterilizada em cuba ultrassônica. Os blocos de dentina foram esterilizados em autoclave (Cristófoli Equipamentos, Campo Mourão, Paraná, Brasil) durante 30 minutos a 120°C e, na sequência, foram incubados em 7 mL de BHI a 37°C por 48 horas para assegurar a esterilização. Decorrido o período, nenhum crescimento bacteriano foi observado.

4.2 INDICADOR BIOLÓGICO

Para o presente estudo foi utilizada amostra do microrganismo *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A cepa foi inoculada em 7 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e incubada a 37°C por 24 horas. O microrganismo indicador foi cultivado na superfície do *BHI* seguindo as mesmas condições da incubação. Células microbianas foram suspensas em solução fisiológica para dar uma concentração final de cerca de 3×10^8 células/mL, semelhante ao tubo nº 1 da escala *MacFarland*.

4.3 CONTAMINAÇÃO DOS BLOCOS DE DENTINA

Os blocos de dentina foram inoculados com 0,01 mL do inóculo bacteriano utilizando cultura pura de *E. faecalis* com 24 horas de preparo e ajustada ao padrão 1 de McFarland. Os blocos contaminados foram incubados durante 07 dias, mantidos em meio úmido a 37°C.

Dez espécimes não contaminados foram incubados a 37°C durante o período de contaminação, para testar a esterilidade das amostras, correspondendo ao grupo controle negativo enquanto o grupo controle positivo foi composto por dez espécimes contaminados, que foram incubados a 37°C durante todo o período experimental para avaliar a viabilidade do indicador biológico.

4.4 SOLUÇÃO EXPERIMENTAL

A solução testada neste experimento foi o hipoclorito de sódio a 2,5% (Fitofarma, Goiânia, GO, Brasil).

4.5. TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica empregada neste estudo foi constituída pelo laser Diiodo em baixa potência, com comprimento de onda de 660nm (Sirolaser, Sirona, Bensheim, Alemanha) em espectro vermelho e luz em modo contínuo, com tempos de aplicação de 180s, para o laser de 18J e 80s para o laser de 8J.

4.6. DELINEAMENTO

Os blocos de dentina contaminados foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos experimentais, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais

GRUPOS	N	PROTOCOLO
C ⁺	10	Discos de dentina contaminados
C ⁻	10	Discos de dentina não contaminados
1	10	NaOCL a 2,5%
2	10	NaOCL a 2,5% + TFD com azul de metileno – laser 18J e 180s
3	10	NaOCL a 2,5% + TFD com azul de metileno – laser 8J e 80s
4	10	Azul de metileno
5	10	TFD com azul de metileno – laser 18J e 180s
6	10	TFD com azul de metileno – laser 8J e 80s

*C⁺(Controle positivo);**C⁻ (Controle negativo)

No grupo 1, os blocos de dentina foram imersos, em 5 mL de hipoclorito de sódio à 2,5% por um período de 5 minutos. Posteriormente, cada disco foi enxaguado com 5 mL de água destilada esterilizada e transferido individualmente para 7 mL de BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) adicionado de neutralizadores tiosulfato de sódio (P.A., Art Laboratories, Campinas, SP, Brasil) e Tween 80 em concentrações apropriadas, e subsequentemente, incubados a 37°C

por 48 horas.

Nos grupos 2 e 3, os blocos de dentina foram imersos em 5 mL de hipoclorito de sódio a 2,5% por período de 5 minutos, cada disco foi enxaguado com 5 mL de água destilada esterilizada. Posteriormente foram transferidos individualmente para potes do tipo Dapen com o fotossensibilizador azul de metileno a 0,001% (Farmácia Phloraceae, Cuiabá, MT, Brasil) onde permaneceram durante 3 minutos (período pré-irradiação), seguindo-se novo enxágue com 5 mL de água destilada esterilizada e a irradiação. Após a irradiação cada disco foi transferido individualmente para 7 mL de BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) adicionado de neutralizadores tiosulfato de sódio (P.A., Art Laboratories, Campinas, SP, Brasil) e Tween 80 em concentrações apropriadas, seguida de incubação a 37°C por 48 horas.

No grupo 4, os blocos de dentina foram imersos no fotossensibilizador azul de metileno a 0,001% (Farmácia Phloraceae, Cuiabá, MT, Brasil), onde permaneceram durante 3 minutos (período pré-irradiação), seguindo-se enxágue com 5 mL de água destilada esterilizada. Os discos foram transferidos individualmente para 7 mL de BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) adicionado de neutralizadores tiosulfato de sódio (P.A., Art Laboratories, Campinas, SP, Brasil) e Tween 80 em concentrações apropriadas, seguida de incubação a 37°C por 48 horas.

Nos grupos 5 e 6, os blocos de dentina foram imersos diretamente no fotossensibilizador azul de metileno a 0,001% (Farmácia Phloraceae, Cuiabá, MT, Brasil) por 3 minutos, seguindo-se enxágue com 5 mL de água destilada esterilizada e a irradiação. Após a irradiação cada disco foi transferido individualmente para 7 mL de BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) adicionado de neutralizadores tiosulfato de sódio (P.A., Art Laboratories, Campinas, SP, Brasil) e Tween 80 em concentrações apropriadas, e subseqüentemente, incubados a 37°C por 48 horas.

4.7. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

O crescimento microbiano foi analisado pela turbidez do meio de cultura. Subseqüentemente, um inóculo de 0,1 mL obtido do BHI foi transferido para 5 mL de *Lethen Broth*, sob condições idênticas de incubação. A coloração de Gram foi usada nas culturas de BHI para verificação da contaminação e crescimento, sendo examinados macro e microscopicamente. A concentração microbiana foi analisada

utilizando espectrofotômetro UV (Spectrophotometer Model Nova 1600 UV, Piracicaba, SP, Brasil) ajustado para leitura em comprimento de onda $\lambda = 600$ nm.

4.8. ANÁLISE POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os espécimes passaram por bateria ascendente de álcool (Merck, Darmstadt, Alemanha) de 50%, 60%, 70%, 80%, 96% e 100%, sendo mantidos por uma hora em cada álcool e finalizados com dois banhos, de uma hora cada, em álcool absoluto – 100% (Merck, Darmstadt, Alemanha). Concluído o processo de desidratação, foram as amostras montadas sobre estruturas cilíndricas de aproximadamente 10 milímetros de diâmetro por 10 milímetros de altura previamente identificados de acordo com cada grupo experimental, denominados “stubs”, utilizando-se fita adesiva de dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Washington, Estados Unidos). O passo seguinte foi a metalização, com fina camada (cerca de 30 nm) de ouro ou uma liga de ouro e paládio sob os espécimes em aparelho de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, Liechtenstein, Suíça), com pressão de 0,01 mbar, corrente de 40mA, distância de trabalho de 50 milímetros, tempo de cobertura de 110 segundos e espessura média de deposição de 20 a 30 nm. Concluída a etapa de preparação, os espécimes foram levados ao microscópio eletrônico de varredura (JSM 5410, JEOL Ltda, Tóquio, Japão), do Laboratório de Química da Universidade Federal de Goiás. Na sequência, foram realizadas as fotomicrografias eletrônicas de varredura das respectivas áreas apicais, com aumento de 1500 e 3.000 vezes. As imagens foram analisadas para verificação do padrão de contaminação presente após o experimento.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos erros aleatórios em torno da média foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk, no período inicial e final da análise em espectrofotômetro. Para comparação dos dados obtidos entre os diferentes métodos de sanificação do canal radicular em cada período. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para que seja minimizado a possibilidade de viés, foi utilizado para correção dos dados finais do espectrofotômetro o método dos mínimos quadrados. Para comparação dos dados

iniciais e finais paramétricos foi utilizado o teste dos postos assinalados de Wilcoxon.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

A tabela 2 mostra as médias e desvios padrão dos dados de espectrometria avaliados nas diferentes condições experimentais, tanto para análise inicial (antes da sanificação do canal radicular) quanto final (após sanificação do canal radicular). A análise da distribuição dos erros aleatórios em torno da média por meio do teste de Shapiro-Wilk, no período inicial e final, revelou a inexistência de distribuição normal ($p < 0,05$). Para comparação dos dados obtidos entre os diferentes métodos de sanificação do canal radicular em cada período de teste (dados não pareados), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e este mostrou haver diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$), antes e depois da sanificação. Diante destes resultados, a comparação dos dados de espectrofotometria após emprego dos métodos de sanificação poderia sofrer viés, visto que as diferenças já existiam antes disso acontecer. Desta forma, foi proposta uma correção dos dados finais de espectrofotometria por meio do método dos mínimos quadrados. Para comparação dos dados entre os períodos inicial e final (dados pareados), foi utilizado o teste dos postos assinalados de Wilcoxon, sendo que este revelou haver diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Desta forma, após a sanificação do canal radicular, houve significativa redução de microrganismos, evidenciada pelos menores valores de espectrofotometria encontrados.

Tabela 2 – Médias e desvios padrão dos valores de espectrofotometria para os diferentes métodos de sanificação do canal radicular, período inicial (antes da sanificação) e final (depois da sanificação).

±Método de Sanificação	Inicial	Final
Controle positivo	0,834 ± 0,058a	0,852 ± 0,058a
Controle Negativo	0,000 ± 0,000a	0,000 ± 0,000a
NaOCl 2,5%	0,818 ± 0,086a	0,181 ± 0,098b
NaOCl 2,5% + TFD - 18J-180s	0,781 ± 0,054a	0,208 ± 0,011b
NaOCl 2,5% + TFD – 8J-80s	0,863 ± 0,043a	0,207 ± 0,127b
Azul de Metileno	0,772 ± 0,031a	0,364 ± 0,038b
TFD 18J-180s	0,874 ± 0,041a	0,342 ± 0,020b
TFD 8J-80s	0,779 ± 0,048a	0,356 ± 0,018b

*letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes $n. p < 0,05$). TFD – Terapia fotodinâmica

Inicialmente, foi feito o teste de regressão linear entre os dados iniciais e finais, para se verificar a correlação entre eles. Esta análise revelou haver significância

estatística ($p < 0,001$). Foi anotado o coeficiente angular encontrado (0,434) e obtido um valor padrão de espectrometria inicial pelo cálculo da média dos valores dos diferentes grupos investigados (0,817), e estes dados foram aplicados à equação da reta [Espectrometria ajustada = espectrometria final da amostra + coeficiente angular*(espectrometria inicial da amostra – espectrometria padrão)]. A tabela 3 mostra as médias e desvios padrão dos dados obtidos com esse cálculo.

Tabela 3 – Médias e desvios padrão dos valores de espectrofotometria para os diferentes métodos de sanificação do canal radicular, período final (depois da sanificação), após correção pelo método dos mínimos quadrados.

Método de Sanificação	Espectrofotometria Final Corrigida
Controle positivo	0,860 ± 0,083 c*
Controle negativo	0,000 ± 0,000 d
NaOCl 2,5%	0,181 ± 0,098 a
NaOCl 2,5% + TFD - 18J-180s	0,192 ± 0,127 a
NaOCl 2,5% + TFD – 8J-80s	0,226 ± 0,122 a
Azul de Metileno	0,344 ± 0,041 b
TFD 18J-180s	0,367 ± 0,032 b
TFD 8J-80s	0,339 ± 0,029 b

*letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes $n. p < 0,05$). TFD – Terapia fotodinâmica

Este novo conjunto de dados, agora ajustado de acordo com um valor padrão de espectrometria inicial (exceto para o grupo controle negativo), foi analisado quando à distribuição dos erros aleatórios em torno da média por meio do teste de Shapiro-Wilk, onde não foi observada distribuição normal ($p < 0,05$). Diante disso, os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis, que revelou haver diferenças estatisticamente significantes para os diferentes métodos de sanificação do canal radicular ($p < 0,001$). A aplicação do teste de Tukey, para dados não paramétricos, revelou que o grupo controle positivo mostrou maior contaminação bacteriana que os demais ($p < 0,05$), exceto em comparação com os grupos onde apenas o laser foi usado, independente dos parâmetros empregados, e o grupo em que o azul de metileno foi utilizado ($p > 0,05$) (Figura 1- A a F). Os canais radiculares sanificados com o laser na potência de 18J por 180s apresentaram maior contaminação bacteriana do que o controle negativo e do que os grupos em que o hipoclorito foi empregado associado ou não ao laser na potência de 18J por 180s ($p < 0,05$). Diferenças foram encontradas também entre sanificação com laser 8J/80s

e o controle negativo; e entre a sanificação com azul de metileno e este mesmo controle ($p < 0,05$) (Figura 2- A a D). Os demais métodos de sanificação não foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

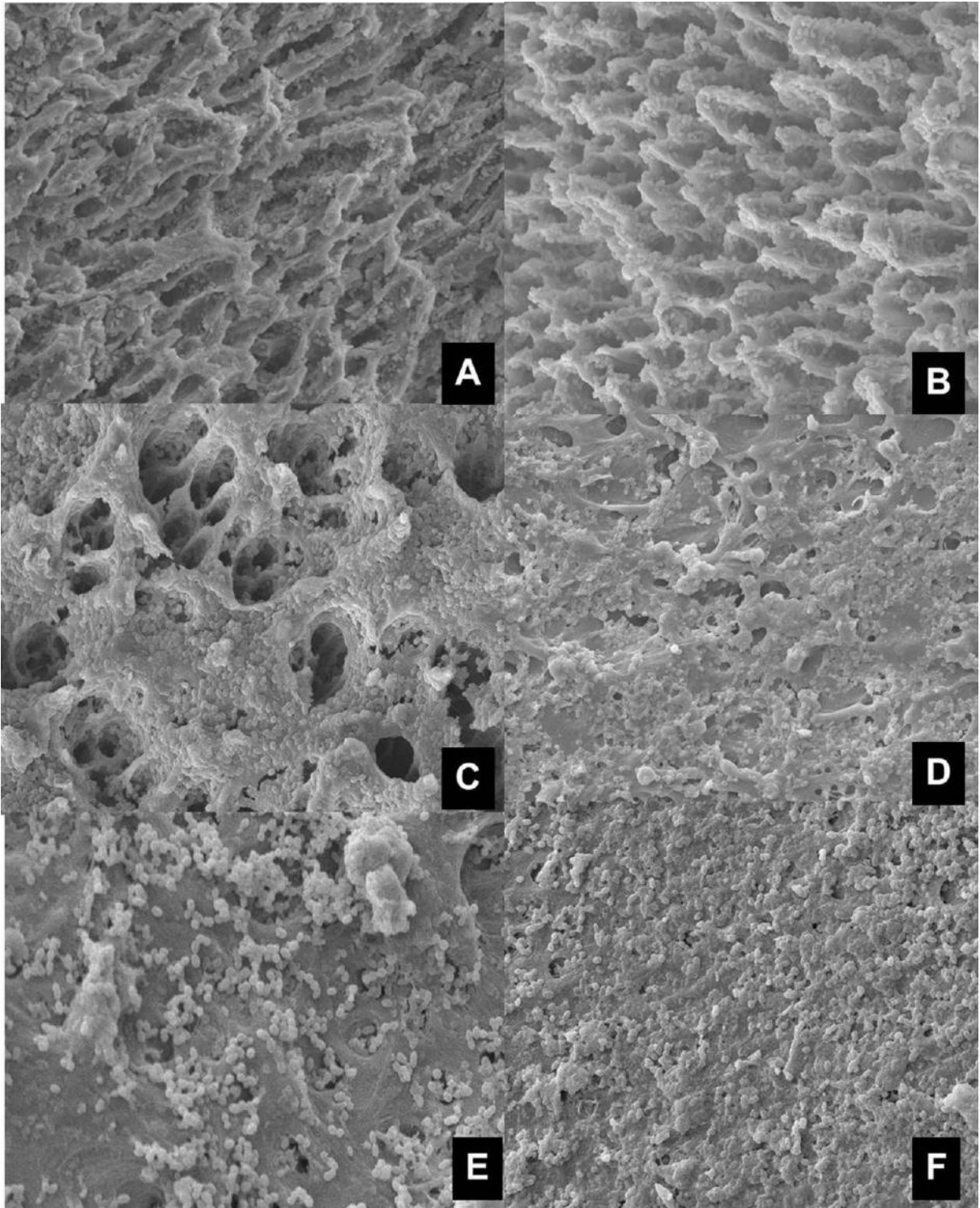


Figura 1- **A-** Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de NaOCl 2,5% (x.1500); **B-** Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de NaOCl 2,5% %+TFD com azul de metileno – laser 18J e 180s (x.1500). **C-** Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de NaOCl a 2,5%+TFD com azul de metileno – laser 8J e 80s (x1.500). **D-** Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação azul de metileno (x1.500). **E-** Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de azul de metileno + TFD – laser 18J 180s (x1.500). **F-** Imagem em microscopia eletrônica de varredura de amostra submetida a aplicação de azul de metileno + TFD – laser 8J 80s (x1.500).

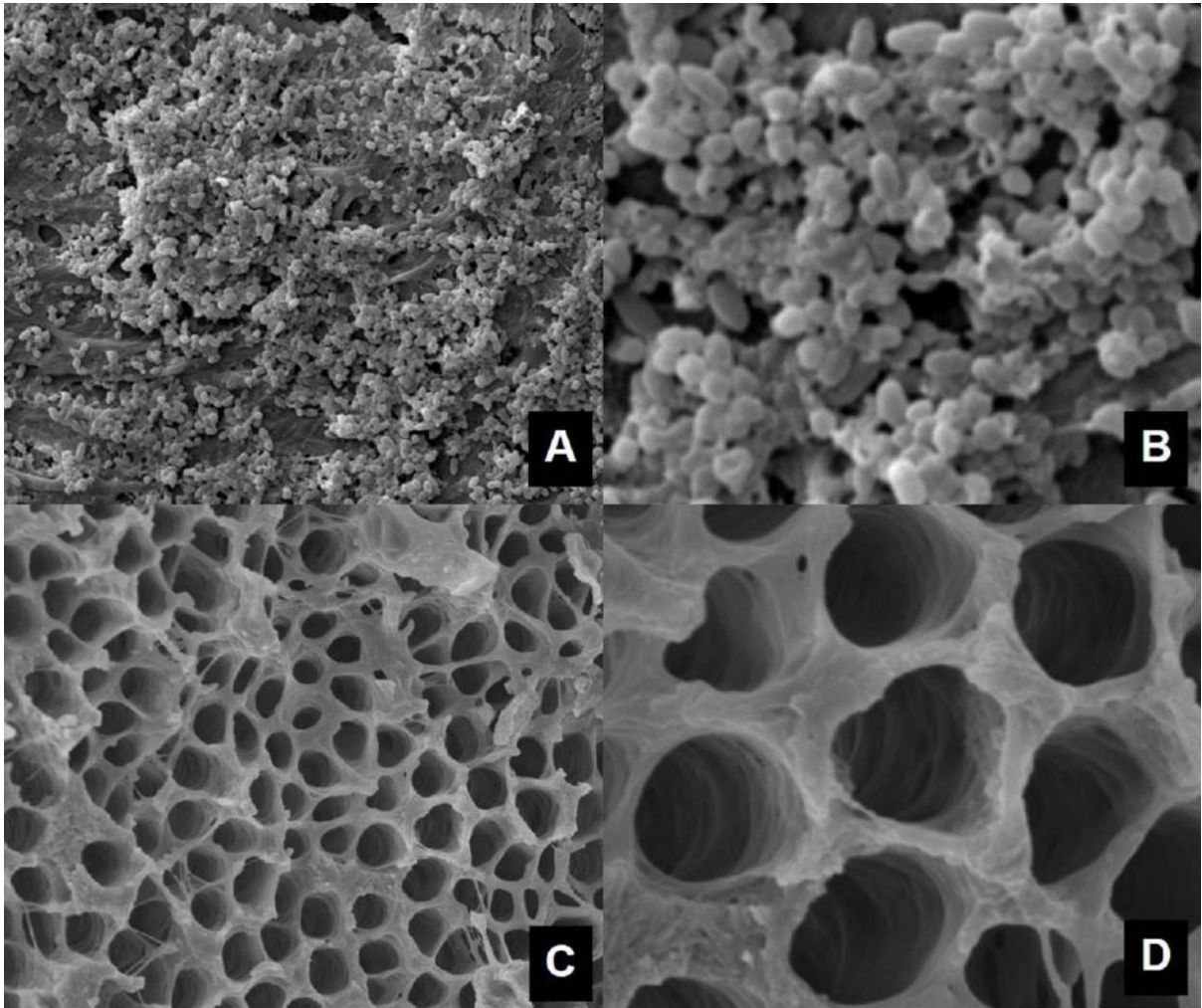


Figura 2- Figura 2- Imagem em microscopia eletrônica de varredura dos grupos controle positivo e negativo. **A-** Grupo controle positivo 1.500x. **B-** Grupo controle positivo 5.000x. **C-** Grupo controle negativo 1.500x. **D-** Grupo controle negativo 5.000x.

DISCUSSÃO



DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que após a sanificação do canal radicular, houve significativa redução de microrganismos. O teste de *Kruskal-Wallis* revelou haver diferenças estatisticamente significantes para os diferentes métodos de sanificação do canal radicular ($p < 0,001$). A aplicação do teste de *Tukey* mostrou que o grupo controle positivo mostrou maior contaminação bacteriana que os demais ($p < 0,05$). Os canais radiculares sanificados com o laser na potência de 18J por 180s apresentaram maior contaminação bacteriana do que o controle negativo e do que os grupos em que o hipoclorito foi empregado associado ou não ao laser na potência de 18J por 180s ($p < 0,05$). Diferenças também foram encontradas entre a sanificação com laser 8J/80s e o controle negativo; e entre a sanificação com azul de metileno e este mesmo controle ($p < 0,05$). Os demais métodos de sanificação não foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

O marcador biológico foi escolhido tendo como base sua presença no canal radicular, principalmente em dentes com insucesso do tratamento endodôntico (PORTENIER *et al.*, 2003; ESTRELA *et al.*, 2008, 2012, 2014; AL-AHMAD *et al.*, 2009; ARIAS-MOLIZ *et al.*, 2009; RIOS *et al.*, 2011; STOJICIC *et al.*, 2013). Foi empregado o biofilme de *Enterococcus faecalis* com 7 dias em função de já ter sido anteriormente descrito que os microrganismos de um biofilme apresentam maior resistência que células planctônicas (LOVE 2001; SPRATT *et al.*, 2001; SPRATT *et al.*, 2003; ESSENSÄTER *et al.*, 2004; SEDGLEY *et al.*, 2005; DUGGAN *et al.*, 2007; USHA *et al.*, 2010). Com relação à metodologia empregada, já foi previamente empregada (JURIC *et al.*, 2015).

A definição da melhor concentração e da substância irrigadora ideal ainda não existe. Estudos mostraram que a concentração ideal do hipoclorito de sódio para emprego no tratamento endodôntico varia de 1 a 2,5%, entretanto outros apontaram a clorexidina como substância ideal. Essa afirmativa também é válida para o tempo de ação destas substâncias sobre os microrganismos. Enquanto alguns estudos afirmaram a necessidade de um período de tempo curto para ocorrer a ação antimicrobiana, outros são discordantes (HUQUE *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 2001; SPRATT *et al.*, 2001; ESTRELA *et al.*, 2002a, ESTRELA *et al.*, 2002b, ESTRELA *et al.*, 2003a; ESTRELA *et al.*, 2003b; HAAPASALO *et al.*, 2003; ESTRELA *et al.*, 2006,

ESTRELA *et al.*, 2008; GREGORIO *et al.*, 2010; HAAPASALO *et al.*, 2010; DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011; KARALE *et al.*, 2011; BASRANI *et al.*, 2012; ESTRELA *et al.*, 2012a; ESTRELA *et al.*, 2012b; HÜSMANN, 2013; SILVA *et al.*, 2013; TIANFENG *et al.*, 2014; GIARDINO *et al.*, 2014).

Considerando a necessidade de sanificação do sistema de canais radiculares e a falta de consenso em relação a solução irrigadora, sua concentração e protocolo de utilização, a terapia fotodinâmica tem sido considerada aliada ao tratamento endodôntico convencional para a eliminação da microbiota que se mantém viável no canal radicular (SILVA *et al.*, 2012; EICK *et al.*, 2013; OK *et al.*, 2014). Xu *et al.* (2009) demonstraram que a terapia fotodinâmica pode ser utilizada como adjuvante ao tratamento endodôntico sem que ocorram danos às células da região periapical. Além disso, comparada à terapia antimicrobiana convencional, ela apresenta a vantagem de não levar ao desenvolvimento de mecanismos de resistência microbiana e de poder ser empregadas várias vezes, pois não apresenta efeito cumulativo. Quaisquer macromoléculas das células microbianas podem servir de alvo para as moléculas de oxigênio altamente reativas, ou seja, quaisquer moléculas podem ser alvos potenciais (WILSON *et al.*, 2004; SOUKOS *et al.*, 2011). Desta forma, a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica tem sido objeto de vários estudos (HARDEE *et al.*, 1994; SOUKO *et al.*, 2006; BERGMANS *et al.*, 2008; HAAPASALO *et al.*, 2010; RIOS *et al.*, 2011; BAGO *et al.*, 2013; ELDENIZ *et al.*, 2013).

A terapia fotodinâmica é mais efetiva em células planctônicas que em biofilme do canal radicular. (GARCEZ *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006; SCHLAFER *et al.*, 2010; SHRESTHA E KISHEN 2012). Da mesma forma, o biofilme maduro é mais difícil de ser eliminado. Assim, alguns estudos apresentaram o efeito da TFD sobre biofilmes recentes e maduros (BONSOR *et al.*, 2006a; BONSOR *et al.*, 2006b; LIM *et al.*, 2009).

O efeito antimicrobiano de diferentes protocolos, com ou sem o emprego da terapia fotodinâmica, tem sido avaliados. Dentre aqueles que empregaram apenas a TFD houve redução microbiana (SOUKOS *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006; FOSCHI *et al.*, 2007; BERGMANS *et al.*, 2008; FIMPLE *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008; SCHLAFER *et al.*, 2010). Outros compararam a TFD com diferentes soluções irrigadoras, enquanto outros ainda associaram o tratamento endodôntico

com o emprego de diferentes soluções irrigadoras à terapia fotodinâmica, apresentando resultados melhores na redução dos microrganismos (SEAL *et al.*, 2002; GARCEZ *et al.*, 2007; LIM *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2011; RIOS *et al.*, 2011).

Soukos *et al.* (2006) investigaram o efeito da terapia fotodinâmica em canais radiculares de dentes extraídos e infectados. Para tanto, os autores empregaram o laser Diiodo no comprimento de onda de $\lambda=665$ nm. Os resultados demonstraram a inoculação dos microrganismos, com exceção do *E. faecalis* que sofreu apenas redução. A diferença deve provavelmente estar associada à organização microbiana na forma de biofilme, como já relatado em outros trabalhos. (KONOPKA *et al.*, 2007; LIM *et al.*, 2009).

Considerando os resultados previamente descritos, outros autores estão de acordo com os resultados encontrados. Pinheiro *et al.* (2009) estudaram a ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica com laser Diiodo em dentes decíduos com necrose pulpar, após o tratamento endodôntico convencional. O tratamento endodôntico convencional reduziu 82,59% dos microrganismos, mas após a TFD a redução microbiana foi igual a 98,37%. Garcez *et al.* (2010) avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica em retratamentos endodônticos. Os autores concluíram que a TFD associada ao tratamento endodôntico convencional leva a redução da quantidade de microrganismos. Queiroga *et al.* (2011) avaliaram a eficácia de diferentes dosagens de laser (60 J/cm², 120 J/cm², 180 J/cm²) sobre *Candida sp.*, e puderam concluir que a dose maior foi a mais efetiva e reduziu 78% do microrganismo. Vaziri *et al.* (2012) analisaram o emprego da TFD associada ao uso do hipoclorito de sódio a 2,5% e verificaram eliminação total do *E. faecalis* em canais unirradiculares. Filipov *et al.* (2013) investigaram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre biofilme de cinco dias de *E. faecalis* e *Candida albicans*, através de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram redução dos microrganismos no canal radicular. Tennert *et al.* (2014) verificaram que a terapia fotodinâmica foi menos efetiva que o hipoclorito de sódio, resultados semelhantes aos deste estudo.

A PDT pode ser empregada como auxiliar ao tratamento endodôntico (Oliveira *et al.*, 2014), porém para que essa terapia apresente efetividade máxima, mais estudos devem ser realizados para a determinação clara de parâmetros como dose

de energia adequada, tipo e concentração do fotossensibilizador, tempo de pré-irradiação e exposição.

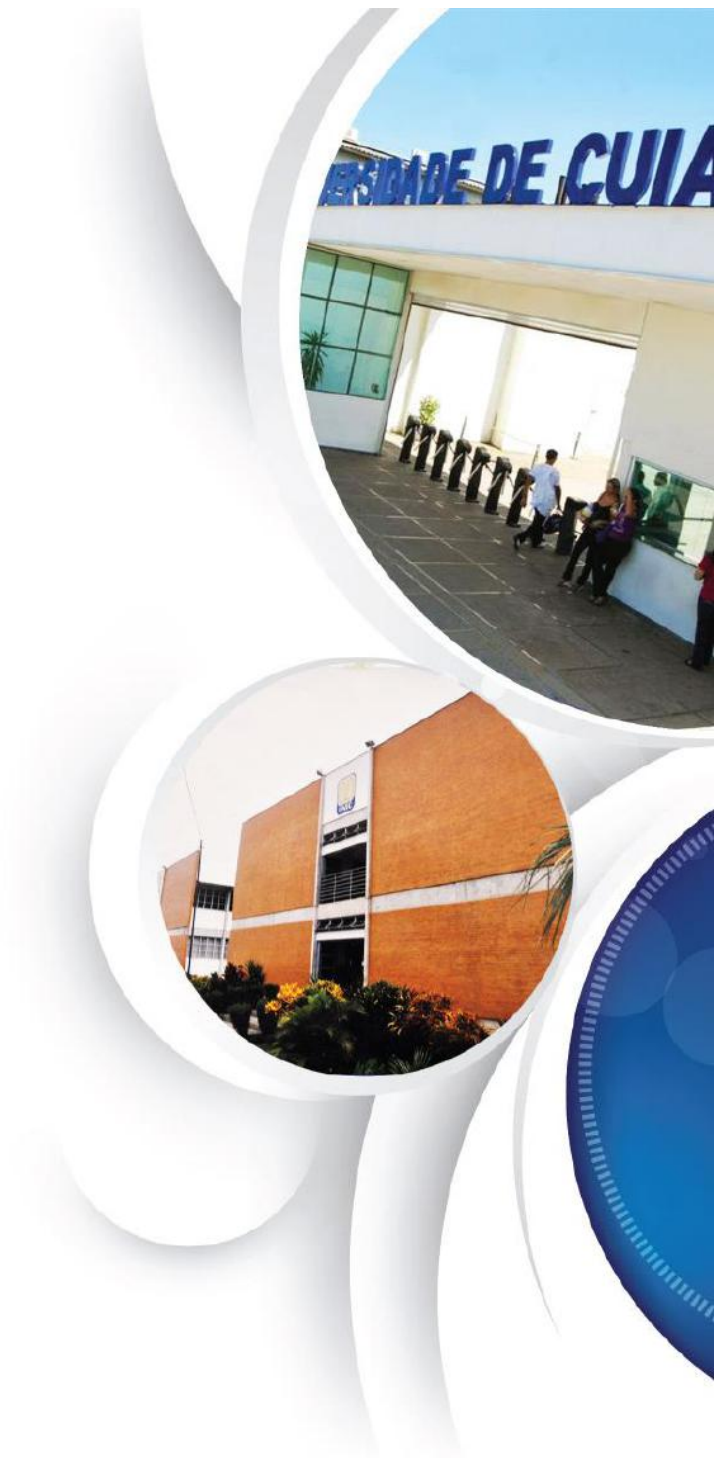
CONCLUSÃO



CONCLUSÃO

A terapia fotodinâmica com o laser Diodo, em comprimento de onda de 660nm, foi eficaz na redução do *Enterococcus faecalis*. Os canais radiculares sanificados com o laser na potência de 18J por 180s apresentaram maior contaminação bacteriana que os grupos em que o hipoclorito foi empregado, associado ou não, ao laser na potência de 18J por 180s.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ACKROYD R.; KELTY C.; BROWN N.; REED M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.**, v. 74, n.5, p.656-669, 2001.
- AL-AHMAD A.; MÜLLER N.; WIEDMANN AL-AHMAD M.; SAVA I.; HÜBNER J.; FOLLO M. Endodontic and salivary isolates of *Enterococcus faecalis* integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated in vitro. **J Endod.**, v. 35, n. 7, p. 986-991,2009.
- ARIAS-MOLIZ M. T. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. **J Endod.**, v. 35, n. 5, p. 711-714, 2009.
- BAGO I.; PLEČKO V.; GABRIĆ PANDURIĆ D.; SCHAUPERL Z.; BARABA A.; ANIĆ I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. **Int Endod J.**, v.46, n.4, p. 339-347, 2013.
- BASRANI B.; HAAPASALO M. Update on endodontic irrigating solutions. **Endod. Top.** ,v. 27, p. 74-102, 2012.
- BERGMANS L.; MOISIADIS P.; HUYBRECHTS B. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **Int Endod J.**, v. 41, n. 3, p. 227-239, 2008.
- BONSOR S. J.; NICHOL R.; REID T. M.; PEARSON G. J. An alternative regimen for root canal disinfection. **Br Dent J.**, v. 201, n. 2, p. 101-105, 2006a.
- BONSOR S. J.; NICHOL R.; REID T. M.; PEARSON G. J. Microbiological evaluation of photoactivated disinfection in endodontics (an in vivo study). **Br Dent J.**, v. 200, n. 6, p.337-341, 2006b.
- BOWDEN G. H.; HAMILTON I. R. Survival of oral bacteria. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 9, n. 1, p. 54-85, 1998.
- CALDWELL D. E.; ATUKU E.; WILKIE D. C.; WIVCHARUK K. P.;KARTHIKEYAN S.; KORBER D. R. Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. **Adv Dent Res.**, v. 11, n. 1, p. 4-13, 1997.
- CHENG X.; GUAN S.; LU H. Evaluation of the bactericidal effect of Nd p. YAG,Er p. YAG, Er,Cr p. YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy aPDT)

in experimentally infected root canals. **Lasers Surg Med.**, v. 44, n. 10, p. 824-831, 2012.

CHREPA V.; KOTSAKIS G. A.; PAGONIS T. C.; HARGREAVES K. M. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection. **J Endod.**, v.40, n. 7, p. 891-898, 2014.

COSTERTON J. W.; CHENG K. J.; GEESEY G. G.; LADD T. I.; NICKEL J. C.; DASGUPTA M. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol.**, v. 41, p. 435-464, 1987.

COSTERTON J. W.; LEWANDOWSKI Z.; DEBEER D.; CALDWELL D.; KORBER D.; JAMES G. Biofilms, the customized microniche. **J Bacteriol.**, v. 176, n. 8, p. 2137-2142, 1994.

COWAN M. M.; TAYLOR K. G.; DOYLE R. J. Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite. **J Bacteriol.**, v. 169, n. 7, p. 2995-3000, 1987.

DENOTTI G.; PIGA R.; MONTALDO C.; ERRIU M.; PILIA F.; PIRAS A.; LUCA M. D.; ORRÙ G. In Vitro evaluation of *Enterococcus faecalis* adhesion on various endodontic medicaments. **Open Dent J.**, v. 9, n. 3, p. 120-124, 2009.

DORNELLES-MORGENTAL R. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 112, n. 3, p. 396-400, 2011.

DUGGAN J. M.; SEDGLEY C. M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **J Endod.** v. 33, n. 7, p. 815-818, 2007.

EICK S.; MARKAUSKAITE G.; NIETZSCHE S.; LAUGISCH O.; SALVI G. E.; SCULEAN A. Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 10, n. 2, p. 156-167, 2013.

ELDENIZ A. U.; GUNESER M. B.; AKBULUT M. B. Comparative antifungal efficacy of lightactivated disinfection and octenidine hydrochloride with contemporary endodontic irrigants. **Lasers Med Sci.**, v. 30, n. 2, p. 669-675, 2015.

ESTRELA C.; ESTRELA C. R.; BARBIN E. L.; SPANÓ J. C.; MARCHESAN M. A.;

PÉCORA J. D. Mechanism of Action of sodium hypochlorite. **Braz Dent J.**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002a.

ESTRELA C. R. A.; ESTRELA C.; CARVALHO A. L.; GONELLA A. L. P. F.; PECORA J. D. Controle microbiano e químico de diferentes soluções de hipoclorito de sódio. **Robrac.**, v. 11, n. 31, p. 16-21, 2002b.

ESTRELA C. R. A.; ESTRELA C.; REIS C.; BAMMANN L. L.; PECORA J. D. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. **Braz Dent J.**, v. 14, n. 3, p. 187-192, 2003a.

ESTRELA C.; RIBEIRO R. G.; ESTRELA C. R. A.; PECORA J. D.; SOUZA-NETO M D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Braz Dent J.**, v. 14, n. 1, p. 58-62, 2003b.

ESTRELA C.; ESTRELA C. R. A.; DECURCIO D. A.; HOLLANDA A. C. B.; SILVA J. A. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **Int Endod J.**, v. 40, n. 2, p. 85-93, 2007.

ESTRELA C.; SILVA J.; A DE ALENCAR A. H.; LELES C. R.; DECURCIO D. A. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*-A systematic review. **J Appl Oral Sci.**, v. 16, n. 6, p. 364-368, 2008.

ESTRELA C.; SYDNEY G. B.; FIGUEIREDO J. A.; ESTRELA C. R. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **J Appl Oral Sci.**, v.17, n. 2, p. 87-91, 2009.

ESTRELA C.; GONÇALVES A. H.; DECURCIO D. A.; BORGES A. H.; ESTRELA C. R. Influência de estratégias de sanificação no sucesso do tratamento da periodontite apical. **Robrac** v. 56, n. 21, p. 367-375, 2012.

ESTRELA C.; SOUSA-NETO M. D.; ALVES D. R. S.; ALENCAR A. H. G.; SANTOS T. O.; PÉCORA J. D. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. **Braz Dent J.**, v. 23, n. 6, p. 645-653, 2012.

ESTRELA C.; HOLLAND R.; ESTRELA C. R.; ALENCAR A. H.; SOUSA-NETO M. D.; PÉCORA J. D. Characterization of successful root canal treatment. **Braz Dent J.** v. 25, n. 1, p. 3-11, 2014.

FILIPOV I.; MARKOVA K.; BOYADZHIEVA E. Efficiency of photoactivates

disinfection on experimental biofilm – Scanning electron microscopy results. **J of IMAB.**, v. 19, n. 4, p. 383-287,2014.

FIMPLE J.; FONTANA C.; FOSCHI F. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **J Endod.**, v.34, n. 6, p. 728-734, 2008.

FONSECA M. B.; JÚNIOR P. O.; PALLOTA R. C.; FILHO H. F.; DENARDIN O. V.; RAPOPORTA.; DEDIVITIS R. A.; VERONEZI J. F.; GENOVESE W. J.; RICARDO A. L. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Photomed Laser Surg.** v. 26, n. 3, p. 209-213, 2008.

FOSCHI F.; FONTANA C. R.; RUGGIERO K.; RIAHI R.; VERA A.; DOUKAS A. G.; PAGONISTC KENT R.; STASHENKO P. P.; SOUKOS N. S. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. **Lasers Surg Med.**, v. 39, n. 10, p. 782-787, 2007.

GARCEZ A. S.; NÚÑEZ S. C.; LAGE-MARQUES J. L. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.102, n. 4, p. 93-98, 2006.

GARCEZ A. S.; RIBEIRO M. S.; TEGOS G. P.; NÚÑEZ S. C.; JORGE A. O.; HAMBLIN M. R. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Surg Med.** 2007 v. 39, n. 1, p. 59-66, 2007.

GARCEZ A. S.; FREGNANI E. R.; RODRIGUEZ H. M.; NUNEZ S. C.; SABINO C. P.; SUZUKI H RIBEIRO M. S. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? **Lasers Med Sci.**, v. 28, n. 1, p. 79-85, 2013.

GIARDINO L. Antibacterial power of sodium hypochlorite combined with surfactants and acetic acid. **Braz Dent J.**, v. 25, n. 4, p. 289-294,2014.

GOMES B. P.; FERRAZ C. C.; VIANNA M. E.; BERBERV B.; TEIXEIRA F. B.; SOUZA-FILHO F. J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J.**, v. 34, n. 6, p. 424-428, 2001.

GREGORIO C.; ESTEVEZ R.; CISNEROS R.; PARANJPE A.; COHENCA N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study.

J Endod., v. 36, n. 7, p. 1216-1221, 2010.

GRENIER D.; MAYRAND D. Nutritional relationships between oral bacteria. **Infect Immun.** , v. 53, n. 3, p. 616-620, 1986.

GUTKNECHT N.; MORITZ A.; CONRADS G.; SIEVERT T.; LAMPERT F. Bactericidal effect of the Nd p. YAG laser in vitro root canals. **J Clin Laser Med Surg.** v. 14, n. 2, p. 77-80, 1996a.

GUTKNECHT N.; KAISER F.; HASSAN A. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd p. YAG lasers. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 14, n. 1, p. 7-11, 1996b.

HAAPASALO SIRÉN E. K.; WALTIMO T. M.; ORSTAVIK D.; HAAPASALO M. P. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. **Int Endod J.**, v.33, n. 2, p. 126-31, 2000.

HAAPASALO SHEN Y.; QIAN W.; GAO Y. Irrigation in endodontics. **Dent Clin North Am.**, v. 54, n. 2, p. 291-312, 2010.

HAMBLIN M. R.; HASAN T. Photodynamic therapy p. a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci.**, v. 3, n. 5, p. 436-50, 2004.

HARDEE M. W.; MISERENDINO L. J.; KOS W.; WALIA H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd p. YAG laser irradiation. **J Endod.**, v. 20, n. 8, p. 377-380, 1994.

HÜLSMANN M. Effects of mechanical instrumentation and chemical irrigation on the root canal dentin and surrounding tissues. **Endodontic Topics.**, v. 29, p. 55,-86, 2013.

HUQUEJ.; KOTA K.; YAMAGA M.; IWAKU M.; HOSHINO E. Bacterial eradication from root dentine by ultrasonic irrigation with sodium hypochlorite. **Int Endod J.**, v.31, n. 4, p. 242-250, 1998.

JURIC I. B.; PLECKO V.; ANIC I.; PLESKO S.; JAKOVLJEVIC S.; ROCCA J. P.; MEDIONI E. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, Nd p. YAG laser and QMiX solution against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 13, p. 238-243, 2016.

KARALE R.; THAKORE A.; SHETTY V. An evaluation of antibacterial efficacy of 3%

sodium hypochlorite, highfrequency alternating current and 2% chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* p. an in vitro study. **J Conserv Dent.**, v. 14, n. 1, p. 2-5, 2011.

KOBA K.; KIMURA Y.; MATSUMOTO K.; TAKEUCHI T.; IKARUGI T.; SHIMIZU T. A histopathological study of the effects of pulsed NdYAG laser irradiation on infected root canals in dogs. **J Endod.**, v. 25, n. 3, p. 151-154, 1999.

KOMINE C.; TSUJIMOTO Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **J Endod.**, v. 39, n. 3, p. 411-414, 2013.

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

LIM Z.; CHENG J. L.; LIM T. W.; TEO E. G.; WONG J.; GEORGE S.; KISHEN A. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. **Aust Dent J.**, v. 54, n. 2, p. 108-114, 2009.

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

MARINHO B. V. S.; ARAÚJO A. C. S. O uso de enxaguatório bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **Int J Dent.**, v. 4, n. 6, p. 124-131, 2007.

MOLANDER A.; REIT C.; DAHLÉN G.; KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J.**, v.31, n. 1, p. 1-7, 1998.

NAIR P. N.; SJÖGREN U.; KREY G.; KAHNBERG K. E.; SUNDQVIST G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions p. A long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod.**, v. 16, n. 12, p. 580-588, 1990.

NAIR P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.15, n. 6, p. 348-381, 2004.

NAIR P. N.; HENRY S.; CANO V.; VERA J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 99, n. 2, p. 231-252, 2005.

NG R.; SINGH F.; PAPAMANOU D. A.; SONG X.; PATEL C.; HOLEWA C.; PATEL

N.; KLEPAC-CERAJ V.; FONTANA C. R.; KENT R.; PAGONIS T. C.; STASHENKO P. P.; SOUKOS N. S. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. **J Endod.**, v. 37, n. 2, p. 217-222, 2011.

NUNES M. R.; MELLO I.; FRANCO G. C.; DE MEDEIROS J. M.; DOS SANTOS S. S.; HABITANTE S. M.; LAGE-MARQUES J. L.; RALDI D. P. Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. **Photomed Laser Surg.**, v. 29, n. 12, p. 803-808, 2011.

OK E.; ERTAS H.; SAYGILI G.; GOK T. Effect of photoactivated disinfection on bond strength of three different root canal sealers. **Eur J Dent.**, v. 8, n. 1, p. 85-89, 2014.

OLIVEIRA B. P.; AGUIAR C. M.; CÂMARA A. C. Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontic infections. **Eur J Dent.**, v. 8, n. 3, p. 424-430, 2014.

OLIVEIRA J. C. M.; ALVES F. R. F.; UZEDA M.; RÔÇAS I. N.; SIQUEIRA J. F. Influence of serum and necrotic soft tissue on the antimicrobial effects of intracanal medicaments. **Braz Dent J.**, v. 21, n. 4, p. 295-300, 2010.

ORDINOLA-ZAPATA R.; BRAMANTE C. M.; GARCIA R. B.; DE ANDRADE F. B.; BERNARDINELLI N. Conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. **Acta Odontol Scand.**, v. 71, n. 3, p. 424-431, 2013.

ORSTAVIK K. D.; HAAPASALO M. Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dent Traumatol.**, v.6, n. 4, p. 142-149, 1990.

PASTER B. J.; BOCHES S. K.; GALVIN J. L.; ERICSON R. E.; LAU C. N.; LEVANOS V. A.; SAHASRABUDHE A.; DEWHIRST F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol.**, v. 183, n. 12, p. 3770-83, 2001.

PÉCORA J. D.; ESTRELA C.; BUENO M. R.; PORTO O. C.; ALENCAR A. H.; SOUSA-NETO M. D.; ESTRELA C. R. Detection of root canal isthmus in molars by map-reading dynamic using CBCT images. **Braz Dent J.**, v. 24, n. 6, p. 569-74, 2013.

PINHEIRO S. L.; SCHENKA A. A.; NETO A. A.; DE SOUZA C. P.; RODRIGUEZ H. M.; RIBEIRO M. C. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous

teeth. **Lasers Med Sci.**, v. 24, n. 4, p. 521-526, 2009.

PORTENIER I.; WALTIMO T.; HAAPASALO M. Enterococcus faecalis – The root canal survivor and “star” in post-treatment disease. **Endod Top.**, v. 6, p. 135-159, 2003.

QUEIROGA A. S.; TRAJANO V. N.; LIMA E. O.; FERREIRA A. F.; QUEIROGA A. S.; LIMEIRA F. A. In vitro photodynamic inactivation of Candida spp by different doses of low power laser light. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 8, n. 4, p. 332-236, 2011.

RICUCCI D.; SIQUEIRA J. F.; BATE A. L.; PITT FORD T. R. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis p. a retrospective study from twenty-four patients. **J Endod.**, v. 35, p. 493-502, 2009.

RIOS A.; HE J.; GLICKMAN G. N.; SPEARS R.; SCHNEIDERMAN E. D.; HONEYMAN A. L. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against Enterococcus faecalis in extracted human teeth. **J Endod.**, v. 37, n. 6, p. 856-859, 2011.

SANDOE J. A.; WITHERDEN I. R.; AU-YEUNG H. K.; KITE P.; KERR K. G.; WILCOX M. H. Enterococcal intravascular infecção relacionada ao cateter corrente sanguínea p. gestão e resultados de 61 casos consecutivos. **J Antimicrob Chemother.**, v.50, n. 4, p. 577-582, 2002.

SCHLAFER S.; VAETH M.; HORSTED-BINDSLEV P.; VAETH M.; HORSTED-BINDSLEV P.; FRANDBSEN E. V. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source p. an in vitro and ex vivo study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 109, n. 4, p. 634-641, 2010.

SEAL G. J.; NG Y. L.; SPRATT D.; BHATTI M.; GULABIVALA K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on Streptococcus Intermedius biofilm in root canals. **Int Endod J.**, v. 35, n. 3, p. 268-274, 2002.

SEDGLEY C. M.; MOLANDER A.; FLANNAGAN S. E.; NAGEL A. C.; APPELBE O. K.; CLEWELL D. B.; DAHLÉN G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic Enterococcus spp. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 20, n. 1, p. 10-19, 2005.

SHRESTHA A.; KISHEN A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity

of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. **J Endod.**, v.38, n. 9, p. 1275-1278, 2012.

SILVA L. A.; NOVAES A. B.; DE OLIVEIRA R. R.; NELSON FILHO P.; SANTAMARIA M. J. R.; SILVA R. A. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis p. A histopathological evaluation. **J Endod.**, v.38, n. 3, p. 360-366, 2012.

SILVA J. A.; CAETANO C. H. M. S.; ALENCAR A. H. G.; ESTRELA C. R. A.; BORGES A. H.; DECURCIO D. A. A critical analysis of the sanitization strategies on root canal cleaning. **Stomatos.**, v. 37, n. 19, p. 48-59, 2013.

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

SIQUEIRA J. F.; RÔÇAS N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 97, n. 1, p. 85-94, 2004.

SOUKOS N. S.; GOODSON J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontol.**, v. 55, n. 1, p. 143-166, 2001.

SOUKOS N. S.; CHEN P. S.; MORRIS J. T.; RUGGIERO K.; ABERNETHY A. D.; SOM S.; FOSCHI F.; DOUCETTE S.; BAMMANN L. L.; FONTANA C. R.; DOUKAS A. G. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **J Endod.**, v.32, n. 10, p. 979-984, 2006.

SOUZA L. C.; BRITO P. R.; DE OLIVEIRA J. C.; ALVES F. R.; MOREIRA E. J.; SAMPAIO-FILHO H. R.; ROCAS I. N.; SIQUEIRA J. F. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of enterococcus faecalis. **J Endod.**, V. 36, N. 2, P. 292-296, 2010.

SPRATT D. A.; PRATTEN J.; WILSON M.; GULABIVALA K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. **Int Endod J.**, v. 34, n. 4, p. 300-307, 2001.

SPRATT D. A.; PRATTEN J. Biofilms and the oral cavity. **Environm Scien and Bio / Technol.**, v. 2, p. 109-120, 2003.

STOJICIC S.; AMORIM H.; SHEN Y.; HAAPASALO M. Ex vivo killing of

Enterococcus faecalis and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. **Int Endod J.**, v. 46, n. 7, p. 649-659, 2013.

STUART C. H.; SCHWARTZ S. A.; BEESON T. J.; OWATZ C. B. Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. **J Endod.**, v.32, n. 2, p. 93-98, 2006.

SUNDQVIST G.; FIGDOR D.; PERSSON S.; SJÖGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

SVENSÄTER G.; BERGENHOLTZ G. Biofilms in endodontic infections. **Endod Top.**, v. 9, p. 27-36, 2004.

TENNERT C.; FELDMANN K.; HAAMANN E.; AL-AHMAD A.; MARIE FOLLO M.; WRBAS K. T.; HELLWIG E.; ALTENBURGER M. J. Effect of photodynamic therapy n. PDT on Enterococcus faecalis biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. **BMC Oral Health.**, v. 4, n. 14, p. 132, 2014.

TIANFENG D. U.; ZHEJUN WANG.; YA SHEN.; JINGZHI M. A.; YINGGUANG C. A. O.; MARKUS HAAPASALO. Effect of Long-term Exposure to Endodontic Disinfecting Solutions on Young and Old Enterococcus faecalis **J Endod.**, v. 40, n. 4, p. 509-514, 2014.

TRINDADE A. C.; FIGUEIREDO J. A. P.; STEIER L.; WEBER J. B. Photodynamic Therapy in Endodontics p. A Literature Review Retrieved no Results. **Photomed Laser Surg.**, v. 33, n. 3, p. 175-182, 2015.

USACHEVA M. N.; TEICHERT M. C.; BIEL M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. **Lasers Surg Med.**, v. 29, n. 2, p. 165-173, 2001.

USHA H. L.; KAIWAR A.; MEHTA D. Biofilm in endodontics: New understanding to an old problem. **Int J Contem Dent.**, v. 1, n. 3, p. 44-51, 2010.

VALERA M. C.; SILVA K. C. G.; MAEKAWA L. E.; CARVALHO C. A. T.; KOGA-ITO C. Y.; CAMARGO C. H. R.; LIMA R. S. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for Candida albicans and Enterococcus faecalis inoculated in root canals. **J Appl Oral Sci.**, v. 17, n. 6, p. 555-559, 2009.

VAZIRI S.; KANGARLOU A.; SHAHBAZI R.; NAZARI NASAB A.; NASERI M.

Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 9, n. 5, p. 613-618, 2012.

WALSH L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1 p. Soft tissue applications. **Aust Dent J.**, v. 42, n. 4, p. 247-254, 1997a.

WALSH L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Aust Dent J.**, v. 42, n. 5, p. 302-306, 1997b.

WAINWRIGHT M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy n. PACT). **J Antimicrob Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

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.**, v. 34, n. 6, p. 363-371, 2006.

WILSON M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. **Photochem Photobiol Sci.**, v. 3, n. 5, p. 412-418, 2004.

XU Y.; YOUNG M. J.; BATTAGLINO R. A.; MORSE L. R.; FONTANA C. R.; PAGONIS TC. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy p. Safety assessment in mammalian cell cultures. **J Endod.**, v. 35, n. 11, p. 1567-1572, 2009.

ZENDER M. Root canal irrigants. **J Endod.**, v. 32, n. 5, p. 389-398, 2006.