

LETÍCIA CHAVES DE SOUZA

EFEITOS ANTIBACTERIANOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA
USANDO DOIS DIFERENTES FOTOSSENSIBILIZADORES EM CANAIS
RADICULARES CONTAMINADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*:
ESTUDO *IN VITRO*

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia
da Universidade Estácio de
Sá, visando à obtenção do
grau de Mestre em
Odontologia (Endodontia).

Orientadores:
Prof. Dr. José Freitas Siqueira Júnior
Prof. Dr. Julio Cezar Machado de Oliveira

UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ
RIO DE JANEIRO
2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José Freitas Siqueira Júnior e Prof. Dr. Julio Cezar Machado de Oliveira, pela interlocução constante e pelo acompanhamento dos trabalhos laboratoriais da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Flávio Rodrigues Ferreira Alves, pela doação de espécimes e pelo auxílio no laboratório;

Aos Prof. Dr. Hélio Pereira Lopes e Prof. Dr. Hélio Rodrigues Sampaio Filho, pelo apoio durante a confecção deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Edson Jorge Lima Moreira, pela análise estatística dos resultados;

Aos meus professores da graduação e da especialização na UFRJ, pela segura iniciação que me proporcionaram;

Aos professores do mestrado em Endodontia da UNESA, pela excelência dos cursos nas diversas disciplinas;

Ao técnico de laboratório Fernando Antônio da Cunha Magalhães, pelo cuidadoso plaqueamento das amostras;

Ao técnico Alan César Nunes de Moraes, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UERJ, pelo apoio dado na metalização das amostras;

Ao técnico Joel Fonseca dos Santos, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IME, pela ajuda na obtenção das fotomicrografias;

À minha amiga de turma Patrícia Rezende Brito, pela parceria estimulante e carinhosa, durante todo o curso e desenvolvimento deste trabalho;

Às(aos) colegas de turma do mestrado, pelos dois anos de convívio amigo e solidário (vou sentir falta dos nossos rodízios de *pizza*);

Às(aos) colegas de graduação, pelos quatro anos produtivos e animados de nossa convivência no Fundão;

À secretária do nosso curso, Angélica Pedrosa, por seu zelo pelos aspectos administrativos de nossos estudos e trabalhos;

Ao meu pai, pela revisão do texto da dissertação;

Aos meus pais e à minha família em geral, pelo carinho de sempre e constante apoio aos meus estudos.

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de abreviaturas usadas	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xiv
Introdução	1
Revisão de Literatura	5
Microbiologia endodôntica	5
Preparo químico-mecânico	8
<i>Efeito mecânico</i>	9
<i>Efeito químico</i>	11
Medicação intracanal	19
<i>Laser</i>	24
Terapia fotodinâmica	25
Proposição	32
Materiais e Métodos	33
Seleção das amostras e preparo inicial	33
Contaminação	34
Preparo dos canais	35
Divisão dos grupos	36
<i>Grupo A – Terapia fotodinâmica com azul de metileno</i>	36
<i>Grupo B – controle: laser sem fotossensibilizador</i>	38

<i>Grupo C – controle: azul de metileno</i>	38
<i>Grupo D – terapia fotodinâmica com azul de toluidina</i>	39
<i>Grupo E – terapia fotodinâmica com azul de toluidina</i>	39
(irrigação com solução salina)	
<i>Grupo F → terapia fotodinâmica com azul de metileno</i>	39
(irrigação com solução salina)	
Coleta de amostras	39
Microscopia eletrônica de varredura	40
Análise estatística	41
<i>Análise intragrupo</i>	41
<i>Análise intergrupo</i>	41
Resultados	44
Discussão	57
Conclusões	68
Referências Bibliográficas	69
Anexos	84
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estácio de Sá	85
Fluxograma do experimento	87
Esquema das coletas	89

RESUMO

Constitui objetivo deste estudo avaliar a eficácia antibacteriana adicional ao preparo químico-mecânico (PQM) da terapia fotodinâmica (TFD) com azul de metileno ou com azul de toluidina (ambos a 15 µg/ml) em canais infectados por cepa endodôntica de *Enterococcus faecalis*. Cem dentes unirradiculares foram acessados, inoculados com uma cultura de *E. faecalis* e incubados por uma semana. Após o PQM, foram divididos em seis grupos (nos quatro primeiros usando NaOCl a 2,5% como irrigante): Grupo A → TFD com azul de metileno; Grupo B → controle: *laser* sem fotossensibilizador (FS); Grupo C → controle: azul de metileno; Grupo D → TFD com azul de toluidina; Grupo E → irrigação com solução salina: TFD com azul de toluidina; Grupo F → irrigação com solução salina: TFD com azul de metileno. Preencheram-se os canais, conforme seus grupos, com o FS ou com salina, sendo estes deixados no canal por dois (Grupos A, B, D, E e F) ou seis minutos (Grupo C), e a luz vermelha do *laser* diodo ativada por quatro minutos (Grupos A, B, D, E e F). Amostras foram coletadas antes e depois do PQM, bem como após o procedimento específico de cada grupo, semeadas em placas de ágar *Mitis-salivarius*, procedendo-se depois à contagem das UFCs. Tais procedimentos pós-PQM reduziram significativamente a contagem bacteriana quando comparados com a contagem pré-PQM ($P \leq 0,05$). Não houve diferença estatística entre os procedimentos, quando comparados os grupos irrigados com NaOCl, ou entre os irrigados com salina ($P > 0,05$), tendo-se contudo observado diferenças quando comparados os grupos irrigados com NaOCl com

os irrigados com salina ($P < 0,05$). Os resultados sugerem possuir a TFD efeito adicional no tratamento endodôntico para a redução bacteriana, tanto com azul de metileno quanto com azul de toluidina.

Palavras-chave: Desinfecção; Terapia fotodinâmica; Azul de metileno; Azul de toluidina; *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

This study aims to investigate the additional antimicrobial effect of photodynamic therapy (PDT) with methylene blue or toluidine blue (both at 15 µg/ml) on root canals infected by an endodontic strain of *Enterococcus faecalis*. One hundred single-rooted teeth were accessed, their canals were inoculated with an *E. faecalis* culture and incubated for one week. After root canal preparation, the teeth were divided into six groups (the first four groups were irrigated with 2.5% NaOCl): Group A → PDT with methylene blue; Group B → control: laser without photosensitizer (PS); Group C → control: methylene blue; Group D → PDT with toluidine blue; Group E → irrigation with saline: PDT with toluidine blue; Group F: irrigation with saline: PDT with methylene blue. According to their groups the root canals were filled with PS or saline, which were left for two (Groups A, B, D, E or F) or six minutes (Group C) followed by exposure to red light from a diode laser for four minutes (Groups A, B, D, E and F). Samples were taken before and after chemomechanical preparation and after the specific procedure for each group, plated onto *Mitis-salivarius* agar. After forty-eight hours, the colony forming units were counted. All procedures after chemomechanical preparation reduced significantly the number of bacterial cells in comparison to the number before the root canal preparation ($P \leq 0,05$). There were no significant differences in the comparison of the groups irrigated with NaOCl or with saline ($P > 0,05$), but there were significant difference in comparing the groups irrigated with NaOCl to the groups irrigated with saline (P

< 0,05). The results suggest that PDT with methylene blue and toluidine blue has an additional effect to endodontic treatment with regard to disinfection.

Key words: Disinfection; Photodynamic therapy; Methylene blue; Toluidine blue; *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE ABREVIATURAS USADAS

$\mu\text{g/ml}$ – Micrograma por mililitro

AsGAAI – Arseneto de gálio e alumínio

BHI – Brain heart infusion

Ca(OH)_2 – Hidróxido de cálcio

CP – Comprimento de patência

CT – Comprimento de trabalho

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético

FS – Fotossensibilizador

IME – Instituto Militar de Engenharia

J - Joules

J/cm^2 – Joules por centímetro quadrado

MEV – Microscopia eletrônico de varredura

MTAD – *Mixture of a Tetracycline Isomer, an Acid, and a Detergent*

mW – MiliWatt

N/cm – Newton por centímetro

NaOCl – Hipoclorito de sódio

NiTi – Níquel-titânio

nm – Nanômetro

Pasta HPG – Pasta de hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado e glicerina

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PQM – Preparo químico-mecânico

rpm – Rotação por minuto

SCR – Sistema de canais radiculares

TBS – Caldo tripticase-soja

TFD – Terapia fotodinâmica

UFC – Unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dente montado no gesso

Figura 2 – Instrumentação rotatória do canal radicular

Figura 3 – Irrigação do canal utilizando-se agulha NaviTip

Figura 4 – Preenchimento do canal com o agente fotossensibilizador

Figura 5 – Aparelho *Twin laser* (MMOptics)

Figura 6 – Fibra ótica (MMOptics)

Figura 7 – Aplicação do laser diodo de baixa potência no canal radicular

Figura 8 – Fotomicrografia mostrando padrão da colonização inicial das paredes do canal radicular pela cepa endodôntica MB 35 de *E. faecalis* (aumento original de 2700 x)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupo A: Terapia fotodinâmica com azul de metileno (irrigação com NaOCl)

Tabela 2 – Grupo B: Controle – *Laser* sem fotossensibilizador (irrigação com NaOCl)

Tabela 3 – Grupo C: Controle – Azul de metileno (irrigação com NaOCl)

Tabela 4 – Grupo F: Terapia fotodinâmica com azul de metileno (irrigação com solução salina)

Tabela 5 – Grupo D: Terapia fotodinâmica com azul de toluidina (irrigação com NaOCl)

Tabela 6 – Grupo E: Terapia fotodinâmica com azul de toluidina (irrigação com solução salina)

INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico consiste em eliminar ou reduzir ao máximo o número de microorganismos do interior do sistema de canais radiculares (SCR) (SIQUEIRA *et al.*, 1999). A patologia a ser tratada pelo endodontista é a lesão perirradicular, já estando bem estabelecida a relação de causa-e-efeito entre os microorganismos e o desenvolvimento dessa lesão (KAKEHASHI *et al.*, 1965; SUNDQVIST, 1976; MÖLLER *et al.*, 1981).

Em 1894, MILLER já sugeria que os microorganismos eram os causadores das lesões perirradiculares, mas não estabeleceu uma relação direta de causa-e-efeito. KAKEHASHI *et al.* (1965) expuseram as polpas de ratos convencionais e de ratos *germ-free* ao meio bucal e, após a análise histológica, observaram que os animais convencionais desenvolveram inflamação ou necrose pulpar, enquanto nos *germ-free* houve reparação por deposição de dentina na área da exposição. Assim, comprovaram a teoria proposta por Miller.

SUNDQVIST (1976), por sua vez, confirmou a importância das bactérias para o desenvolvimento de lesões perirradiculares, em um estudo *in vivo* onde só encontrou microorganismos em canais de dentes despolpados com destruição óssea perirradicular.

Já MÖLLER *et al.* (1981) demonstraram que, nos casos de necrose pulpar séptica, houve o desenvolvimento de lesão perirradicular, enquanto nos casos de necrose asséptica, esses tecidos estavam desprovidos de inflamação

e com indícios de reparação, o que também confirma a importância dos microorganismos para a ocorrência dessas lesões.

O sucesso do tratamento endodôntico, portanto, vai depender do controle microbiológico, da limpeza e modelagem do SCR e do vedamento tridimensional desse sistema através da obturação (SIQUEIRA *et al.*, 2004d).

SCHILDER (1967) introduziu o conceito de limpeza e modelagem, estabelecendo objetivos que tinham como propósito não só produzir um preparo tridimensional, mas também preservar a posição e o tamanho do forame.

O preparo químico-mecânico (PQM) promove a limpeza e a modelagem do canal radicular com o uso de instrumentos endodônticos, de substâncias químicas e da irrigação-aspiração (LOPES *et al.*, 2004a). A modelagem dos canais radiculares é obtida com o uso de instrumentos endodônticos, objetivando uma conformação cônica-progressiva desses canais. Já a limpeza tem como objetivo a remoção de todo o tecido pulpar vivo ou necrosado, bem como a eliminação ou a redução ao máximo da concentração de microorganismos no interior do canal, para criar um ambiente propício à reparação dos tecidos perirradiculares (LOPES *et al.*, 2004a). Durante o PQM, a limpeza é alcançada através da ação dos instrumentos nas paredes dos canais, da ação química das soluções irrigadoras e da ação mecânica de fluxo e refluxo dessas soluções (LOPES *et al.*, 2004a).

Em função da grande complexidade da anatomia interna do SCR, sabe-se que nenhuma técnica empregada no PQM é capaz de eliminar todos os

microorganismos e a eventual permanência deles no interior dos canais está relacionada ao insucesso endodôntico (LOPES *et al.*, 2004a).

A medicação intracanal pode reduzir os microorganismos que, após o PQM, permaneceram nos istmos, nas ramificações, nos canais acessórios, nos deltas apicais e nos túbulos dentinários (SIQUEIRA & LOPES, 2004).

As técnicas atuais para a desinfecção do SCR incluem a instrumentação, a irrigação com agentes antimicrobianos e a medicação intracanal (SIQUEIRA *et al.*, 2004d). No entanto, novos procedimentos para aprimorar a desinfecção do SCR vêm sendo desenvolvidos, dentre os quais o uso do *laser* de baixa potência (SEAL *et al.*, 2002; BONSOR *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2008).

A terapia fotodinâmica (TFD) faz uso de um fotossensibilizador (FS) não tóxico ativado pela luz do *laser* na presença de oxigênio. A exposição do FS à luz resulta na formação de um derivado do oxigênio, como o oxigênio *singlet* e radicais livres capazes de induzir danos e até a morte dos microorganismos (KONOPKA & GOSLINSKI, 2007).

A TFD tem sido estudado como procedimento promissor na eliminação de bactérias, em casos de doenças pulpares (SEAL *et al.*, 2002; BONSOR *et al.*, 2006a; BONSOR *et al.*, 2006b; CASTRO *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2006; SOUKOS *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007; BERGMANS *et al.*, 2008; FIMPLE *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2008), doenças periodontais (SOUKOS *et al.*, 1998; SOUKOS *et al.*, 2000; SOUKOS *et al.*, 2005), peri-implantite e cáries. FSs como o azul de metileno (SOUKOS *et al.*, 2000; SOUKOS *et al.*, 2006; FIMPLE *et al.*, 2008) e o

azul de toluidina (SEAL *et al.*, 2002; BONSOR *et al.*, 2006a; WILLIAMS *et al.*, 2006; BERGMANS *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008), bem como derivados do PEI-ce6 (SOUKOS *et al.*, 1998; GARCEZ *et al.*, 2007; GARCEZ *et al.*, 2008), vêm sendo testados em associação ao *laser* de baixa intensidade na tentativa de se alcançar efeitos bactericidas.

Este estudo inscreve-se nos esforços de buscar novos procedimentos para aperfeiçoar a desinfecção do SCR, tendo por objetivo avaliar o efeito adicional da TFD em relação ao PQM na redução da carga bacteriana de canais radiculares contaminados por uma cepa selvagem (isolado endodôntico) de *Enterococcus faecalis*.

Microbiologia endodôntica

Bactérias e seus subprodutos desempenham um importante papel no desenvolvimento e na manutenção das lesões perirradiculares (KAKEHASHI *et al.*, 1965; SUNDQVIST, 1976; MÖLLER *et al.*, 1981). A composição da microbiota e a sua localização no interior do canal radicular dependem da disponibilidade de oxigênio, do acesso e da disponibilidade de nutriente, do sinergismo e/ou competição entre espécies e das defesas do hospedeiro (HAAPASALO *et al.*, 2005).

Na infecção endodôntica a maioria das células bacterianas encontra-se em suspensão no canal principal, mas podem ocorrer grandes aglomerações bacterianas aderidas às paredes do canal, formando um biofilme de multicamadas e multiespécies, estabelecendo-se assim, portanto, uma comunidade clímax. As bactérias desses aglomerados podem estender-se para o interior dos túbulos dentinários, o que provoca uma infecção intratubular (SIQUEIRA *et al.*, 2004c).

Na infecção primária, as condições favorecem a presença de bactérias anaeróbias estritas, presentes em combinações de dez a vinte espécies. As mais comumente encontradas pertencem aos gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Tannerella*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Campylobacter*, *Selenomonas* e *Actinomyces* (SIQUEIRA *et al.*, 2004c; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2005).

SIQUEIRA *et al.* (2002a) analisaram o padrão da infecção primária de quinze dentes unirradiculares recém-extraídos com lesão perirradicular aderidas aos respectivos ápices. Esses dentes foram submetidos ao microscópio eletrônico de varredura, sendo então observada intensa colonização bacteriana, com predomínio da forma cocos, constatando-se ainda ocasionalmente a presença de fungos. O padrão de colonização demonstrou uma organização de comunidade clímax em alguns casos, com penetração de bactérias nos túbulos dentinários.

Utilizando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) para investigar a prevalência de patógenos endodônticos na porção apical das raízes de dentes extraídos com lesões perirradiculares, SIQUEIRA *et al.* (2004b) detectaram a presença de *Pseudoramibacter alactolyticus* em 44% dos casos, *Treponema denticola* em 26%, *Fusobacterium nucleatum* em 26%, *Porphyromonas endodontalis* em 17%, *Filifactor alocis* em 9%, *Dialister pneumosintes* em 4%, *Porphyromonas gingivalis* em 4% e *Tannerella forsythensis* em 4%.

SOUZA *et al.* (2005), utilizando a técnica do *checkerboard* para hibridização DNA-DNA, observaram uma incidência de 100% de *Fusobacterium nucleatum ss. vincentii* em dentes com infecção primária, bem como uma grande prevalência de *Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga ochracea*, *Streptococcus constellatus*, *Veillonella parvula*, *P. gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus sanguinis*. As conclusões desse estudo confirmam a constatação de ser polimicrobiana a infecção endodôntica, com predomínio de anaeróbios estritos.

No estudo realizado por CHU *et al.* (2005), observaram os autores que os gêneros prevalentes foram *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Campylobacter*, bem como que a quantidade média de espécies por canal foi de 4,6. Esse estudo também confirmou a natureza polimicrobiana da infecção endodôntica primária, com predomínio de espécies Gram-negativas.

E. faecalis, uma espécie bacteriana Gram-positiva anaeróbia facultativa, é muito associada à persistência da infecção intra-radicular (SIQUEIRA *et al.*, 1997; SIREN *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2003; HAAPASALO *et al.*, 2005; STUART *et al.* 2006). A alta resistência do *E. faecalis* ao hipoclorito de sódio (NaOCl) e ao hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] pode resultar na sua permanência após o término do tratamento endodôntico e por isso essa espécie bacteriana está associada a infecções persistentes (SIQUEIRA 2001; EVANS *et al.*, 2002; RADCLIFFE *et al.*, 2004).

Essa espécie pode ser encontrada em monoinfecção ou estar associada a poucas espécies, além de ser capaz de sobreviver por longos períodos sem nutrientes. Sua alta resistência aos medicamentos utilizados durante a terapia endodôntica, principalmente à ação antimicrobiana da pasta de Ca(OH)₂ usada como medicação intracanal, é proporcionada pela sua capacidade de sobreviver em ambientes com pH alcalino (BYSTRÖM *et al.* 1985; SIQUEIRA *et al.*, 1997; SIREN *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2002; MENEZES *et al.* 2004; HAAPASALO *et al.*, 2005; STUART *et al.* 2006).

EVANS *et al.* (2002) observaram que o *E. faecalis* é resistente ao Ca(OH)_2 quando este está com pH 11,1 ou menos. Quando ocorre uma elevação no pH do meio, a bactéria tende a preservar seu pH intracelular através de uma bomba de prótons. O correto funcionamento dessa bomba é crítico para a sobrevivência do *E. faecalis* em ambientes alcalinos e quando o pH atinge 11,5, esse mecanismo mostra-se sobrecarregado, o que leva à morte o microorganismo.

Os microorganismos estabelecidos no interior do SCR não podem ser atingidos pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Por isso, as infecções de origem endodôntica devem ser tratadas tanto por procedimentos mecânicos quanto por substâncias químicas (SIQUEIRA *et al.*, 1997).

Preparo químico-mecânico (PQM)

O objetivo do tratamento endodôntico consiste em eliminar ou reduzir o número de bactérias no interior do SCR. Essa redução é conseguida pelo PQM do SCR, auxiliado pelo uso da medicação intracanal (SIQUEIRA *et al.*, 1997).

Sabe-se que nenhum protocolo atual é capaz de eliminar por completo os microorganismos do interior do canal de modo a torná-lo estéril. Por isso, vários estudos científicos buscam técnicas com o objetivo de reduzir ao máximo a infecção do canal radicular (BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983; BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1985; SAKAMOTO *et al.*, 2007).

Tem sido muito demonstrado que, quando se obtém uma cultura negativa no momento anterior à obturação, o índice de sucesso do tratamento endodôntico é alto (SJÖGREN *et al.*, 1997; SHUPING *et al.*, 2000;

MCGURKING-SMITH *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2007a). Apesar de sabermos que a cultura negativa não significa que o canal está livre de bactérias, uma vez que esse teste microbiológico traduz apenas as condições microbiológicas da luz do canal principal (SIQUEIRA *et al.*, 2004a). SJÖGREN *et al.* (1997) observaram uma taxa de sucesso de 94% após cinco anos quando os dentes foram obturados após obtenção de cultura negativa, o que foi maior e estatisticamente significativo em relação aos dentes obturados com cultura positiva, cujo tratamento bem sucedido alcançou apenas o índice de 68% no mesmo período avaliado.

Desse modo, a obtenção de uma cultura negativa, apesar de esta não ser usualmente realizada no dia-a-dia da clínica, deve ser o objetivo do endodontista. Para tanto, deve ele basear-se nos estudos científicos que mostram os efeitos antimicrobianos dos protocolos que mais se aproximam dessa finalidade (SIQUEIRA *et al.*, 2007a).

Efeito mecânico

BYSTRÖM & SUNDQVIST (1981) analisaram a redução microbiana de canais infectados após a realização do PQM com instrumentos manuais de aço inoxidável e solução salina. Observaram que o procedimento foi eficaz na redução da contagem de microorganismos do interior dos canais radiculares, mas metade dos casos permaneceu apresentando bactérias viáveis.

DALTON *et al.* (1998) compararam a redução bacteriana do interior de canais radiculares irrigados com solução salina e preparados com instrumentos rotatórios de níquel-titânio (NiTi) *taper* 0,04 e pela técnica *step-back* com instrumentos de aço inoxidável. Amostras foram coletadas antes, durante e

depois do PQM. Os autores observaram que, com o aumento progressivo do calibre dos instrumentos, a redução microbiana foi uniforme e progressiva, independentemente da técnica utilizada. Os resultados desse estudo indicaram não haver diferença estatística significativa entre as técnicas quanto à capacidade de redução bacteriana intracanal, e que nenhuma das técnicas conseguiu debelar totalmente as bactérias do interior dos canais radiculares.

Com o intuito de estudar os efeitos mecânicos da instrumentação e da irrigação, SIQUEIRA *et al.* (1999) inocularam *E. faecalis* em dentes extraídos e os instrumentaram com instrumentos manuais Nitiflex, GT e Profile série 29 (*taper* 0,06), irrigando-os com solução salina. A instrumentação com Nitiflex número 30 foi significativamente mais eficaz do que a utilização dos instrumentos GT. Não encontraram os autores diferença estatística quando compararam os efeitos da Profile número 5 com a GT e com a Nitiflex número 30. O preparo apical até a lima Nitiflex número 40 foi significativamente mais eficaz na eliminação de bactérias do que as outras técnicas e instrumentos testados. Os resultados desse estudo mostraram que a instrumentação e a irrigação através da ação do fluxo e refluxo podem remover mecanicamente mais de 90% das células bacterianas do interior do canal radicular.

Em um estudo *in vitro*, COLAK *et al.* (2005) analisaram a redução bacteriana intracanal em canais inoculados com *E. faecalis* e instrumentados com instrumentos manuais de aço inoxidável Hedström, com limas Hedström adaptadas ao motor de rotação alternada Giromatic e com instrumentos rotatórios de NiTi Hero 642. Solução salina estéril foi usada como solução irrigadora, e amostras foram coletadas antes e depois do PQM. Todos os

instrumentos testados revelaram-se aptos a reduzir o número de células bacterianas do interior dos canais radiculares, não havendo diferença estatística significativa entre eles, observando-se, contudo, que nenhuma técnica neutralizou por completo a presença bacteriana.

Efeito químico

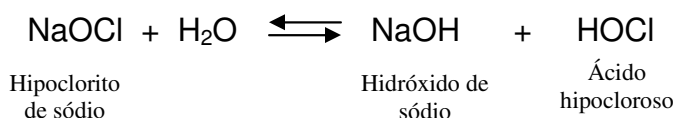
A irrigação desempenha um importante papel na eliminação dos microorganismos do canal radicular. Os irrigantes são usados durante o tratamento endodôntico com o objetivo de remover *debris*, lubrificar paredes dentinárias, dissolver matéria orgânica e atuar como antibacteriano (SIQUEIRA *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2002b).

Os procedimentos de limpeza e desinfecção do SCR, por sua vez, estão diretamente relacionados com efeitos químicos e mecânicos dos irrigantes. O efeito mecânico da irrigação é gerado pela ação de fluxo e refluxo da solução no interior do canal radicular (SIQUEIRA *et al.*, 2000).

A escolha do agente irrigante a ser usado deve levar em consideração uma combinação de várias propriedades, como ação antimicrobiana, capacidade de dissolução do tecido pulpar e compatibilidade biológica com os tecidos perirradiculares (ESTRELA *et al.*, 2003). O NaOCl é amplamente recomendado como irrigante no PQM dos SCR, devido à sua capacidade solvente de tecidos necrosados e vivos, bem como a suas propriedades antibacterianas (AYHAN *et al.*, 1999; ESTRELA *et al.*, 2002). Essa solução reage com os *debris* orgânicos do interior do SCR, o que facilita a limpeza, mas essa reação inativa o hipoclorito e reduz sua capacidade antibacteriana, razão

por que a solução de hipoclorito de sódio do interior do canal radicular deve ser sempre renovada (BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1985).

Quando o NaOCl reage com a água, há a formação de hidróxido de sódio e ácido hipocloroso (LOPES *et al.*, 2004b), conforme reação representada abaixo:



O ácido hipocloroso contém cloro ativo que funciona como um forte agente oxidante, sendo o responsável pelo efeito antimicrobiano através da oxidação de um grupo de enzimas importantes para o metabolismo das bactérias (AYHAN *et al.*, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2000; ESTRELA *et al.*, 2002).

BYSTRÖM & SUNDQVIST (1983) observaram uma considerável redução na quantidade de bactérias do canal radicular após o PQM com o uso de uma substância sem poder antibacteriano, mas o PQM com NaOCl a 0,5% se mostrou mais eficaz. Segundo os mesmos autores (1985), não existe diferença no efeito antibacteriano da irrigação com NaOCl a 0,5% e a 5%. Além disso, observaram maior eficácia no uso combinado do EDTA com NaOCl a 5% do que na utilização exclusiva do NaOCl. Notaram também que as bactérias sobreviventes à instrumentação e irrigação apresentavam um rápido crescimento quando nenhuma medicação intracanal era empregada.

Após o PQM utilizando o NaOCl a 0,5% como solução irrigadora, SJÖGREN *et al.* (1997) obtiveram 60% dos dentes com cultura negativa após o tratamento inicial.

No estudo realizado por SIQUEIRA *et al.* (2000), observaram os autores que as concentrações de NaOCl nas soluções testadas (a 1%, 2,5% e 5,25%) não apresentaram diferença estatística significativa quanto à capacidade de remoção de *E. faecalis* do interior de canais de dentes extraídos. Esses resultados sugerem que a irrigação freqüente e abundante com a concentração mais fraca de NaOCl é suficiente para a eliminação dos microorganismos do interior do canal radicular, questionando a necessidade do uso de soluções mais concentradas.

Utilizando instrumentação rotatória com instrumentos de NiTi com *taper* 04 e irrigação com NaOCl a 1,25%, SHUPING *et al.* (2000) obtiveram uma redução significativa e progressiva entre a contagem bacteriana inicial e a contagem após o uso de cada um dos três instrumentos finais. A irrigação com NaOCl foi superior na redução bacteriana do que com a solução salina, e resultou em 61,9% de cultura negativa. O aumento progressivo do preparo apical, por conseguinte, mostrou-se importante na redução bacteriana.

PETERS *et al.* (2002), em um estudo *in vivo*, observaram que, após o PQM e a irrigação com NaOCl a 2%, houve uma redução significativa de bactérias em relação à contagem inicial, e 76% dos dentes apresentaram cultura negativa após esse preparo.

A análise do estudo *in vitro* de BERBER *et al.* (2006) sugere que a solução de NaOCl a 5,25% apresenta uma capacidade antimicrobiana superior

às soluções a 2,5% e a 0,5% no interior dos túbulos dentinários, mas essa mesma diferença não é encontrada quando se analisa a capacidade de limpeza do canal principal. Com base nos resultados obtidos, os autores puderam concluir que a ausência do crescimento bacteriano das amostras coletadas após o PQM não se reflete na ausência de crescimento bacteriano no interior dos túbulos dentinários.

Devido à toxicidade do NaOCl, diversas soluções estão sendo testadas para substituí-lo na irrigação do SCR (SASSONE *et al.*, 2003; CARSON *et al.*, 2005; HAAPASALO *et al.*, 2005; ZEHNDER *et al.*, 2006).

Ao analisarem a capacidade antimicrobiana através de zonas de inibição em placas de ágar com culturas de diferentes microorganismos, AYHAN *et al.* (1999) observaram que o NaOCl a 5,25% se mostrou superior ao NaOCl a 0,5%, à solução de clorexidina a 2%, ao álcool a 21%, ao cresofene (PMNC, timol a 30% e dexametasone a 0,1%) e à solução salina. Esta última, por sua vez, mostrou-se ineficaz, e a redução na concentração de NaOCl resultou em diminuição significativa do seu poder antibacteriano.

GOMES *et al.* (2001) testaram a capacidade antibacteriana do NaOCl nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%, bem como da clorexidina gel e líquida com 0,2%, 1% e 2% de concentração em poços com suspensões de células de *E. faecalis* em NaCl em diferentes tempos. Observaram que todos os irrigantes foram eficazes contra a bactéria estudada, sendo os mais ativos a clorexidina líquida em todas as concentrações e o NaOCl a 5,25%. Observou-se também que o tempo necessário para a eliminação do microorganismo depende da concentração do irrigante utilizado.

Usando membranas com biofilmes de *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *F. nucleatum* e *E. faecalis*, SPRATT *et al.* (2001) analisaram a eficácia antibacteriana do NaOCl a 2,25%, da clorexidina a 0,2%, do iodo e da prata coloidal. O NaOCl foi o mais eficaz contra *E. faecalis*, alcançando 100% de eficácia nos intervalos de tempo de quinze e sessenta minutos. Os autores concluíram que a capacidade antimicrobiana dos agentes testados depende da natureza do biofilme e do tempo de contato com o mesmo.

SASSONE *et al.* (2003) avaliaram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* após contato com NaOCl a 1% e a 5% e com clorexidina a 0,12%, a 0,5% e a 1%. A clorexidina a 0,12% não eliminou o *E. faecalis*, enquanto a clorexidina a 1% e o NaOCl a 1% e a 5% eliminaram todos os microorganismos.

ÖNÇAĞ *et al.* (2003) compararam as propriedades antimicrobianas do NaOCl a 5,25%, clorexidina a 2% e clorexidina a 0,2% com cetrimide a 0,2% (Cetrexidin®) em dentes extraídos contaminados com *E. faecalis*. Concluíram assim que a clorexidina a 2% e o Cetrexidin® foram mais eficazes, apresentando um efeito residual maior e menor toxicidade que o NaOCl a 5,25%.

A clorexidina deve ser usada em concentrações superiores a 0,12% para se obter um maior espectro bactericida. Seu uso é indicado quando o contato da região perirradicular com a solução irrigadora for inevitável, como em ápices abertos e perfurações e ainda em casos de alergia ao NaOCl e como medicação intracanal, devido à sua substantividade (SASSONE *et al.*, 2003).

ERCAN *et al.* (2004), com base nos resultados obtidos em seu estudo clínico, concluíram que a clorexidina a 2% teve maior atividade antibacteriana que o NaOCl a 5,25%.

Ao analisarem o efeito antimicrobiano da doxiciclina a 0,01% e a 0,05%, do NaOCl a 6% e a 3% e da clorexidina a 2% e a 0,12% em placas de ágar cultivadas com *P. micros*, *P. intermedia*, *S. sanguinis* e *Lactobacillus acidophilus*, CARSON *et al.* (2005) observaram que as duas concentrações de doxiciclina foram mais eficazes para os três primeiros microorganismos do que as outras substâncias testadas, seguidas pelo NaOCl a 6%. No entanto, contra o *L. acidophilus* o NaOCl nas duas concentrações foi mais eficaz do que as outras substâncias.

VIANNA *et al.* (2006) compararam o grau de redução bacteriana após a irrigação com NaOCl a 2,5% ou com gel de clorexidina a 2% através da contagem de formação de colônias no meio de cultura e do *real-time* PCR. No grupo do NaOCl, houve uma redução no número de bactérias maior do que no grupo da clorexidina, tanto pelo método de cultura quanto por *real-time* PCR. Pelo método de cultura obtiveram 75% de cultura negativa no grupo do NaOCl após o PQM, enquanto no grupo da clorexidina o índice ficou em apenas 50%.

Com o objetivo de comparar a capacidade antimicrobiana do NaOCl, da doxiciclina, do ácido cítrico e do MTAD, KRAUSE *et al.* (2007) utilizaram dois modelos *in vitro*. Discos de dentina bovina foram contaminados com *E. faecalis* por duas semanas para depois serem tratados com as substâncias em estudo, indicando maior eficiência do NaOCl e da doxiciclina. No segundo modelo de

estudo, no teste de difusão em ágar, foi observado que o NaOCl apresentou um halo de inibição menor que o da doxíciclina e do MTAD.

BAUMGARTNER *et al.* (2007) observaram em um estudo *ex vivo* com dentes humanos unirradiculares contaminados com *E. faecalis*, uma desinfecção consistente dos canais quando se utilizou NaOCl a 5,25% e EDTA a 15%, significativamente maior do que a dos dentes irrigados com NaOCl a 1,3% / BioPure MTAD.

Já o estudo clínico realizado por SIQUEIRA *et al.* (2007b) teve como objetivo avaliar a redução de populações bacterianas cultiváveis do interior de canais unirradiculares com lesão perirradicular, utilizando a clorexidina a 0,12% como solução irrigadora e pasta de Ca(OH)_2 com gel de clorexidina a 0,12% como medicação intracanal. Todas as amostras iniciais (S1) coletadas foram positivas para bactéria e, após o PQM (S2), 53,8% dos casos ainda apresentavam bactérias cultiváveis. Depois de uma semana com a medicação intracanal (S3), em apenas 7,7% dos casos foram detectadas bactérias cultiváveis. Encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras S1 e S2, S1 e S3 e S2 e S3. Com base nos resultados obtidos, os autores puderam concluir que o PQM com a solução de clorexidina a 0,12% como irrigante reduziu significativamente a quantidade de bactérias do interior do canal radicular, mas falhou em deixá-lo livre de microorganismos em aproximadamente metade dos casos. Concluíram ainda que o uso da medicação estudada aumentou significativamente o número de culturas negativas obtidas.

Ao compararem a eficácia antimicrobiana das soluções irrigadoras NaOCl a 2,5% e clorexidina a 0,12% em um estudo clínico, SIQUEIRA *et al.* (2007c) observaram não haver diferença estatística significativa entre os protocolos estudados.

ZEHNDER (2006) sugere como protocolo de irrigação durante o PQM o uso copioso do NaOCl e, uma vez terminado o preparo, a utilização de 5-10 ml de um agente quelante, EDTA ou ácido cítrico, deixado no canal por um minuto. Após a remoção da *smear layer*, a irrigação final deve ser com NaOCl, caso se use Ca(OH)_2 como medicação intracanal, ou clorexidina, caso se prefira gel de clorexidina como medicação intracanal.

Um preparo radicular mais amplo e uma irrigação freqüente e abundante com substâncias antimicrobianas maximizam a eficácia do PQM. No entanto, apesar das técnicas de instrumentação e regimes de irrigação usados, a maioria dos canais ainda apresenta bactérias vivas, o que confirma a falha de penetração de instrumentos e irrigantes em certas áreas do SCR (SIQUEIRA *et al.*, 2002b).

A profundidade de inserção da seringa de irrigação também constitui um fator relevante na redução da contagem bacteriana intracanal. SEDGLEY *et al.* (2005) demonstraram que 6 ml de irrigante é significativamente menos eficaz quando a agulha de irrigação é posicionada a 5 mm do CT, em comparação quando posicionada a 1 mm do CT.

Medicação intracanal

A medicação intracanal é um importante auxiliar na desinfecção de dentes com lesão perirradicular, já que se sabe que os procedimentos químico-mecânicos sozinhos não são capazes de erradicar a infecção do SCR (SIQUEIRA *et al.*, 2002a; SIQUEIRA *et al.*, 2002b).

BYSTRÖM *et al.* (1985), em um estudo *in vivo*, compararam a eficácia antimicrobiana de diferentes medicamentos intracanaís em sessenta e cinco dentes unirradiculares. Seus resultados indicaram que a pasta de hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ apresentou efeito antimicrobiano no interior do canal superior ao fenol canforado e ao paramonoclorofenol canforado. Os autores afirmam que, apesar de a irrigação e o preparo mecânico apresentarem uma importante redução bacteriana do interior do canal, a medicação intracanal não deve ser abandonada, uma vez que, conforme o estudo em questão, metade dos canais estariam contaminados numa segunda consulta. Os resultados obtidos indicam que a pasta de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ usada como medicação intracanal em dentes instrumentados e irrigados adequadamente consegue eliminar bactérias de maneira eficaz, e que o tratamento endodôntico da infecção primária pode ser completado em duas consultas.

A ação antibacteriana, a dissolução de tecidos, a inibição de reabsorção radicular e a indução da formação de tecido duro são algumas propriedades biológicas atribuídas ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Por essas propriedades, seu uso tem sido recomendado em diversas situações na endodontia (LIN *et al.*, 2003).

A capacidade bactericida do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ provém da liberação dos íons hidroxila, que provocam uma elevação do pH do meio suficientemente alta para

matar a maioria dos microorganismos presentes nos túbulos dentinários, nos deltas apicais, nos canais laterais, nos remanescentes pulpare e na *smear layer* (SJÖGREN *et al.* 1991). No estudo de SJÖGREN *et al.* (1991), o Ca(OH)_2 se mostrou altamente eficaz em matar bactérias do canal radicular quando deixado em seu interior por sete dias, e ineficaz quando deixado apenas por dez minutos.

No estudo clínico de SHUPING *et al.* (2000), após uma semana com pasta de Ca(OH)_2 como medicação intracanal, obtiveram os autores 92,5% de cultura negativa, o que foi estatisticamente mais eficaz que a contagem bacteriana observada após a instrumentação rotatória com instrumentos de NiTi.

ALMYROUDI *et al.* (2002) analisaram a eficácia de diferentes medicações em discos de dentes humanos contaminados com *E. faecalis*. Concluíram que o Ca(OH)_2 matou o *E. faecalis* dentro dos túbulos dentinários nos grupos de três e oito dias, mas falhou no grupo de quatorze dias, o que pode ser explicado pela redução do pH em função da desidratação da medicação intracanal. Observaram também que a clorexidina gel a 1%, a clorexidina gel com Ca(OH)_2 e o PerioChip® foram eficazes na eliminação das bactérias do interior dos túbulos, sendo a clorexidina gel um pouco melhor, mas sem diferença estatística.

LIN *et al.* (2003) testaram a capacidade antimicrobiana do Ca(OH)_2 e da clorexidina contra *E. faecalis* no teste de difusão em ágar. Observaram que não houve diferença estatística entre as formas pasta e pó do Ca(OH)_2 , bem como que a clorexidina pura e a combinada com Ca(OH)_2 foram mais eficazes que o

Ca(OH)₂ puro. No entanto, também não houve diferença estatística entre a clorexidina pura e a combinada.

Ao avaliarem a eficácia do gel de clorexidina a 2% e do Ca(OH)₂ em dentes bovinos contaminados por *E. faecalis*, GOMES *et al.* (2003) concluíram que a clorexidina foi mais eficaz que o Ca(OH)₂.

Em um estudo *in vitro*, MENEZES *et al.* (2004) concluíram que a associação do Ca(OH)₂ com paramonoclorofenol canforado usado como medicação intracanal em canais contaminados por *E. faecalis* foi mais eficaz do que a pasta de Ca(OH)₂ pura.

O uso da pasta de Ca(OH)₂ entre as consultas reduziu significativamente a quantidade de dentes com cultura positiva em um estudo *in vivo* realizado por MCGURKIN-SMITH *et al.* (2005). Seus resultados mostraram que, após o uso dessa medicação, 86% dos dentes apresentaram cultura negativa, o que sugere que, além de instrumentação e irrigação adequadas, a medicação é necessária para aumentar as possibilidades de sucesso a longo prazo.

FERRARI *et al.* (2005) selecionaram para seu estudo vinte e cinco pacientes que possuíam dentes unirradiculares com necrose e lesão perirradicular. As amostras iniciais coletadas antes da instrumentação indicaram a presença de microorganismos cultiváveis em 92% dos casos. Dessa população inicial, 22% eram de facultativos, tais como *Enterococcus*, bactérias entéricas (*Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter sakazaki*) e fungos (*Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida magnoliae*). Após o PQM, esses microorganismos não foram mais detectados, mas 20% dos canais ainda apresentavam cultura positiva. Os canais foram então deixados sem

medicação intracanal e em uma segunda consulta novas amostras foram coletadas, onde se encontrou 100% de culturas positivas, sendo 52% contaminados por *Enterococcus*, por bactérias entéricas e/ou por fungo. Após uma semana com a medicação PRP (2 g de paramonoclorofenol canforado e 100 ml de polietilenoglicol 400 + rinosoro® em partes iguais), observou-se 36% de cultura positiva, sendo 12% contaminados por *E. faecalis* e *Enterococcus faecium*.

Utilizando o método da PCR para detecção de *E. faecalis* em um estudo *in vitro*, COOK *et al.* (2007) concluíram que o uso da clorexidina a 2% por dez minutos, seguido pela obturação, foi mais eficaz em eliminar o *E. faecalis* do que a medicação intracanal com o Ca(OH)_2 por sete dias.

Em um estudo clínico, SIQUEIRA *et al.* (2007a) também analisaram a redução bacteriana de dentes com lesão perirradicular após instrumentação com instrumentos de NiTi manuais — com a técnica de movimentos contínuos de rotação alternada — e irrigação com NaOCl a 2,5% (amostra S2), e após medicação intracanal com pasta de Ca(OH)_2 com paramonoclorofenol canforado e glicerina (amostra S3). As espécies bacterianas mais encontradas na amostra inicial (S1) foram *P. micros*, *Streptococcus constellatus/intermedius*, *Pseudoramibacter alactolyticus* e *Streptococcus oralis*. Observaram que, após o PQM, 54,5% dos casos apresentaram cultura positiva, com uma a três espécies por canal. Depois da medicação intracanal, apenas 9,1% dos casos foram positivos para a presença bacteriana, sendo *Propionibacterium acnes* a única espécie encontrada. Houve uma redução significativa entre S1 e S2, bem como entre S2 e S3. Os autores concluíram assim que o PQM com NaOCl a

2,5% como irrigante reduziu a contagem bacteriana, mas falhou em deixar o canal livre de bactérias em mais da metade dos casos, o que reforça a necessidade do uso de medicação intracanal para maior redução bacteriana.

SAKAMOTO *et al.* (2007), em um estudo *in vivo*, observaram, através do método PCR, uma redução bacteriana em relação à amostra inicial (amostra S1) de 99,67% após o preparo químico (amostra S2), e de 99,85% após uma semana com pasta HPG (amostra S3), que consiste numa mistura de Ca(OH)_2 , glicerina e paramonoclorofenol canforado. No entanto, não foi constatada diferença estatística entre as amostras S2 e S3. Dos filotipos encontrados, 56% foram não-cultiváveis. Todo o protocolo resultou em canais livres de bactérias em 33% dos casos.

Como não se consegue deixar o canal radicular livre de bactérias em 100% dos casos, é necessário reduzir a microbiota ao nível mais baixo possível, para tentar assegurar o sucesso do tratamento. O Ca(OH)_2 ainda é a melhor medicação disponível para se alcançar esse objetivo. Então, para maximizar a redução bacteriana antes da obturação do SCR, o Ca(OH)_2 deve ser usado como medicação intracanal por no mínimo sete dias (LAW & MESSER, 2004).

A pasta de Ca(OH)_2 tem-se mostrado eficaz, porém sua capacidade antimicrobiana é limitada, uma vez que seu uso promove redução, mas não eliminação por completo dos microorganismos que sobreviveram ao PQM (SOUZA *et al.*, 2005).

Laser

Laser é uma sigla do inglês “*light amplification by stimulated emission of radiation*”, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação.

As principais características do *laser* são: monocromaticidade, pois a luz é composta por apenas um comprimento de onda; alta intensidade; caráter direcional, já que o feixe de luz do *laser* é composto por fótons propagando-se na mesma direção; coerência, pois as ondas se mantêm sincronizadas (BAGNATO, 2001).

Os aparelhos emissores de *laser* são compostos principalmente por três partes: meio ativo, fonte de energia externa e cavidade ótica ou ressonador. O meio ativo pode ser gasoso, sólido ou líquido, e nele se encontram os átomos que contêm os elétrons que, ao decaírem de seus níveis energéticos de forma estimulada, vão produzir feixes de luz (fótons) que constituirão o *laser*. O estímulo para a mudança de nível dos elétrons é assim dado pela fonte de energia externa. O ressonador tem como objetivo fazer com que os fótons que emergem do sistema voltem para ele, produzindo mais emissão estimulada, o que se obtém por meio de espelhos nas extremidades da caixa que provocam a reflexão dos fótons de volta à amostra (BAGNATO, 2001).

O *laser* é classificado em duas categorias — alta e baixa intensidade —, de acordo com o nível de excitabilidade que poderá causar no tecido alvo biológico. No de alta intensidade, a energia depositada no tecido é tão grande que rompe as ligações químicas dessas moléculas ou remove elétrons, resultando no rompimento do tecido. Já no de baixa intensidade, a excitabilidade é relativamente pequena, podendo ocorrer bioestimulação ou

bioinibição das reações químicas e fisiológicas naturais do tecido. A diferença básica entre eles é que, enquanto o *laser* de baixa intensidade regula as funções fisiológicas celulares, o de alta intensidade rompe ou modifica de maneira permanente o tecido, através do corte, ablação, coagulação e vaporização (LIZARELLI, 2005).

A laserterapia de baixa intensidade surgiu com Mester, na Hungria, em 1966, e já é utilizada por cirurgiões-dentista brasileiros há mais de vinte anos (LIZARELLI, 2005). Os *lasers* de baixa intensidade apresentam um efeito analgésico, antiinflamatório e biomodulador (LIZARELLI, 2005).

Terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD é uma nova estratégia antimicrobiana que envolve a combinação de um FS não tóxico, uma fonte de luz e o oxigênio. O FS ativado reage com o oxigênio molecular para produzir um derivado do oxigênio altamente reativo, o oxigênio *singlet*, que induz o dano ou a morte dos microorganismos. Foi estabelecido que o FS que possui pronunciada carga catiônica pode rapidamente se ligar e penetrar nas células bacterianas, e por isso esses componentes mostram alto grau de seletividade para matar microorganismos quando comparados com as células do hospedeiro (GARCEZ *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007; KONOPKA & GOSLINSKI, 2007; GARCEZ *et al.*, 2008).

Um FS ideal deve ser não tóxico e apresentar toxicidade local só depois da ativação pela luz (KONOPKA & GOSLINSKI, 2007). Alguns corantes estão sendo utilizados como agentes FS, como o azul de metileno e o azul de toluidina, entre outros (KONOPKA & GOSLINSKI, 2007).

No estudo *in vitro* de SEAL *et al.* (2002), *S. intermedius* foi inoculado em canais previamente instrumentados e autoclavados, com o objetivo de comparar a capacidade antimicrobiana da combinação de diferentes concentrações do azul de toluidina em diferentes espaços de tempo. Foi utilizado o *laser* hélio-neônio na potência de 35 mW e com 632,8 nm de comprimento de onda. As concentrações do azul de toluidina empregadas foram de 12,5, 25, 50 e 100 µg/ml. Após a coleta de amostras com cones de papel e plaqueamento em placas de ágar-sangue, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia. Observou-se que a concentração de 100 µg/ml no período de dez minutos alcançou a maior redução de bactérias cultiváveis, porém esta redução não foi superior à constatada no grupo onde se usou o NaOCl a 3% por dez minutos.

Com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana da TFD, CASTRO *et al.* (2006) utilizaram o azuleno a 25% associado ao Endo-PTC como FS por cinco minutos, e o *laser* diodo de AsGaAl na potência de 35 mW e 685 nm de comprimento de onda por três minutos, de forma combinada ou separada. Em seguida, compararam os resultados com o resultado obtido mediante o uso de NaOCl a 1% por quinze minutos em tubos de ensaio contendo uma suspensão de *E. faecalis*. Concluíram que o NaOCl apresentou uma ação bactericida, enquanto a TFD teve um efeito bacteriostático em culturas de *E. faecalis*, e que o *laser* ou corante utilizados de forma isolada não exercem nenhuma inibição do crescimento bacteriano.

BONSOR *et al.* (2006a) analisaram o efeito microbiológico da TFD como auxiliar na desinfecção do canal radicular *in vivo*. Para isso, utilizaram o azul de

toluidina a 12,7 µg/ml deixado no canal por um minuto e depois ativado com *laser* diodo por dois minutos com 100 mW de potência. Amostras foram coletadas após o acesso inicial, após o PQM e após a TFD. Com base nos resultados obtidos, concluíram que a terapia estudada foi eficaz em eliminar as bactérias que permaneceram após a terapia convencional.

Segundo BONSOR *et al.* (2006b), o uso do agente quelante ácido cítrico a 20% como irrigante em conjunto com a TFD é uma alternativa eficaz à utilização do NaOCl na desinfecção do SCR.

SOUKOS *et al.* (2006) testaram o poder antimicrobiano do *laser* diodo com o uso do azul de metileno a 25 µg/ml em canais radiculares de dentes extraídos contaminados com *E. faecalis* e em suspensões bacterianas de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum nucleatum*, *P. micros*, *P. endodontalis* e *E. faecalis*. A instrumentação dos canais radiculares foi realizada com instrumentos rotatórios, e a irrigação com NaOCl a 6% e EDTA a 17% para remoção da *smear layer*. Os dentes foram então autoclavados e contaminados com *E. faecalis* por um período de três dias. A TFD realizada nesses canais foi capaz de reduzir em 97% a quantidade de células bacterianas viáveis, enquanto o azul de metileno ou o *laser* puros reduziram em 83,2% e 56,6% respectivamente. Após cinco minutos em contato com a suspensão, o azul de metileno eliminou a *P. endodontalis* e *P. intermedia*, enquanto o *laser* sozinho não apresentou nenhum efeito antibacteriano. A TFD realizado em suspensão, por sua vez, debelou por completo *P. gingivalis*, *F. nucleatum nucleatum* e *P. micros*, reduzindo a viabilidade do *E. faecalis* em 53%.

WILLIAMS *et al.* (2006) testaram a capacidade antibacteriana da TFD utilizando o azul de toluidina a 10 µg/ml como FS e *laser* diodo, comparando com *laser* e com o FS isoladamente em canais radiculares inoculados com *S. intermedius* previamente instrumentados e autoclavados. Com base nos resultados obtidos, concluíram que a TFD foi mais eficaz que os grupos controles.

Em um experimento preliminar realizado em tubos de ensaio com o objetivo de comparar a eficácia do NaOCl a 0,5% e do *laser* diodo na potência de 50 mW e da pasta de azuleno na eliminação de *E. faecalis*, utilizados separadamente ou de modo combinado, GARCEZ *et al.* (2006) concluíram que nem o *laser*, nem a pasta sozinhos apresentaram efeitos bactericidas. Enquanto o NaOCl a 0,5% reduziu em 97,06% o número de células viáveis, a combinação da pasta de azuleno e *laser* reduziu em 99,89%, sendo observada portanto uma diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos. Em um segundo experimento, realizaram o PQM em trinta dentes humanos unirradiculares, contaminando-os com *E. faecalis* por vinte e quatro horas e os dividindo em três grupos: NaOCl a 0,5%; TFD com *laser* diodo e pasta de azuleno; controle. As coletas foram realizadas antes e após os procedimentos específicos de cada grupo. Observaram os autores uma redução de 93,25% no grupo do NaOCl, de 99,2% no da TFD e um aumento da carga bacteriana no grupo controle. Concluíram que a TFD foi eficaz na redução da população de *E. faecalis* em canais radiculares, podendo ser usada como coadjuvante do tratamento endodôntico.

GARCEZ *et al.* (2007), em um estudo *ex vivo* feito em incisivos e caninos superiores, observaram que a combinação do FS PEI-ce6 com o *laser* diodo com potência de 40 mW utilizado como coadjuvante à terapia endodôntica convencional apresentou uma redução significativa da carga bacteriana, tendo principalmente reduzido o crescimento bacteriano após vinte e quatro horas, quando comparado com o tratamento endodôntico simples.

BERGMANS *et al.* (2008) realizaram o PQM em canais radiculares de dentes extraídos com brocas de Gates Glidden e sistema rotatório GT em uma seqüência *crown-down*. O preparo apical foi finalizado com o instrumento GT 30 *taper* 10 a 1 mm do forame apical. As soluções irrigadoras foram o NaOCl a 2,5% e o EDTA a 17% para a remoção da *smear layer*. Os dentes foram autoclavados e inoculados com uma suspensão bacteriana de *Streptococcus anginosus*, *E. faecalis* e *F. nucleatum* por dois dias. Utilizando azul de toluidina a 12,7 µg/ml como FS e *laser* diodo com 100 mW de potência, observaram os autores que o FS e o *laser* sozinhos não apresentavam efeitos significativos, ao passo que a combinação dos dois reduziu significativamente a contagem bacteriana.

Em um estudo *in vivo*, GARCEZ *et al.* (2008) analisaram amostras de vinte canais de incisivos e caninos com lesão perirradicular confirmada radiograficamente. Os canais foram instrumentados pela técnica *crown-down* e irrigados com NaOCl a 2,5%, sendo a *smear layer* removida com EDTA a 17%. A TFD foi realizado com o PEI-ce6 como FS e com o *laser* diodo com 40 mW de potência. Amostras foram coletadas antes e após a instrumentação, posteriormente à TFD, após uma semana com Ca(OH)₂ e após uma segunda

aplicação do *laser*. Concluíram que houve uma redução significativa da carga bacteriana, e que a segunda TFD é ainda mais eficaz.

Tendo por objetivo a investigação da eficácia da TFD em patógenos endodônticos, FONSECA *et al.* (2008) avaliaram a redução de *E. faecalis* em canais de dentes humanos unirradiculares. O PQM dos trinta e seis dentes foi feito com instrumentos manuais tipo K e NaOCl a 0,5%, e a *smear layer* removida com EDTA a 17%. Em seguida os dentes foram autoclavados e contaminados com *E. faecalis* por quarenta e oito horas. Dividiram-se as amostras em dois grupos, sendo um controle, onde não foi executado nenhum procedimento, e um teste, onde se fez a TFD com o azul de toluidina a 0,0125% e *laser* diodo na potência de 50 mW e 660 nm de comprimento de onda. Foram feitas duas coletas, sendo uma antes e outra depois do procedimento de cada grupo, e procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colônias. Observaram os autores que no grupo teste houve uma redução de 99,9% na contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs), enquanto no grupo controle houve um aumento de 2,6% na contagem de UFCs. Com base nos resultados obtidos, concluíram que a TFD é um eficaz agente bactericida.

FIMPLE *et al.* (2008) estudaram os efeitos da TFD com azul de metileno a 25 µg/ml dissolvido em meio BHI ou PBS em dentes unirradiculares extraídos, contaminados por um biofilme multiespécies de *A. israeli*, *F. nucleatum nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*. Os dentes tiveram suas coroas cortadas, foram preparados com instrumento rotatório ProTaper e irrigados com NaOCl a 6% e EDTA para remoção da *smear layer*. Foram então

autoclavados e contaminados com as espécies bacterianas citadas, sendo incubados por três dias. As amostras foram divididas aleatoriamente nos seguintes grupos: dois controles (sem *laser* e sem FS); azul de metileno dissolvido em meio BHI; *laser*; TFD com azul de metileno dissolvido em BHI; azul de metileno dissolvido em PBS; TFD com azul de metileno dissolvido em PBS. Os canais foram preenchidos e imersos por dez minutos nas soluções de FS, BHI ou PBS, de acordo com o procedimento específico de cada grupo. O *laser* foi aplicado durante dois minutos e meio, seguido de um intervalo de também dois minutos e meio, com nova aplicação do *laser* durante esse mesmo tempo. A coleta da solução que saiu pelo forame apical foi realizada antes e depois do procedimento específico de cada grupo, sendo em seguida semeada em placa ágar-sangue e feita a contagem das UFCs. Observaram os autores uma redução da população bacteriana em 73% no grupo TFD com azul de metileno dissolvido em meio BHI, e em 80% no dissolvido em PBS. O azul de metileno dissolvido em meio BHI foi capaz de reduzir a população bacteriana em 25%, ao passo que, dissolvido em PBS, em 34%, enquanto o *laser* não apresentou eficácia na antibacteriana. O experimento demonstra, portanto, que a TFD pode ser um eficaz auxiliar no tratamento endodôntico convencional.

PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo *in vitro* foi avaliar a eficácia antibacteriana adicional da terapia fotodinâmica utilizando o *laser* diodo com o azul de metileno ou com o azul de toluidina como fotossensibilizadores após o preparo químico-mecânico de canais infectados com uma cepa endodôntica de *Enterococcus faecalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo do estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, tendo obtido aprovação (Protocolo CAAE 0182.0.308.000-08).

Seleção das amostras e preparo inicial

Foram utilizados cem dentes unirradiculares humanos extraídos doados pelo banco de dentes da Universidade Estácio de Sá, sem calcificações, reabsorções internas ou externas, fraturas ou ápices incompletos. O acesso à câmara pulpar foi feito com brocas esféricas compatíveis com o tamanho da coroa, bem como com brocas Endo Z (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). A odontometria foi estabelecida pela visualização direta de um instrumento tipo K número 10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) no forame apical. Os forames apicais foram instrumentados 1 mm além do comprimento de patência (CP), com um instrumento tipo K número 20, com o objetivo de padronizar a constrição apical. O comprimento total não foi padronizado porque cada dente foi o controle de si próprio.

Após o estabelecimento da odontometria, os forames apicais foram vedados com resina epóxi Araldite (Brascola, São Paulo, SP) de endurecimento rápido, a fim de prevenir o extravasamento da cultura bacteriana após a contaminação dos espécimes.

Em seguida, foram utilizadas formas plásticas de gelo untadas com vaselina, onde os dentes foram incluídos em gesso, deixando-se apenas a

coroa de fora (Figura 1). Em seguida, os espécimes foram esterilizados em autoclave a 121°C, 26 PSI por 15 minutos. A montagem no gesso tem por objetivo facilitar a manipulação.



Figura 1 – Dente montado no gesso.

Contaminação

Preparou-se uma suspensão bacteriana mediante adição a um meio TSB (Caldo Trypticase-Soja) de 1 ml de cultura pura de uma cepa endodôntica de *E. faecalis* (MB 35), isolada no estudo de ZOLETTI *et al.* (2006) e cultivada no referido meio por 24 horas. Cada canal foi completamente preenchido com a suspensão de *E. faecalis*, com a utilização de seringas de insulina estéreis. A suspensão bacteriana foi levada até o comprimento de trabalho (CT), estabelecido a 1 mm do CP, com o auxílio de um instrumento tipo K número 15 estéril.

Os dentes incluídos e já contaminados foram colocados em uma caixa metálica estéril e incubados a 37°C por 7 dias, sendo o caldo de cultura estéril adicionado nos canais a cada 48 horas.

Preparo dos canais

O pré-alargamento dos segmentos cervical e médio do canal foi realizado com o alargador La Axxess número 35 (Sybron Endo, Califórnia, EUA). No CT, a instrumentação apical foi feita a 300 rpm e 2 N/cm de torque, com o uso do instrumento rotatório de NiTi ProTaper (Dentsply-Maillefer) número F4 ou F2 (Figura 2), utilizando-se o motor Endo Pro Torque (Driller, São Paulo, Brasil). Os canais foram irrigados com NaOCl a 2,5% (Super Globo, Rio de Janeiro, RJ).

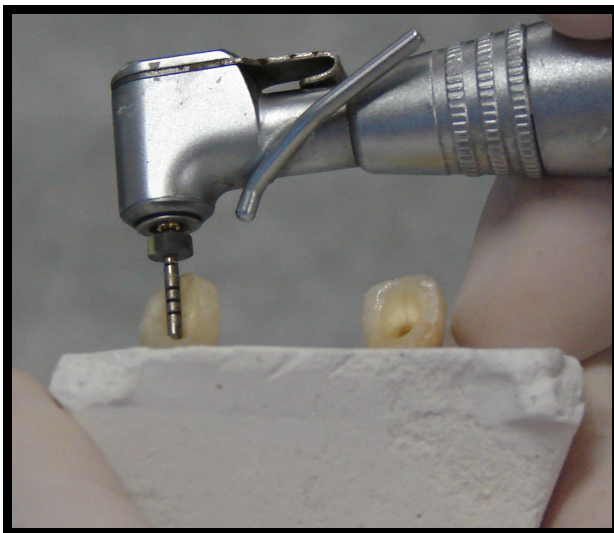


Figura 2 – Instrumentação rotatória do canal radicular.



Figura 3 – Irrigação do canal utilizando-se agulha NaviTip.

O canal foi irrigado com 2 ml de NaOCl a 2,5%, com o uso da ponta de irrigação NaviTip de 30 G (Ultradent, Utah, EUA) introduzida a 5 mm do CT (Figura 3), depois da utilização da La Axxess e da ProTaper, sendo o volume total de solução irrigadora utilizada nessa fase de 4 ml. Usou-se um instrumento tipo K número 15 para manter o canal desobstruído.

A *smear layer* foi removida com 5 ml de ácido etilenodiamino tetracético dissódico (EDTA) (Biodinâmica, Paraná, Brasil) a 17% por 3 minutos, sendo em seguida realizada a irrigação final com 5 ml de NaOCl, 1 ml de tiosulfato de sódio para neutralizar o NaOCl e 1 ml de solução salina estéril.

Divisão dos grupos

Após o PQM, os dentes foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais de acordo com o procedimento pós-preparo:

Grupo A → terapia fotodinâmica com azul de metileno;

Grupo B → controle: *laser* sem fotossensibilizador;

Grupo C → controle: azul de metileno;

Grupo D → terapia fotodinâmica com azul de toluidina;

Grupo E → terapia fotodinâmica com azul de toluidina (irrigação com solução salina);

Grupo F → terapia fotodinâmica com azul de metileno (irrigação com solução salina).

Segue a descrição dos grupos:

Grupo A – Terapia fotodinâmica com azul de metileno

Nesse grupo, vinte e seis dentes foram utilizados, dos quais dezesseis foram instrumentados com ProTaper F4 (Grupo A1) e dez com F2 (Grupo A2). Preencheu-se o canal radicular com uma solução de azul de metileno a 15 µg/ml até a sua embocadura (Figura 4), utilizando-se uma seringa com a ponta

NaviTip estéril acoplada. A solução foi deixada no canal por 2 minutos, sendo agitada por um instrumento tipo K número 15.

A luz vermelha do *Twin laser* (MMOptics, São Paulo, SP) (Figura 5), um *laser* diodo de baixa potência, foi ativada por 4 minutos em um comprimento de onda de 660 nm com 40 mW de potência total. A fibra ótica (Figura 6) (MMOptics) foi inserida no interior do canal radicular até alcançar o CT, sendo movimentos espiralados então realizados da porção apical para a cervical, a fim de assegurar uma difusão uniforme de luz dentro do canal (Figura 7) (GARCEZ *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007; GARCEZ *et al.*, 2008). Como os diâmetros finais das fibras óticas não estavam padronizados, uma régua calibradora (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi utilizada para seleção da fibra com diâmetro final correspondendo a um instrumento número 30.

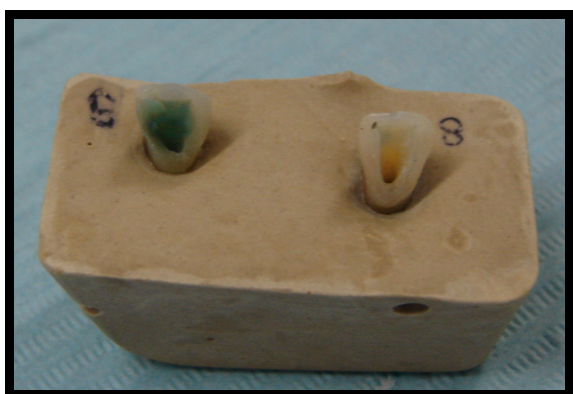


Figura 4 – Preenchimento do canal com o agente fotossensibilizador.



Figura 5 – Aparelho *Twin laser* (MMOptics).

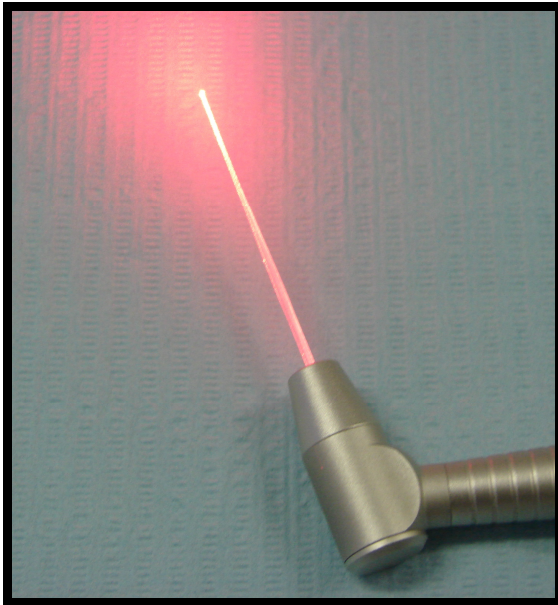


Figura 6 – Fibra ótica (MMOptics).



Figura 7 – Aplicação do *laser* diodo de baixa potência no canal radicular.

Grupo B – Controle: Laser sem fotossensibilizador

Nesse grupo, vinte dentes foram utilizados, dos quais quinze foram instrumentados com a ProTaper F4 (Grupo B1) e cinco com a F2 (Grupo B2). Procedeu-se do mesmo modo descrito para o grupo A, com solução salina substituindo o agente fotossensibilizador.

Grupo C – Controle: Azul de metileno

Nesse grupo, doze dentes foram utilizados, dos quais sete foram instrumentados com a ProTaper F4 (Grupo C1) e cinco com a F2 (Grupo C2). O canal radicular foi preenchido com uma solução de azul de metileno a 15 µg/ml até a sua embocadura, utilizando-se uma seringa com ponta NaviTip esteril acoplada. A solução foi deixada no canal por 6 minutos, mesmo tempo total em que permaneceu nos grupos em que o *laser* foi utilizado, sendo agitada por um instrumento tipo K número 15.

Grupo D – Terapia fotodinâmica com azul de toluidina

Nesse grupo, dez dentes tiveram seus canais instrumentados com a ProTaper F2. Foi realizado o mesmo procedimento já descrito para o grupo A, com uma solução de azul de toluidina a 15 µg/ml em vez do azul de metileno.

Grupo E – Terapia fotodinâmica com azul de toluidina (irrigação com solução salina)

Nesse grupo, dezesseis dentes tiveram seu canais irrigados com solução salina em vez de NaOCl 2,5% e instrumentados com a ProTaper F2. Foi realizado o mesmo procedimento descrito para o grupo A, com uma solução de azul de toluidina a 15 µg/ml no lugar do azul de metileno.

Grupo F – Terapia fotodinâmica com azul de metileno (irrigação com solução salina)

Nesse grupo, dezesseis dentes foram utilizados, procedendo-se do mesmo modo já descrito para o grupo E, com uma solução de azul de metileno a 15 µg/ml no lugar do azul de toluidina.

Coleta de amostras

As amostras bacteriológicas foram coletadas antes da instrumentação (S1), após o PQM (S2) e depois do procedimento específico de cada grupo (S3). Os canais foram preenchidos com solução salina estéril a 0,85% e cada amostra foi coletada com o consecutivo uso de três cones de papel absorvente estéreis (Endpoints, Manacapuru, AM) de calibre compatível com o canal e introduzidos até o CT. Antes da realização da coleta S3, utilizou-se um instrumento tipo K número 15 para induzir formação de raspas de dentina que

ficassem suspensas na solução salina para serem absorvidas pelo cone de papel.

Os cones de papel foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1ml de solução salina a 0,85%, sendo em seguida centrifugados por um minuto. Após diluição seriada em solução salina, alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em placas de ágar *Mitis-salivarius*, sendo depois incubadas a 37° por 48 horas. As amostras S1 foram diluídas até 10^{-3} , e as amostras S2 e S3 foram plaqueadas sem diluição. Procedeu-se então à contagem das unidades formadoras de colônias (CFUs), sendo elas depois transformadas em valores de log.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Espécimes contaminados por 7 dias com *E. faecalis* (cepa endodôntica MB 35) foram preparados, para observação em um microscópio eletrônico de varredura, com o objetivo de se confirmar a colonização das paredes do canal.

Esses espécimes foram mantidos em frascos com formalina tamponada a 10% até serem seccionados longitudinalmente e novamente imersos nessa solução. Após a fixação, os espécimes foram deixados para secar em temperatura ambiente e fixados em uma superfície metálica.

Os dentes foram então desidratados até o ponto crítico (Cressington sputer coater 108, Watford, Inglaterra), recobertos com ouro e então analisados no MEV (Jeol, JSM-5800LV, Tóquio, Japão).

.

Análise estatística

Análise intragrupo

A análise intragrupo foi realizada para todos os grupos, comparando-se S1 x S2, S1 x S3 e S2 x S3. Os dados obtidos das amostras foram analisados estatisticamente pelo teste pareado não-paramétrico de Wilcoxon a 5%, com o objetivo de avaliar o grau de eficácia de cada procedimento na eliminação ou redução da infecção.

Análise intergrupo

A análise intergrupo teve por objetivos avaliar a eficácia da TFD com azul de metileno e com azul de toluidina, bem como comparar a eficácia desses dois procedimentos.

Para avaliar o efeito adicional da TFD em relação ao PQM, optou-se por usar como base os dados absolutos obtidos na S3, já que resultados semelhantes estatisticamente foram observados quando os valores de redução de S1 para S3 foram usados na análise. Foram usados os testes de Mann-Whitney (para comparações entre dois grupos) ou Kruskal-Wallis (para comparações entre três grupos) com o nível de significância estabelecido em 5% ($P \leq 0,05$), nas seguintes comparações:

Grupo A2 (amostras 17-26) **X Grupo D** → TFD Azul de metileno **X** TFD Azul de toluidina (irrigação com NaOCl e instrumentação com ProTaper F2);

Grupo E X Grupo F → TFD Azul de toluidina metileno **X** TFD Azul de metileno (irrigação com NaCl e instrumentação com ProTaper F2);

Grupo A X Grupo B X Grupo C → TFD Azul de metileno **X** *Laser* sem FS **X** Azul de metileno (irrigação com NaOCl e instrumentação com ProTaper F4 e F2);

Grupo A1 (amostras 1-16) **X** **Grupo B1** (amostras 1-15) **X** **Grupo C1** (amostras 1-7) → TFD Azul de metileno **X** *Laser* sem FS **X** Azul de metileno (irrigação com NaOCl e instrumentação com ProTaper F4);

Grupo A2 (amostras 17-26) **X** **Grupo B2** (amostras 16-20) **X** **Grupo C2** (amostras 8-12) → TFD Azul de metileno **X** *laser* sem FS **X** Azul de metileno (irrigação com NaOCl e instrumentação com ProTaper F2);

Grupo A X Grupo F → TFD Azul de metileno (irrigação com NaOCl) **X** TFD Azul de metileno (irrigação com NaCl);

Grupo A2 (amostras 17-26) **X Grupo F** → TFD Azul de metileno (irrigação com NaOCl e instrumentação com F2) **X** TFD Azul de metileno (irrigação com NaCl e instrumentação com ProTaper F2);

Grupo B2 (amostras 16-20) **X Grupo D** → *Laser* sem FS **X** TFD Azul de toluidina (irrigação com NaOCl e instrumentação com ProTaper F2);

Grupo D **X Grupo E** → TFD Azul de toluidina (irrigação com NaOCl e instrumentação com ProTaper F2) **X** TFD Azul de toluidina (irrigação com NaCl e instrumentação com ProTaper F2);

S2 (grupos A1 + B1 + C1) **X S2 (grupos A2+ B2 + C2 + D)** → PQM com ProTaper F4 e NaOCl **X** PQM com ProTaper F2 e NaOCl.

RESULTADOS

1 – Microscopia eletrônica de varredura

A análise por microscopia eletrônica de varredura confirmou a colonização das paredes do canal radicular por cepas endodônticas de *E. faecalis*, na maioria das vezes formando arranjos em biofilmes (Figura 8).

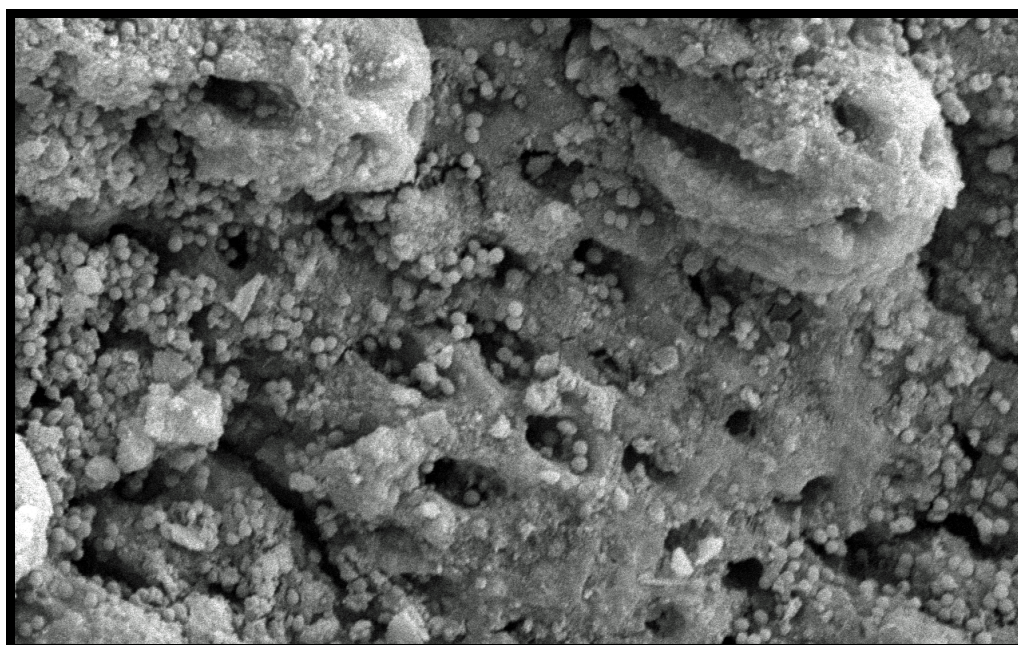


Figura 8 – Fotomicrografia mostrando padrão da colonização inicial das paredes do canal radicular pela cepa endodôntica MB 35 de *E. faecalis* (aumento original de 2700x).

2 – Eficácia da terapia fotodinâmica utilizando-se o azul de metileno como agente fotossensibilizador

2.1 – Irrigação com NaOCl

No grupo da TFD com azul de metileno (Grupo A), após a contagem das UFCs iniciais (S1), obteve-se um valor médio de contaminação de $4,19 \times 10^6$ (mediana de $2,90 \times 10^6$). A média da quantidade de bactérias presentes depois do PQM (S2) foi $2,13 \times 10^3$ (mediana de $1,20 \times 10^2$). Após a TFD (S3), a média das UFCs obtida foi $2,06 \times 10^2$ (mediana de $7,5 \times 10^1$) (Tabela 1).

As medianas da redução percentual de S2 para S1 e de S3 para S1 foram 99,99%, enquanto a de S3 para S2 foi 12,28%.

Realizada a análise estatística com o teste de Wilcoxon a 5%, verificou-se que tanto o PQM quanto o PQM + TFD produziram uma redução altamente significativa quando comparados com as amostras iniciais ($P < 0,001$ para ambas comparações), e que a TFD reduziu significativamente o número de bactérias quando comparadas com as amostras coletadas após a instrumentação ($P = 0,05$).

**Tabela 1 - GRUPO A: Terapia fotodinâmica com azul de metileno
(irrigação com NaOCl)**

Amostra	S1	S2	S3
1. F4	$3,60 \times 10^6$	$4,60 \times 10^2$ (99,99%)*	0 (100%)* (100%)**
2. F4	$1,47 \times 10^7$	$4,10 \times 10^2$ (99,99%)*	$3,30 \times 10^2$ (99,99%)* (19,51%)**
3. F4	$4,70 \times 10^5$	$2,37 \times 10^4$ (94,96%)*	$1,34 \times 10^3$ (99,71%)* (94,35%)**
4. F4	$6,56 \times 10^6$	$1,39 \times 10^4$ (99,79%)*	$2,80 \times 10^2$ (99,99%)* (97,99%)**
5. F4	$3,64 \times 10^6$	$3,36 \times 10^3$ (99,91%)*	$6,40 \times 10^2$ (99,98%)* (80,95%)**
6. F4	$3,84 \times 10^6$	$1,58 \times 10^3$ (99,96%)*	0 (100%)* (100%)**
7. F4	$1,20 \times 10^6$	$8,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$7,40 \times 10^2$ (99,94%)* (-825,00%)**
8. F4	$8,20 \times 10^5$	$1,3 \times 10^2$ (99,98%)*	$6,00 \times 10^2$ (99,93%)* (-361,54%)**
9. F4	$8,72 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
10. F4	$6,40 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
11. F4	$1,58 \times 10^7$	$7,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$2,80 \times 10^2$ (99,99%)* (-300,00%)**
12. F4	$1,16 \times 10^6$	$1,50 \times 10^2$ (99,99%)*	$1,10 \times 10^2$ (99,99%)* (26,67%)**
13. F4	$1,44 \times 10^6$	$5,70 \times 10^2$ (99,96%)*	0 (100%)* (100%)**
14. F4	$2,56 \times 10^6$	$4,70 \times 10^2$ (99,98%)*	$1,10 \times 10^2$ (99,99%)* (76,60%)**
15. F4	$6,20 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
16. F4	$1,56 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
17. F2	$4,00 \times 10^6$	$9,92 \times 10^3$ (99,75%)*	$3,00 \times 10^2$ (99,99%)* (96,98%)**
18. F2	$3,04 \times 10^6$	$1,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$4,00 \times 10^1$ (99,99%)* (-300,00%)**
19. F2	$6,88 \times 10^6$	$2,20 \times 10^2$ (99,99%)*	$1,20 \times 10^2$ (99,99%)* (45,45%)**
20. F2	$1,68 \times 10^6$	$1,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$1,00 \times 10^1$ (99,99%)* (0%)**
21. F2	$2,52 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
22. F2	$1,60 \times 10^5$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
23. F2	$4,80 \times 10^6$	$2,00 \times 10^1$ (99,99%)*	0 (100%)* (100%)**
24. F2	$2,76 \times 10^6$	$7,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$2,80 \times 10^2$ (99,99%)* (-300,00%)**
25. F2	$2,40 \times 10^6$	$1,90 \times 10^2$ (99,99%)*	$1,80 \times 10^2$ (99,99%)* (5,26%)**
26. F2	$2,24 \times 10^6$	$1,10 \times 10^2$ (99,99%)*	0 (100%)* (100%)**
Média	$4,19 \times 10^6$	$2,13 \times 10^3$	$2,06 \times 10^2$
Desvio padrão	$3,92 \times 10^6$	$5,47 \times 10^3$	$3,17 \times 10^2$
Mediana	$2,90 \times 10^6$	$1,20 \times 10^2$ (99,99%)*	$7,5 \times 10^1$ (99,99%)* (12,28%)**

(%)* → Em relação à S1.

(%)** → Em relação à S2.

No grupo de *laser* sem fotossensibilizador (Grupo B), após a contagem das UFCs iniciais (S1), obteve-se um valor médio de contaminação de $5,80 \times 10^6$ (mediana de $4,84 \times 10^6$). A média da quantidade de bactérias presentes depois do PQM (S2) foi $1,47 \times 10^3$ (mediana de $3,5 \times 10^1$). Após o uso do *laser* (S3), a média das UFCs obtida foi $8,68 \times 10^2$ (mediana de 0) (Tabela 2).

A mediana da redução percentual de S2 para S1 foi 99,99%, enquanto a de S3 para S1 e a de S3 para S2 foram respectivamente 100% e 0%.

Realizada a análise estatística com o teste de Wilcoxon a 5%, verificou-se que tanto o PQM quanto o uso do PQM + *laser* sem fotossensibilizador produziram uma redução significativa quando comparados com as amostras iniciais ($P = 0,02$ para ambas comparações), e que o *laser* reduziu significativamente o número de bactérias quando comparadas com as amostras coletadas após a instrumentação ($P = 0,048$).

**Tabela 2 - GRUPO B: controle - *laser* sem fotossensibilizador
(irrigação com NaOCl)**

Amostra	S1	S2 (NaOCl)		S3		
1. F4	$8,00 \times 10^6$	$7,00 \times 10^1$	(99,99%)*	$1,20 \times 10^2$	(99,99%)*	(-71,43%)**
2. F4	$1,34 \times 10^7$	$1,22 \times 10^3$	(99,99%)*	0	(100%)*	(100%)**
3. F4	$1,84 \times 10^6$	$4,48 \times 10^3$	(99,76%)*	$8,80 \times 10^3$	(99,52%)*	(-96,43%)**
4. F4	$5,92 \times 10^6$	$5,50 \times 10^2$	(99,99%)*	0	(100%)*	(100%)**
5. F4	$3,68 \times 10^6$	$2,18 \times 10^4$	(99,41%)*	$4,30 \times 10^2$	(99,99%)*	(98,03%)**
6. F4	$1,00 \times 10^6$	0	(100%)*	0	(100%)*	(0%)**
7. F4	$2,08 \times 10^6$	0	(100%)*	0	(100%)*	(0%)**
8. F4	$4,80 \times 10^6$	$1,00 \times 10^1$	(99,99%)*	$1,00 \times 10^1$	(99,99%)*	(0%)**
9. F4	$4,88 \times 10^6$	$3,00 \times 10^1$	(99,99%)*	$4,00 \times 10^1$	(99,99%)*	(-33,33%)**
10. F4	$5,28 \times 10^6$	0	(100%)*	0	(100%)*	(0%)**
11. F4	$4,80 \times 10^6$	0	(100%)*	0	(100%)*	(0%)**
12. F4	$8,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^1$	(99,99%)*	0	(100%)*	(100%)**
13. F4	$8,40 \times 10^5$	$1,80 \times 10^2$	(99,98%)*	$4,50 \times 10^3$	(99,46%)*	(-2400,00%)**
14. F4	$6,80 \times 10^5$	0	(100%)*	0	(100%)*	(0%)**
15. F4	$2,96 \times 10^6$	$4,00 \times 10^1$	(99,99%)*	0	(100%)*	(100%)**
16. F2	$1,82 \times 10^7$	$6,30 \times 10^2$	(99,99%)*	$3,24 \times 10^3$	(99,98%)*	(-414,29%)**
17. F2	$1,26 \times 10^7$	0	(100%)*	0	(100%)*	(0%)**
18. F2	$5,36 \times 10^6$	$1,00 \times 10^1$	(99,99%)*	0	(100%)*	(100%)**
19. F2	$7,52 \times 10^6$	$8,00 \times 10^1$	(99,99%)*	$7,00 \times 10^1$	(99,99%)*	(12,500%)**
20. F2	$4,16 \times 10^6$	$1,90 \times 10^2$	(99,99%)*	$1,60 \times 10^2$	(99,99%)*	(15,80%)**
Média	$5,80 \times 10^6$	$1,47 \times 10^3$			$8,68 \times 10^2$	
Desvio padrão	$4,54 \times 10^6$	$4,89 \times 10^3$			$2,21 \times 10^3$	
Mediana	$4,84 \times 10^6$	$3,5 \times 10^1$	(99,99%)*	0	(100%)*	(0%)**

(%)* → Em relação à S1.

(%)** → Em relação à S2.

No grupo de azul de metileno (Grupo C), após a contagem das UFCs iniciais (S1) obteve-se um valor médio de contaminação de $2,52 \times 10^6$ (mediana de $1,64 \times 10^6$). A média da quantidade de bactérias presentes depois do PQM (S2) foi $1,53 \times 10^2$ (mediana de $2,5 \times 10^1$). Após o uso do azul de metileno (S3), a média das UFCs obtida foi $4,16 \times 10^1$ (mediana de $0,5 \times 10^1$) (Tabela 3).

As medianas da redução percentual de S2 para S1 e de S3 para S1 foram 99,99%, enquanto a de S3 para S2 foi 16,66%.

Realizada a análise estatística com o teste de Wilcoxon a 5%, verificou-se que tanto o PQM quanto o PQM + azul de metileno produziram uma redução significativa quando comparados com as amostras iniciais ($P = 0,02$ para ambas comparações), e que o corante reduziu significativamente o número de bactérias quando comparadas com as amostras coletadas após a instrumentação ($P = 0,05$).

Tabela 3 - GRUPO C: controle - azul de metileno (irrigação com NaOCl)

Amostras	S1	S2	S3
1. F4	$2,14 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
2. F4	$5,40 \times 10^5$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
3. F4	$5,52 \times 10^6$	$6,40 \times 10^2$ (99,99%)*	$3,00 \times 10^1$ (99,99%)* (95,31%)**
4. F4	$6,40 \times 10^5$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
5. F4	$8,80 \times 10^5$	$1,40 \times 10^2$ (99,98%)*	$3,00 \times 10^1$ (99,99%)* (78,57%)**
6. F4	$1,08 \times 10^6$	$3,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$2,00 \times 10^1$ (99,99%)* (33,33%)**
7. F4	$2,20 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
8. F2	$2,00 \times 10^6$	$3,80 \times 10^2$ (99,98%)*	$2,40 \times 10^2$ (99,99%)* (36,84%)**
9. F2	$9,30 \times 10^6$	$2,40 \times 10^2$ (99,99%)*	$1,00 \times 10^1$ (99,99%)* (95,83%)**
10. F2	$6,00 \times 10^5$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
11. F2	$1,28 \times 10^6$	$3,90 \times 10^2$ (99,97%)*	0 (100%)* (100,00%)**
12. F2	$4,16 \times 10^6$	$2,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$1,70 \times 10^2$ (99,99%)* (-750,00%)**
Média	$2,52 \times 10^6$	$1,53 \times 10^2$	$4,16 \times 10^1$
Desvio padrão	$2,62 \times 10^6$	$2,13 \times 10^2$	$7,86 \times 10^1$
Mediana	$1,64 \times 10^6$	$2,5 \times 10^1$ (99,99%)*	$0,5 \times 10^1$ (99,99%)* (16,66%)**

(%)* → Em relação à S1.

(%)** → Em relação à S2.

Com o objetivo de testar a eficácia do azul de metileno, foram feitas comparações intergrupos entre os resultados obtidos dos grupos TFD com azul de metileno (Grupo A), do *laser* (Grupo B) e do azul de metileno (Grupo C).

Realizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis, e não foi observada diferença estatística significativa quando se compararam os valores obtidos na S3 ($P = 0,45$).

Ao realizar a comparação entre esses mesmos grupos, apenas com as amostras instrumentadas com a ProTaper F4 (Grupos A1, B1 e C1) ou com ProTaper F2 (Grupos A2, B2 e C2), também não se observou diferença estatística significativa quando se compararam os valores obtidos na S3 com o teste de Kruskal-Wallis (respectivamente, $P = 0,36$ e $P = 0,97$).

2.2) Irrigação com solução salina

No grupo da TFD com azul de metileno (Grupo F), após a contagem das UFCs iniciais (S1) obteve-se um valor médio de contaminação de $1,40 \times 10^6$ (mediana de $1,00 \times 10^6$). A média da quantidade de bactérias presentes depois do PQM usando solução salina como irrigante (S2) foi $4,45 \times 10^3$ (mediana de $1,21 \times 10^3$). Após a TFD (S3) a média das UFCs obtida foi $1,53 \times 10^3$ (mediana de $5,05 \times 10^2$) (Tabela 4).

A mediana da redução percentual de S2 para S1 foi 99,84%, enquanto a de S3 para S1 e a de S3 para S2 foram respectivamente 99,93% e 62%.

Realizada a análise estatística com o teste de Wilcoxon a 5%, verificou-se que tanto o PQM quanto PQM + TFD produziram uma redução estatisticamente significativa quando comparados com as amostras iniciais ($P = 0,02$ para ambas comparações), e que a TFD reduziu significativamente o número de bactérias quando comparadas com as amostras coletadas após a instrumentação ($P = 0,05$).

Tabela 4 - GRUPO F: Terapia fotodinâmica com azul de metileno
(irrigação com solução salina)

Amostra	S1	S2	S3
1. F2	$1,00 \times 10^6$	$1,20 \times 10^3$ (99,88%)*	$1,10 \times 10^2$ (99,99%)* (90,83%)**
2. F2	$1,30 \times 10^5$	$3,60 \times 10^2$ (99,72%)*	$9,70 \times 10^2$ (99,25%)* (-169,44%)**
3. F2	$6,80 \times 10^5$	$1,22 \times 10^3$ (99,82%)*	$1,15 \times 10^4$ (98,31%)* (-842,62%)**
4. F2	$1,78 \times 10^6$	$3,00 \times 10^2$ (99,98%)*	$1,02 \times 10^3$ (99,94%)* (-240,00%)**
5. F2	$1,10 \times 10^5$	$1,40 \times 10^2$ (99,87%)*	$1,10 \times 10^2$ (99,90%)* (21,43%)**
6. F2	$2,60 \times 10^6$	$1,50 \times 10^2$ (99,99%)*	$4,70 \times 10^2$ (99,98%)* (-213,33%)**
7. F2	$4,20 \times 10^5$	$1,16 \times 10^3$ (99,72%)*	$2,30 \times 10^2$ (99,94%)* (80,17%)**
8. F2	$3,10 \times 10^5$	$3,80 \times 10^2$ (99,88%)*	$3,70 \times 10^2$ (99,88%)* (2,63%)**
9. F2	$2,24 \times 10^6$	$1,60 \times 10^3$ (99,93%)*	$7,60 \times 10^2$ (99,97%)* (52,50%)**
10. F2	$5,70 \times 10^5$	$3,44 \times 10^3$ (99,40%)*	$3,80 \times 10^2$ (99,93%)* (88,95%)**
11. F2	$1,00 \times 10^6$	$8,00 \times 10^3$ (99,20%)*	$2,28 \times 10^3$ (99,77%)* (71,50%)**
12. F2	$1,72 \times 10^6$	$9,80 \times 10^2$ (99,94%)*	$5,40 \times 10^2$ (99,97%)* (44,90%)**
13. F2	$2,80 \times 10^6$	$3,84 \times 10^3$ (99,87%)*	$2,10 \times 10^2$ (99,99%)* (94,53%)**
14. F2	$5,80 \times 10^5$	$1,06 \times 10^4$ (98,17%)*	$7,30 \times 10^2$ (99,87%)* (93,11%)**
15. F2	$4,60 \times 10^6$	$3,20 \times 10^4$ (99,30%)*	$4,48 \times 10^3$ (99,90%)* (86,00%)**
16. F2	$1,84 \times 10^6$	$5,76 \times 10^3$ (99,69%)*	$2,40 \times 10^2$ (99,99%)* (95,83%)**
Média	$1,40 \times 10^6$	$4,45 \times 10^3$	$1,53 \times 10^3$
Desvio padrão	$1,22 \times 10^6$	$7,96 \times 10^3$	$2,87 \times 10^3$
Mediana	$1,00 \times 10^6$	$1,21 \times 10^3$ (99,84%)*	$5,05 \times 10^2$ (99,93%)* (62,00%)**

(%)* → Em relação à S1.

(%)** → Em relação à S2.

Por meio do teste de Mann-Whitney, procedeu-se a uma comparação intergrupo dos valores de S3 obtidos, entre o grupo TFD com azul de metileno e NaOCl como solução irrigadora (Grupo A) e o grupo TFD com azul de metileno e solução salina como irrigante (Grupo F), comparação que revelou uma diferença altamente significativa ($P < 0,001$).

Também se observou uma diferença bastante significativa ($P < 0,001$) utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney para comparar os valores S3

apenas das amostras do grupo A instrumentadas com ProTaper F2 (Grupo A2) com as do grupo F, no qual apenas F2 foi usada.

3) Eficácia da terapia fotodinâmica utilizando-se o azul de toluidina como agente fotossensibilizador

3.1) Irrigação com NaOCl

No grupo da TFD com azul de toluidina (Grupo D), após a contagem das UFCs iniciais (S1) obteve-se um valor médio de contaminação de $6,50 \times 10^6$ (mediana de $6,04 \times 10^6$). A média da quantidade de bactérias presentes depois do PQM (S2) foi $1,63 \times 10^3$ (mediana de $2,10 \times 10^2$). Após a TFD (S3), a média das UFCs obtida foi $3,66 \times 10^2$ (mediana de $1,20 \times 10^2$) (Tabela 5).

As medianas da redução percentual de S2 para S1 e de S3 para S1 foram 99,99%, enquanto a de S3 para S2 foi 0%.

Realizada a análise estatística com o teste de Wilcoxon a 5%, verificou-se que tanto o PQM quanto PQM + TFD produziram uma redução estatisticamente significativa quando comparados com as amostras iniciais ($P = 0,02$ para ambas comparações), e que a TFD reduziu significativamente o número de bactérias quando comparadas com as amostras coletadas após a instrumentação ($P = 0,05$).

Tabela 5 - GRUPO D: Terapia fotodinâmica com azul de toluidina (irrigação com NaOCl)

Amostra	S1	S2	S3
1. F2	$3,44 \times 10^6$	$4,10 \times 10^2$ (99,99%)*	$5,80 \times 10^2$ (99,98%)* (-41,46%)**
2. F2	$3,84 \times 10^6$	$6,88 \times 10^3$ (99,82%)*	$3,60 \times 10^2$ (99,99%)* (94,78%)**
3. F2	$4,48 \times 10^6$	$8,04 \times 10^3$ (99,82%)*	$9,80 \times 10^2$ (99,98%)* (87,81%)**
4. F2	$1,18 \times 10^7$	$1,60 \times 10^2$ (99,99%)*	$1,80 \times 10^2$ (99,99%)* (-12,50%)**
5. F2	$8,96 \times 10^6$	$3,40 \times 10^2$ (99,99%)*	$6,00 \times 10^1$ (99,99%)* (82,35%)**
6. F2	$1,92 \times 10^6$	$2,60 \times 10^2$ (99,99%)*	0 (100%)* (100%)**
7. F2	$7,60 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
8. F2	$1,68 \times 10^6$	$1,50 \times 10^2$ (99,99%)*	$1,46 \times 10^3$ (99,91%)* (-873,33%)**
9. F2	$1,20 \times 10^7$	$2,00 \times 10^1$ (99,99%)*	$4,00 \times 10^1$ (99,99%)* (-100%)**
10. F2	$9,28 \times 10^6$	0 (100%)*	0 (100%)* (0%)**
Média	$6,50 \times 10^6$	$1,63 \times 10^3$	$3,66 \times 10^2$
Desvio padrão	$3,91 \times 10^6$	$3,09 \times 10^3$	$5,00 \times 10^2$
Mediana	$6,04 \times 10^6$	$2,10 \times 10^2$ (99,99%)*	$1,20 \times 10^2$ (99,99%)* (0%)**

(%)* → Em relação à S1.

(%)** → Em relação à S2.

Com o objetivo de testar a eficácia do azul de toluidina, foram feitas comparações intergrupos entre os resultados obtidos dos grupos do *laser* instrumentados com a ProTaper F2 (Grupo B2) e da TFD com azul de toluidina (Grupo D). Realizou-se o teste estatístico de Mann-Whitney, e não foi observada diferença estatística quando se compararam os valores obtidos na S3 ($P = 0,85$).

3.2) Irrigação com solução salina

No grupo da TFD com azul de toluidina (Grupo E), após a contagem das UFCs iniciais (S1) obteve-se um valor médio de contaminação de $2,47 \times 10^6$ (mediana de $1,20 \times 10^2$). A média da quantidade de bactérias presentes depois do PQM usando solução salina como irrigante (S2) foi $1,35 \times 10^4$ (mediana de

6,80 x 10³). Após a TFD (S3), a média das UFCs obtida foi 3,09 x 10³ (mediana de 1,18 x 10³) (Tabela 6).

A mediana da redução percentual de S2 para S1 foi 99,48%, enquanto a de S3 para S1 e a de S3 para S2 foram respectivamente 99,94% e 80,46%.

Realizada a análise estatística com o teste de Wilcoxon a 5%, verificou-se que tanto o PQM quanto PQM + TFD produziram uma redução estatisticamente significativa quando comparados com as amostras iniciais (P = 0,02 para ambas comparações), e que a TFD reduziu significativamente o número de bactérias quando comparadas com as amostras coletadas após a instrumentação (P = 0,02).

Tabela 6 - GRUPO E: Terapia fotodinâmica com azul de toluidina (irrigação com solução salina)

Amostra	S1	S2	S3
1. F2	5,12 x 10 ⁶	4,09 x 10 ⁴ (99,20%)*	5,60 x 10 ² (99,99%)* (98,63%)**
2. F2	3,00 x 10 ⁶	3,28 x 10 ³ (99,89%)*	3,50 x 10 ² (99,99%)* (89,33%)**
3. F2	4,60 x 10 ⁵	7,04 x 10 ³ (98,47%)*	1,32 x 10 ³ (99,71%)* (81,25%)**
4. F2	3,24 x 10 ⁶	3,20 x 10 ⁴ (99,01%)*	1,95 x 10 ⁴ (99,40%)* (39,06%)**
5. F2	1,60 x 10 ⁵	1,86 x 10 ⁴ (88,38%)*	2,60 x 10 ² (99,84%)* (98,60%)**
6. F2	6,00 x 10 ⁶	3,60 x 10 ³ (99,94%)*	5,30 x 10 ² (99,99%)* (85,28%)**
7. F2	6,40 x 10 ⁵	1,00 x 10 ¹ (99,99%)*	1,20 x 10 ² (99,98%)* (-1100,00%)**
8. F2	8,80 x 10 ⁵	1,18 x 10 ⁴ (98,66%)*	2,52 x 10 ³ (99,71%)* (78,64%)**
9. F2	1,80 x 10 ⁶	2,50 x 10 ² (99,99%)*	8,20 x 10 ² (99,95%)* (-228,00%)**
10. F2	5,60 x 10 ⁵	1,52 x 10 ³ (99,73%)*	1,12 x 10 ⁴ (98,00%)* (-636,84%)**
11. F2	3,52 x 10 ⁶	3,33 x 10 ⁴ (99,05%)*	7,20 x 10 ³ (99,80%)* (78,38%)**
12. F2	1,36 x 10 ⁶	6,64 x 10 ³ (99,51%)*	1,35 x 10 ³ (99,90%)* (79,67%)**
13. F2	1,68 x 10 ⁶	2,74 x 10 ⁴ (98,37%)*	1,32 x 10 ³ (99,92%)* (95,18%)**
14. F2	1,44 x 10 ⁶	4,00 x 10 ³ (99,72%)*	0 (100%)* (100%)**
15. F2	3,60 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁴ (99,44%)*	1,34 x 10 ³ (99,96%)* (93,37%)**
16. F2	6,00 x 10 ⁶	4,80 x 10 ³ (99,92%)*	1,04 x 10 ³ (99,98%)* (78,33%)**
Média	2,47 x 10 ⁶	1,35 x 10 ⁴	3,09 x 10 ³
Desvio padrão	1,95 x 10 ⁶	1,34 x 10 ⁴	5,29 x 10 ³
Mediana	1,74 x 10 ⁶	6,80 x 10 ³ (99,48%)*	1,18 x 10 ³ (99,94%)* (80,46%)**

(%)* → Em relação à S1.

(%)** → Em relação à S2.

Por meio do teste de Mann-Whitney a 5%, procedeu-se a uma comparação intergrupo dos valores de S3 obtidos, entre o grupo TFD com azul de toluidina e NaOCl como solução irrigadora (Grupo D) e o grupo TFD com azul de toluidina e solução salina como irrigante (Grupo E), comparação que revelou uma diferença estatística significativa ($P = 0,02$).

4) TFD com azul de metileno *versus* TFD com azul de toluidina

Utilizando-se o teste estatístico de Mann-Whitney a 5%, compararam-se os valores de S3 do grupo TFD com azul de metileno instrumentados com ProTaper F2 (Grupo A2) e do TFD com azul de toluidina instrumentados com ProTaper F2 (Grupo D), todos irrigados com NaOCl. Com base nos resultados obtidos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P = 0,27$).

Também não foi observada diferença estatisticamente relevante entre os grupos TFD com azul de metileno (Grupo F) e TFD com azul de toluidina (Grupo E) irrigados com solução salina ($P = 0,17$).

5) Influência do diâmetro apical

Por meio do teste estatístico Mann-Whitney com significância de 5%, não foi observada diferença estatística significativa quando comparados os valores de S2 dos grupos instrumentados com a ProTaper F4 (Grupos A1, B1, C1) com os dos instrumentados com a ProTaper F2 (Grupos A2, B2, C2, D) ($P = 0,748$), todos irrigados com NaOCl.

Com base nesses resultados, foi possível fazer a análise estatística total dos grupos, não sendo necessária a segmentação deles nos casos em que foi realizada a instrumentação com a ProTaper F4 e F2.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados dentes humanos extraídos, procurando se aproximar das condições encontradas na prática clínica.

A opção pela utilização de *E. faecalis* como modelo microbiano neste estudo se deu pela forte associação desta espécie bacteriana aos fracassos endodônticos, o que pode ser explicado por sua capacidade de sobrevivência em condições de escassez nutricional e em ausência de oxigênio, bem como por sua capacidade de penetração nos túbulos dentinários e de resistência a procedimentos e medicamentos intracanaais (SIQUEIRA *et al.*, 1997; SIREN *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2002; HAAPASALO *et al.*, 2005).

Diversos estudos avaliaram a eficácia da TFD, fazendo uso do *E. faecalis* para contaminar as amostras a serem avaliadas (CASTRO *et al.*, 2006; SOUKOS *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2006; BERGMAN *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008). Outros estudiosos, contudo, utilizaram diferentes microorganismos, como *S. intermedius* (SEAL *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, transformadas em bactérias bioluminescentes (GARCEZ *et al.*, 2007), ou ainda *S. anginosus* e *F. nucleatum* (BERGMANS *et al.*, 2008). FIMPLE *et al.* (2008), por sua vez, serviram-se de um biofilme multiespécies, com *Actinomyces israeli*, *F. nucleatum nucleatum*, *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

A cepa de *E. faecalis* empregada foi a isolada de canais radiculares no estudo de ZOLETTI *et al.* (2006), sendo, portanto, uma cepa selvagem.

Entre os estudos que utilizaram o *E. faecalis* como marcador biológico, não existe consenso sobre o período ideal de incubação, podendo este variar

de vinte e quatro horas a quatro semanas. Assim como GOMES *et al.* (2001), MENEZES *et al.* (2004) e DAMETTO *et al.* (2005), optamos por sete dias como período de incubação. Os valores obtidos com a coleta inicial, bem como as fotomicrografias das amostras contaminadas obtidas com o uso do MEV, comprovavam que esse tempo foi suficiente para promover a colonização das amostras, inclusive com a formação de biofilme nas paredes dentinárias.

Para o preparo mecânico dos canais radiculares, utilizaram-se instrumentos rotatórios de NiTi do Sistema ProTaper. Estudos não demonstram diferença estatística significativa entre as técnicas manuais e rotatórias quanto à capacidade de redução bacteriana intracanal (DALTON *et al.*, 1998, SIQUEIRA *et al.*, 1999). Apesar disso, os instrumentos rotatórios de NiTi permitem maior ampliação do canal, sem alterar seu trajeto original (SIQUEIRA *et al.*, 2002b).

O NaOCl é a solução irrigadora mais recomendada e utilizada pelos dentistas, devido não só às suas propriedades favoráveis, como eficácia antimicrobiana, mas também por sua capacidade solvente de tecidos necrosados e vivos (BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1983; 1985; AYHAN *et al.*, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2000; ESTRELA *et al.*, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2002b; BERBER *et al.*, 2006).

No entanto, não existe consenso quanto à concentração ideal a ser utilizada, variando de 0,5% até 5,25%. Estudos clínicos e laboratoriais não conseguiram demonstrar diferença significativa entre as diferentes concentrações (BYSTRÖM & SUNDQVIST 1985; SIQUEIRA *et al.*, 2000). A

propriedade antimicrobiana e a toxicidade do NaOCl são diretamente proporcionais à sua concentração (GOMES *et al.*, 2001; VIANNA *et al.*, 2004).

Segundo SIQUEIRA *et al.* (2000), o uso de grande quantidade de NaOCl e sua renovação constante poderiam manter a eficácia antimicrobiana, compensando o efeito da concentração. Baseando-se nesse princípio, a concentração de NaOCl usada nesse estudo foi de 2,5%, a exemplo de diversos outros estudos (SIQUEIRA *et al.*, 2002b; MENEZES *et al.*, 2004; VIANNA *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2007a; BERGMANS *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2008).

Os procedimentos para a coleta microbiológica descritos na literatura variam bastante. Entre os autores que estudaram a eficácia da TFD, BONSOR *et al.* (2006) utilizaram instrumentos com raspas de dentina do canal radicular para realização da coleta, enquanto SOUKOS *et al.* (2006) e FIMPLE *et al.* (2008) fizeram a análise microbiológica através da solução que extravasou do forame apical. Neste estudo, as amostras microbiológicas foram coletadas do interior do canal radicular com o auxílio de cones de papéis estéreis, segundo o procedimento da maioria dos autores que estudaram a TFD (SEAL *et al.*, 2002; GARCEZ *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006; BERGMANS *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2008).

Após a coleta das amostras, SOUKOS *et al.* (2006) e BERGMAN *et al.* (2008) realizaram o plaqueamento em ágar-sangue. GARCEZ *et al.* (2006), no entanto, o fizeram em ágar BHI, enquanto FONSECA *et al.* (2008), em ágar bile azida. No presente estudo, para o plaqueamento das amostras, utilizou-se a placa de ágar *Mitis-salivarius*, pelo fato de ela só permitir o crescimento de

Streptococcus e alguns *Enterococcus*, dentre eles o *E. faecalis*. Assim, reduz-se o risco de se obter um falso positivo por crescimento de espécies bacterianas contaminantes (SIQUEIRA *et al.*, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2002b).

O protocolo para a realização da TFD ainda não está bem definido, existindo diversas variáveis, entre as quais o tipo e a concentração do FS a ser usado e os parâmetros do *laser*, bem como o tempo e a técnica de aplicação do FS e do *laser*. Os FS mais utilizados pelos autores que estudaram a TFD foram o azul de metileno (SOUKOS *et al.*, 2006; FIMPLE *et al.*, 2008), o azul de toluidina (SEAL *et al.*, 2002; BONSOR *et al.*, 2006a; WILLIAMS *et al.*, 2006; BERGMANS *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008) e os derivados do PEI-ce6 (SOUKOS *et al.*, 1998; GARCEZ *et al.*, 2007; GARCEZ *et al.*, 2008). No presente estudo, foram testadas a eficácia de dois corantes: o azul de metileno e o azul de toluidina.

Na literatura, encontramos a utilização de diversas concentrações do azul de metileno, variando de 6,25 µg/ml a 25 µg/ml, bem como do azul de toluidina, variando de 12,5 µg/ml a 100 µg/ml. Os dois FS empregados neste estudo foram utilizados na mesma concentração de 15 µg/ml, com o objetivo de padronizar o experimento.

A fonte de radiação empregada foi o *Twin laser*, um *laser* diodo de baixa potência da MMOptics. Esse aparelho emite uma luz em dois intervalos espectrais: o visível (luz vermelha) e o infravermelho, com 660 nm e 780 nm de comprimento de onda respectivamente. Para esse experimento, foi aplicado o

laser vermelho do *Twin laser*, que possui um meio ativo semiconductor de GaAlAs e potência máxima de 40 mW.

GARCEZ *et al.* (2007) realizaram um experimento com a luz vermelha (660 nm de comprimento de onda) do *Twin laser* e o PEI-ce6 como FS visando avaliar a eficácia da TFD em dentes contaminados por bactérias bioluminescentes. Os tempos de irradiação foram de um, dois, três e quatro minutos, e a contaminação foi mensurada através das imagens de bioluminescência obtidas após cada período de aplicação do *laser*. Observaram os autores que a redução da contaminação é crescente até a aplicação de 9,6 J de energia, que ocorre no tempo de quatro minutos, quando se atinge um limiar em que o aumento do tempo não provoca maior redução da contaminação.

Baseando-se no protocolo proposto por GARCEZ *et al.* (2008), que também utilizaram o *Twin laser*, foi estabelecido em dois minutos o tempo de pré-irradiação durante o qual o FS é deixado no canal, e em quatro minutos o tempo de aplicação da luz do *laser*, resultando numa dosagem total de 240 J/cm².

SEAL *et al.* (2002) avaliaram a eficácia da TFD, com diversas combinações de tempo e de concentração do azul de toluidina, comparando-a à terapia endodôntica convencional, com NaOCl a 3% em dentes contaminados por *S. intermedius*. Observou-se que na TFD a combinação do azul de toluidina a 100 µg/ml no período de seiscentos segundos alcançou maior redução de bactérias cultiváveis, porém essa redução não foi superior à constatada no grupo em que se usou o NaOCl a 3% por dez minutos. Esse

achado contrasta com as descobertas de GARCEZ *et al.* (2006), que observaram que a TFD com o azuleno como FS foi significativamente mais eficaz na redução da contagem bacteriana em dentes contaminados por *E. faecalis* do que o NaOCl a 0,5% deixado no canal por trinta minutos. Essa diferença pode ser explicada pelo uso da fibra ótica por GARCEZ *et al.* (2006), uma vez que esta pode permitir que a luz seja distribuída de forma homogênea no interior do canal radicular, melhorando assim a fotorreação.

É por isso que, assim como em outros estudos, a fibra ótica foi utilizada acoplada ao bico da caneta do *laser*, para que a luz irradiasse no interior do canal radicular aproximando-se o máximo possível do terço apical (BONSOR *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2006; SOUKOS *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007; BERGMANS *et al.* 2008; FIMPLE *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2008).

Segundo o fabricante, a fibra ótica (MMOptics) empregada é plástica e constituída de núcleo e capa, com um comprimento total de 55 mm e diâmetro na ponta de 0,3 mm. Na prática, ao medirmos com uma régua calibradora (Dentsply-Maillefer), observou-se grande variação desse diâmetro final. Foram selecionadas as fibras que realmente apresentavam 0,3 mm de diâmetro final, para que estas pudessem alcançar o terço apical das amostras preparadas com os instrumentos rotatórios ProTaper F2 ou F4, que geram diâmetros apicais finais correspondentes a instrumentos tipo K, números 25 e 40 respectivamente.

De acordo com o protocolo proposto por GARCEZ *et al.* (2006; 2007; 2008), a fibra ótica foi introduzida o mais apicalmente possível, e depois

realizados movimentos espiralados da porção apical para a cervical, de modo a assegurar difusão uniforme de luz dentro do canal radicular.

Após a análise estatística dos resultados, observou-se que, nos grupos irrigados com NaOCl, a TFD com o azul de metileno e com o azul de toluidina apresentaram um efeito adicional ao PQM na redução da contagem de *E. faecalis* ($P = 0,05$ para os dois grupos), assim como nos grupos irrigados com solução salina ($P = 0,02$ no grupo TFD com azul de toluidina e $P = 0,05$ no com azul de metileno).

Assinale-se que o presente estudo, distinguindo-se da maioria dos anteriores, avaliou o efeito adicional da TFD sobre o PQM, e não apenas a eficácia da TFD.

Ao testarem a eficácia da TFD com o azul de metileno como agente FS, SOUKOS *et al.* (2006) e FIMPLE *et al.* (2008) concluíram que essa terapia poderia ser um eficaz auxiliar no tratamento endodôntico convencional. FIMPLE *et al.* (2008), por seu turno, observaram uma redução da infecção de 80% em dentes contaminados por um biofilme multiespécies, enquanto SOUKOS *et al.* (2006) obtiveram uma redução de 97% em dentes contaminados por *E. faecalis*.

Resultados semelhantes foram observados nos estudos *in vitro* em que o azul de toluidina foi aplicado como FS. WILLIAMS *et al.* (2006) observaram que TFD com azul de toluidina foi eficaz em reduzir a contagem bacteriana em dentes contaminados por *S.intermedius*, e que o aumento da dose de energia do *laser* aplicada e do tempo pré-irradiação não levaram a maior redução dessa contagem. BERGMANS *et al.* (2008) encontraram redução de 93,8% em

dentes contaminados com *S. anginosus*, de 88,4% em dentes contaminados com *E. faecalis* e de 98,5% nos contaminados por *F. nucleatum*, o que significou uma redução estatisticamente significativa em relação à amostra inicial. FONSECA *et al.* (2008) encontraram redução da contagem bacteriana de dentes contaminados por *E. faecalis* de 99,9%. No entanto, SEAL *et al.* (2002) concluíram que a irrigação com NaOCl a 3% foi mais eficaz que a TFD, o que pode ser explicado pela não utilização da fibra ótica para a distribuição uniforme da irradiação.

No estudo *in vitro* de GARCEZ *et al.* (2007), também foi analisada a eficácia adicional da TFD com o PEI-ce6 como FS em dentes contaminados com bactérias bioluminescentes. Encontraram uma redução de 90% da terapia endodôntica e de 95% da TFD. A combinação dos tratamentos reduziu a bioluminescência em mais de 98%, e o crescimento bacteriano após vinte e quatro horas de tratamento realizado foi significativamente menor do que a terapia endodôntica e TFD sozinhos. Mas, para realização desse experimento, foram utilizados apenas dez dentes que foram esterilizados e recontaminados antes de cada tratamento. A reutilização dos dentes fez com que, quando foram executados os procedimentos do grupo de terapia combinada, as amostras já haviam sido previamente instrumentadas para a execução dos procedimentos do grupo de tratamento endodôntico convencional. Assim, a instrumentação feita no grupo de terapia combinada não apresentou nenhum efeito prático.

Os resultados do presente estudo demonstram um efeito adicional ao PQM na redução da contagem bacteriana nos grupos controle de azul de

metileno e de *laser* ($P = 0,05$; $P = 0,048$ respectivamente), o que coincide com a observação de SOUKOS *et al.* (2006): redução de 83,2% no grupo controle de azul de metileno a 25 $\mu\text{g/ml}$ ($P = 0,009$) e de 56,6% no grupo controle de *laser* ($P = 0,03$) em dentes contaminados por *E. faecalis*. SEAL *et al.* (2002), ao contrário, observaram um efeito limitado nos grupos controles de *laser* e de azul de toluidina a 12,5, a 25, a 50 e a 100 $\mu\text{g/ml}$ em dentes contaminados por *S. intermedius*, assim como BERGMANS *et al.* (2008), que também não observaram efeito significativo do *laser* e do azul de toluidina a 12,7 $\mu\text{g/ml}$ sobre a carga bacteriana de dentes contaminados por *S. anginosus*, *E. faecalis* e *F. nucleatum*. Do mesmo modo, FIMPLE *et al.* (2008) também não observaram efeito antibacteriano do *laser* em dentes contaminados por um biofilme multiespécies, verificando uma eficácia reduzida nos grupos de azul de metileno a 25 $\mu\text{g/ml}$ dissolvido em meio BHI (redução de 25%) e PBS (redução de 34%), mas sem diferença significativa em relação ao grupo controle onde não foram utilizados o *laser* nem o FS. Em tubos de ensaio com uma suspensão de *E. faecalis*, GARCEZ *et al.* (2006), por sua vez, não observaram efeito bactericida da pasta de azuleno e do *laser*, o mesmo ocorrendo com WILLIAMS *et al.* (2006), que também não observaram redução significativa nos grupos controle de azul de toluidina a 10 e a 20 $\mu\text{g/ml}$ e *laser* em teste em tubos de ensaio com suspensões planctônicas de *S. intermedius*, *P. micros*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*.

No presente estudo, a redução significativa dos procedimentos pós-PQM, nos grupos controle do *laser* ou do azul de metileno, em relação à contaminação pós-PQM, explica-se pela obtenção de muitas amostras com

cultura negativa já após o PQM, o que reduziu a quantidade de amostras em que foi realmente avaliada a redução adicional do *laser* ou do azul de metileno.

Ao se comparar os valores de S3 obtidos no grupo TFD com azul de metileno ou azul de toluidina e NaOCl como solução irrigadora com os obtidos no grupo TFD com azul de metileno ou azul de toluidina e solução salina como irrigante, observou-se uma diferença altamente significativa ($P < 0,001$ e $P = 0,018$ respectivamente). Esses resultados podem ser justificados pela maior redução da contaminação já no PQM nos grupos irrigados por NaOCl, o que diminui a eficácia adicional da TFD.

Nos poucos estudos *in vivo*, também se avaliou a eficácia adicional da TFD. BONSOR *et al.* (2006) realizaram o preparo mecânico com instrumentos rotatórios de NiTi do sistema Profile e irrigação alternada de NaOCl a 2,25% e ácido cítrico a 20%. Em seguida, realizaram-se a TFD com azul de toluidina deixado no canal por um minuto, e com o *laser* com 100 mW de potência por dois minutos. Fez-se apenas uma análise quantitativa dos resultados, em que se observou que, dos quatro canais que ainda estavam contaminados após o PQM, três obtiveram cultura negativa após a TFD.

Já GARCEZ *et al.* (2008) realizaram a TFD com o PEI-ce6 como agente FS, após PQM com instrumentos manuais, NaOCl a 2,5% e peróxido de hidrogênio a 3% como soluções irrigadoras, e após a remoção da *smear layer* com EDTA a 17%. Depois da análise estatística dos resultados, concluíram os autores que a redução total do PQM com a TFD foi significativamente maior do que a obtida exclusivamente pelo PQM. Concluíram ainda que, na segunda consulta em que foi realizada a TFD, esta foi ainda mais eficaz que na primeira,

o que pode ser explicado provavelmente porque a recolonização se dá com microorganismos em biofilmes menos complexos, quando comparada com a infecção inicial.

As comparações entre os resultados do presente estudo e os dos demais em que foi realizada a TFD são difíceis, porque cada autor utiliza diferentes tipos e concentrações do FS, bem como distintos parâmetros do *laser*, de tempo e de técnica de aplicação do FS e do *laser*.

Nossos resultados sugerem que a TFD pode ser utilizada como importante auxiliar no tratamento endodôntico convencional na desinfecção do SCR. No entanto, novos estudos ainda precisam ser desenvolvidos, visando à busca de parâmetros de luz e de FS ideais para a eliminação dos microorganismos do interior do SCR.

CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada pode-se concluir:

1º - a terapia fotodinâmica utilizando o *laser* diodo com azul de metileno ou com azul de toluidina apresenta um efeito antibacteriano adicional ao PQM;

2º - não houve diferença na eficácia antibacteriana entre:

- a terapia fotodinâmica com azul de metileno e a terapia fotodinâmica com azul de toluidina;
- a terapia fotodinâmica com azul de metileno e a aplicação exclusiva do *laser* e do azul de metileno;
- a terapia fotodinâmica com azul de toluidina e a aplicação exclusiva do *laser*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Sauders WP (2002). The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an *in vitro* study. *J Endod* 28: 163-167.

Ayhan H, Sultan N, Çiral M, Ruhi MZ, Bodur H (1999). Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* 32: 99-102.

Bagnato VS (2001). Os fundamentos da luz laser. *Física na Escola* 2: 4-9.

Baumgartner JC, Johal S, Marshall JG (2007). Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation. *J Endod* 33: 48-51.

Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 39: 10-17.

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts (2008). Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens *ex vivo*. *Int Endod J* 41: 227-239.

Bonsor SJ, Nichol R, Seid TMS, Pearson GJ (2006a). Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An *in vivo* study). *Br Dent J* 200: 337-341.

Bonsor SJ, Nichol R, Seid TMS, Pearson GJ (2006b). An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J* 201: 101-105.

Byström A, Sundqvist G (1981). Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89: 321-328.

Byström A, Sundqvist G (1983). Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 55: 307-312.

Byström A, Claesson R, Sundqvist G (1985). The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canal. *Endod Dent Traumatol* 1: 170-175.

Byström A, Sundqvist G (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 case of endodontic therapy. *Int Endod J* 18: 35-40.

Carson KR, Goodell, McClanahan (2005). Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod* 31: 471-473.

Castro MR, Brasil CO, Khouri S, Arisawa EAL (2006). *Avaliação in vitro da terapia fotodinâmica em suspensão de Enterococcus faecalis*. X Encontro latino americano de iniciação científica e VI Encontro latino americano de pós-graduação – Universidade do Vale do Paraíba.

Colak M, Evcil S, Bayindir YZ, Yigit N (2005). The effectiveness of three instrumentation techniques on the elimination of *Enterococcus faecalis* from a root canal: an *in vitro* study. *J Contemp Dent Pract* 6: 94-106.

Cook J, Nandakumar R, Fouad AF (2007). Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod* 33: 690-692.

Chu FCS, Tsang CSP, Chow TW, Samaranayake LP (2005). Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod* 31: 424-429.

Dalton C, Ørstavik D, Phillips C, Pettiet M, Trope M (1998). Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 24: 763-767.

Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2005). *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99: 768-772.

Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül K (2004). Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: *in vivo* study. *J Endod* 30: 84-87.

Estrela CRA, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pécora JD (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 13: 113-117.

Estrela CRA, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pécora JD (2003). Control of microorganisms *in vitro* by endodontic irrigants. *Braz Dent J* 14: 187-192.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Fidgor D (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35: 221-228.

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC (2005). Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 38: 372-380.

Fimble JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner ACR, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS (2008). Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod* 34: 728-734.

Fonseca MB, Júnior POT, Pallota RC, Filho HF, Denardin OVP, Rapoport A, Dedivitis RA, Veronezi JF, Genovese WJ, Ricardo ALF (2008). Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg* 26: 209-213.

Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS (2006). Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102: e93-e98.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR (2007). Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 39: 59-66.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS (2008). Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 34: 138-142.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 34:424-428.

Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ (2003). Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine dentine *in vitro*. *Int Endod J* 36: 267-275.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM (2005). Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics* 10: 77-102.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20: 340-349.

Konopka K, Goslinski T (2007). Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86: 694-707.

Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL (2007). The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 33: 28-30.

Law A, Messer H (2004). An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod* 30: 689-694.

Lin Y, Mickel AK, Chogle S (2003). Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 29:565-566.

Lizarelli RFZ (2005). *Protocolos clínicos odontológicos*. 2ª edição. São Paulo: Bons Negócios Editora.

Lopes HP, Siqueira JF Jr, Elias CN (2004a). Preparo químico-mecânico dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medisi, 419-480.

Lopes HP, Siqueira JF Jr, Elias CN (2004b). Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medisi, 535-579.

McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A (2005). Reduction of intracanal bacteria using GR rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod* 31: 359-363.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG (2004). *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 37: 311-319.

Miller WD (1894). An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos* 36: 505-528.

Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G (1981). Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 89: 475-484.

Önçağ Ö, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D (2003). Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 36: 423-432.

Peters LB, Winkelhoff AJV, Buijs JF, Wesselink PR (2002). Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J* 35: 13-21.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003). Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 36: 1-11.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB (2004). Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israeli*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 37: 438-446.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y (2007). Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral microbiol Immunol* 22: 19-23.

Sassone LM, Fidel RAS, Dias M, Hirata R Jr (2003). Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J* 14: 99-102.

Schilder H (1967). Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am* 11: 723-744.

Seal GJ, NG Y-L, Bhatti M, Gulabivala K (2002). 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* 35: 268-274.

Sedgley CM, Nagel AC, Hall, Applegate B (2005). Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging *in vitro*. *Int Endod J* 38: 97-104.

Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M (2000). Reduction of intracanal bacterial using nickel-titanium rotary instrumentation and varios medications. *J Endod* 28: 751-755.

Siqueira JF Jr (2001). Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 31: 1-10.

Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M (1997). Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. *Int Endod J* 30:279-282.

Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FAC, Lopes HP, Uzeda M (1999). Mechanical reduction of the bacterial population in the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* 25: 332-335.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5% and 5.25% Sodium hypochlorite. *J Endod* 26:331-334.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP (2002a). Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93: 174-178.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SRDL, Lima KC, Magalhães FAC, Uzeda M (2002b). Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 28: 181-184.

Siqueira JF Jr, Lopes HP (2004). Medicação intracanal. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi, 581-618.

Siqueira JF Jr, Lopes HP, Elias CN (2004a). Obturação do sistema de canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi, 645-691.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FRF, Santos KRN (2004b). Selected endodontics pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. *J Endod* 30: 638-643.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP (2004c). Microbiologia endodôntica. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi, 223-279.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP (2004d). Tratamento de dentes despolpados (necropulpectomia). In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi, 289-306.

Siqueira JF Jr, Rôças IN (2005). Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 31: 488-498.

Siqueira JF Jr, Magalhães KM, Rôças IN (2007a). Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod* 33: 667-672.

Siqueira JF Jr, Paiva SSM, Rôças IN (2007b). Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod* 33: 541-547.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC (2007c). Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104: 122-130.

Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ (1997). Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 30: 91-95.

Sjögren U, Fidgor D, Persson S, Sundqvist G (1997). Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30: 297-306.

Sjögren U, Fidgor D, Spangberg I, Sundqvist G (1991). The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 24 :119-125.

Soukos NS, Ximenes-Fyvie LA, Hamblin MR, Socransky SS, Hasan T (1998). Targeted antimicrobial photochemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2595-2601.

Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG (2000). Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. *Pharm Res* 17: 405-409.

Soukos NS, Som S, Abernethy AD, Ruggiero K, Dunham J, Lee C, Doukas AG, Goodson JM (2005). Phototargeting oral black-pigmented bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1391-1396.

Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP (2006). Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 32: 979-984.

Souza CAS, Teles RP, Souto R, Chaves AE, Colombo APV (2005). Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *J Endod* 31: 79-83.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K (2001). An *in vitro* study of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 34: 300-307.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 32: 93-98.

Sundqvist G (1976). *Bacteriological studies of necrotic dental pulps*. Dissertação de Mestrado. Umëa, Sweden: University of Umëa, 94p.

Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ (2004). *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: 79-84.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G (2006). *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 39: 484-492.

Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ (2006). Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent* 34: 363-371.

Zehnder M (2006). Root canal irrigants. *J Endod* 32: 389-398.

Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR (2006). Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod* 32: 722-726.

ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estácio de Sá

Andamento do projeto - CAAE - 0182.0.308.000-08**Título do Projeto de Pesquisa**

Análise ex vivo da eficácia de métodos alternativos na redução bacteriana em canais radiculares.

Situação**Data Inicial no CEP****Data Final no CEP****Data Inicial na CONEP****Data Final na CONEP**

Aprovado no CEP

16/10/2008 13:41:35

24/10/2008 11:39:07

Descrição**Data****Documento****Nº do Doc****Origem**

1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet

18/09/2008 10:26:25

Folha de Rosto

FR219798

Pesquisador

3 - Protocolo Aprovado no CEP

24/10/2008 11:39:07

Folha de Rosto

0248

CEP

2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)

16/10/2008 13:41:35

Folha de Rosto

0182.0.308.000-08

CEP

Fluxograma do experimento

Esquema das coletas