

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Efeito da Terapia Fotodinâmica em canais radiculares
contaminados com *Enterococcus faecalis***

Rodrigo Rodrigues Amaral

Belo Horizonte

2009

Rodrigo Rodrigues Amaral

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM CANAIS RADICULARES
CONTAMINADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínicas Odontológicas – Ênfase em Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Frank Ferreira Silveira

Belo Horizonte

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

A485e Amaral, Rodrigo Rodrigues
Efeito da terapia fotodinâmica em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* / Rodrigo Rodrigues Amaral. Belo Horizonte, 2009.
58f. : il.

Orientador: Frank Ferreira Silveira
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Endodontia. 2. Enterococcus faecalis. 3. Fotoquimioterapia 4. Hipoclorito de sódio.
I. Silveira, Frank Ferreira. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314.18

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos grandes amores de minha vida, minha esposa Silvana e meu filho Thiago.

À minha Mãe, Maria Célia, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, com seu apoio e carinho.

Ao meu Pai, Sebastião Fábio, meu grande amigo e ídolo profissional da Endodontia.

Aos meus irmãos, Fabrício, Fabíola e Alessandra.

Aos meus familiares, que acompanharam de perto toda minha caminhada em busca do meu objetivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante em minha vida em todos os momentos difíceis e felizes.

Ao meu orientador Professor Dr. Frank Ferreira Silveira, por todo apoio, dedicação, ensinamento e pela sua conduta ética e profissional.

À professora Dra. Maria Eugênia Alvarez Leite, por ter sido fundamental na execução desta pesquisa. Todas as palavras ainda seriam poucas para expressar minha gratidão por todo seu apoio, incentivo e colaboração.

Ao professor Dr. Eduardo Nunes, por toda sua colaboração e pelas sugestões construtivas na formação de um mestre.

À professora Dra. Maria Ilma de Souza Gruppioni Côrtes, por todo carinho, ensinamento e acolhimento ao longo desta jornada.

Ao professor Dr. Roberval de Almeida Cruz, por todo conhecimento, dedicação e ensinamento.

Ao professor Dr. Janir Alves Soares, por toda sua colaboração com esta pesquisa.

Ao professor Dr. José Claudio Faria Amorim, pelas suas valiosas informações e por toda sua participação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcus Vinícius Lucas Ferreira, pelo Chimiolux cedido e pelas informações relevantes sobre os parâmetros da luz.

Ao professor Ubiratan Barros de Melo, diretor do Instituto de Ciências Biológicas da Saúde da Puc Minas.

Ao professor Dr. Luiz de Macedo Farias, diretor do laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios da Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos alunos da iniciação científica, Daniel Guião, Rafaela Reis da Silva e Suelen Cristina Barbosa Nunes, que foram exemplares no apoio para execução desta pesquisa.

Aos funcionários técnicos do laboratório de Microbiologia, Maria José Sebastião e Walter Rodrigues dos Santos, cujo apoio logístico foi de inigualável importância.

A todos os funcionários da secretária, especialmente Silvânia e Angélica.

À professora Dra. Cynthia Lopes Ferreira, pela solução de glutaraldeído cedido e pelas fotografias histológicas das lâminas de *E. faecalis*.

Ao professor Dr. Martinho Campolina Rebello Horta, pela análise estatística da pesquisa.

Ao Sr. Rubens Miranda, técnico do laboratório de histologia da Puc Minas, pela colaboração na manipulação da solução de glutaraldeído a 2.5% em tampão fosfato.

À Luzia Joana Vilela, e a todas as funcionárias da Central de Esterilização da Puc Minas, por todo apoio na esterilização do material de pesquisa.

À Helenice Rêgo Cunha, pela elaboração da ficha catalográfica.

Ao amigo Márcio Andrade Silveira da Silva, pela elaboração do abstract.

À MMOPTICS (São Paulo), pela aferição do aparelho Twin Flex Laser utilizado na pesquisa e ao Renato Luz Veloso Bosco, pela fibras ópticas cedidas.

Aos colegas de Mestrado, por toda amizade e convivência saudável ao longo destes dois anos.

Ao grande amigo e colega, Adalberto Ramos Vieira, um dos incentivadores por esta caminhada em busca do conhecimento. Amigos como você todos gostariam de ter.

À minha irmã, Alessandra Rodrigues Amaral, por todo seu apoio com meu filho Thiago, nos momentos de minha ausência.

Ao meu Pai, Sebastião Fábio, pelo incentivo e apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada profissional.

À minha mãe, Maria Célia, por todo carinho e preocupação com meus passos ao longo desta vida.

À minha esposa Silvana e meu filho Thiago, presenças fundamentais em minha vida. Meu agradecimento por todo apoio, carinho e compreensão pelos momentos ausentes e muitas vezes impacientes de minha parte. Todo esforço é por vocês e para vocês. Muito obrigado!

“BOM MESMO É IR À LUTA COM DETERMINAÇÃO, ABRAÇAR A VIDA E VIVER COM PAIXÃO, PERDER COM CLASSE E VIVER COM OUSADIA, POIS O TRIUNFO PERTENCE A QUEM SE ATREVE E A VIDA É MUITO BELA PARA SER INSIGNIFICANTE.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Pesquisas recentes utilizando a Terapia Fotodinâmica (PDT) têm sugerido que a mesma pode ser um coadjuvante da terapia endodôntica com significativa redução microbiana. O microrganismo *Enterococcus faecalis* tem sido a espécie mais prevalente em casos de insucesso endodôntico, sendo resistente à maioria dos medicamentos intracanal e ao preparo químico-mecânico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica na redução microbiana em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. Foram utilizados 30 dentes de humanos, recém extraídos, unirradiculados, divididos em 2 grupos experimentais e dois grupos controle, sendo que outro grupo com 2 dentes foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura para verificar a presença de biofilme no canal radicular. O microrganismo indicador *Enterococcus faecalis* foi inoculado nos espécimes por um período de 21 dias. No grupo 1 (n=10) foi realizado o preparo químico-mecânico utilizando como solução irrigadora o NaOCl a 5.25% e no grupo 2 (n=10) de forma idêntica ao grupo 1, seguido de PDT no final do preparo. Os grupos 3 e 4 (n=4) foram os grupos controle positivo e negativo. Para realização da PDT foi utilizado à associação do fotossensibilizador azul de metileno 0.005 % a um laser de diodo em baixa intensidade emitindo no vermelho com comprimento de onda de 660 nm e potência de 40 mW, durante 180 segundos, totalizando 1,8 J de energia em área de spot. Foi utilizada uma fibra ótica com 300 µm acoplada ao laser diodo, a qual foi inserida no interior do canal. Foram obtidas amostras microbiológicas antes da instrumentação, imediatamente após e 72 horas pós-instrumentação. As unidades formadoras de colônias crescidas e a turbidez do meio foram analisadas, os dados obtidos tabulados e analisados estatisticamente. Os resultados evidenciaram melhor redução microbiana quando utilizado a irrigação com NaOCl a 5.25% associado à aplicação da PDT.

Palavras-Chave: *Enterococcus faecalis*. Hipoclorito de sódio. Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

Recent researches using the Photodynamic Therapy (PDT) have suggested that it can be an endodontic therapy support with meaningful microbial reduction. The *Enterococcus faecalis* microorganism has been the most prevailing species in cases of endodontic treatment failure, as it is resistant to most of the intracanal medication as well as to the chemical-mechanical preparation. This present study aims at evaluating the photodynamic therapy effect on the microbial reduction in root canals that are infected with *Enterococcus faecalis*. 30 recently extracted, single radicated human teeth were used, divided into 2 experimental groups and 2 control groups; furthermore, another group with 2 teeth was evaluated through electronic microscopy sweeping to verify the biofilm presence in the radicular canal. The indicator microorganism *Enterococcus faecalis* was inoculated into the specimens for a 21-day period. In group 1 (n=10), the chemical-mechanical preparation was carried out by using NaOCl at 5.25% as an irrigating solution, and likewise in group 2 (n=10), followed by PDT at the end of the preparation. Groups 3 and 4 (n=4) were the positive and negative controls, respectively. An association of the methylene blue photosensitizer at 0.005% to a diode laser at low intensity emitting at red, with wave length of 660 nm and 40 mW of energy power during 180 seconds were used to perform the PDT. Some 300 µm fiber optics was coupled to the laser diode and it was inserted into the canal. Some microbiological samples were collected before the instrumentation, right after it and 72 hours after it (post-instrumentation). The units that formed grown colonies and the turbidity of the medium were analyzed, the data obtained were tabled and statistically. Based upon the results, the conclusion was that NaOCl at 5.25% irrigation as well as the PDT application are important supporters to the microbial reduction.

Key words: *Enterococcus faecalis*. Photodynamic Therapy. Sodium hypochlorite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Unidade experimental.....	21
Figura 2- Esterilização por óxido de etileno.....	21
Figura 3- Inoculação microbiana.....	23
Figura 4- Frasco plástico estéril.....	23
Figura. 5 A- <i>E. faecalis</i> nas paredes dentinárias- MEV 7200 X.....	24
Figura 5 B- <i>E. faecalis</i> no interior dos túbulos dentinários - MEV 7200X.....	24
Figura 6- Aplicação do laser com fibra óptica.....	25
Figura 7- <i>E. faecalis</i> corado pelo método de Gram.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Unidade Formadora de Colônias- Grupo controle positivo.....	27
Tabela 2- Unidade Formadora de Colônias- Grupo experimental NaOCl 5.25%...	28
Tabela 3- Unidade Formadora de Colônias- Grupo experimental NaOCl 5.25%, seguido de PDT.....	28
Tabela 4- Turbidez do meio- Grupo controle negativo.....	29
Tabela 5- Turbidez do meio- Grupo controle positivo.....	29
Tabela 6- Turbidez do meio- Grupo experimental NaOCl 5.25%.....	30
Tabela 7- Turbidez do meio- Grupo experimental NaOCl 5.25%, seguido de PDT.....	30
Tabela 8- Valores médios da avaliação de UFC (Log10).....	31
Tabela 9- Valores médios da avaliação da turbidez do meio.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético

LASER - Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

NaOCl - Hipoclorito de sódio

PDT - Terapia Fotodinâmica

SCR – Sistema de canais radiculares

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

mL - Mililitro

mm - Milímetro

% - Percentagem

°C - Grau centígrado

- Número

µm – Micrometro

pH - Potencial hidrogeniônico

nm - Nanômetros

J- Joules

mW – Miliwatts

cm² - Centímetro quadrado

SUMÁRIO

1. ARTIGO I - EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM <i>E. FAECALIS</i>	17
1.1 Introdução.....	18
1.2 Material e métodos.....	20
1.3 Resultados.....	27
1.4 Discussão.....	32
1.5 Conclusões.....	37
1.6 Referências.....	38
2. ARTIGO II - UTILIZAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ENDODONTIA: REVISÃO DE LITERATURA	42
2.1 Referências.....	54
3. ANEXOS.....	56

OBJETIVOS DO ESTUDO

OBJETIVO GERAL :

Avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*.

OBJETIVO ESPECÍFICO :

Avaliar a redução microbiana quantitativa e qualitativa em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*, utilizando ou não a Terapia Fotodinâmica.

LISTA DE ARTIGOS

Esta dissertação gerou as seguintes propostas de artigos:

I: Efeito da Terapia Fotodinâmica em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*

(A ser submetido à Revista: Internacional Endodontic Journal)

II: Utilização da Terapia Fotodinâmica na Endodontia: Revisão de Literatura

(A ser submetido à Revista da Faculdade de Odontologia Universidade de Passo fundo)

ARTIGO I

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA EM CANAIS RADICULARES
CONTAMINADOS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

**EFFECT OF PHOTODYNAMIC THERAPY IN ROOT CANALS
INFECTED WITH *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a endodontia evoluiu substancialmente com o desenvolvimento e adoção de novas tecnologias e materiais, facilitando o trabalho do endodontista e diminuindo o tempo para execução do tratamento endodôntico. Apesar disto, a maioria das falhas ou insucessos endodônticos, está relacionada com a persistência de microrganismos que resistiram ao preparo químico-mecânico ou a medicação intracanal (Siqueira & Rôças 2008).

Abrigados na privilegiada anatomia do sistema de canais radiculares (SCR), os microrganismos não podem ser alcançados pelas defesas do hospedeiro ou pelo uso sistêmico de antibióticos. A eliminação microbiana se dá por meio da ação mecânica dos instrumentos e irrigação e da ação antimicrobiana das soluções irrigadoras e medicação curativa intracanal. Os estudos demonstram que o preparo químico-mecânico com solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações não elimina completamente todas as bactérias do SCR e cerca de 40% a 60% dos canais são positivos para a presença bacteriana (Byström & Sundqvist 1985, Sjögren *et al.* 1997, Siqueira *et al.* 2007).

O sucesso do tratamento endodôntico é significativamente influenciado pela presença bacteriana no momento da obturação (Sjögren *et al.* 1997, Waltimo *et al.* 2005).

Para causar doença persistente, a adaptação ao novo ambiente é crucial para os microrganismos porque ocorre uma drástica redução nos nutrientes disponíveis. Os microrganismos podem adquirir nutrientes remanescentes de tecido necrótico localizados em istmo, irregularidades, túbulos dentinários, ramificações e áreas da raiz não afetadas pela instrumentação e irrigação (Walton 1976, Siqueira *et al.* 1997). Infiltração coronária ou apical pode manter a fonte de nutrientes para bactérias remanescentes.

O microrganismo *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) tem sido a espécie mais prevalente em casos de insucesso endodôntico. Peciulien *et al.* (2000) isolaram este microrganismo em 70% dos casos que apresentavam fracasso do tratamento endodôntico. Este microrganismo é resistente à maioria dos medicamentos intracanal, inclusive ao hidróxido de cálcio, tolerando um pH de até 11,5 (Siqueira & Lopes 1999),

podendo crescer como uma monoinfecção, sendo sua erradicação extremamente dificultada por métodos convencionais. O *E. faecalis* tem a capacidade de recuperar-se de um período prolongado de escassez de nutrientes, com baixa atividade metabólica, em canais radiculares tratados, e até mesmo florescer quando a fonte de nutrientes é restabelecida, mantendo sua viabilidade por um período de 12 meses. Sua presença no momento da obturação do canal radicular pode prover infecção subsequente por um longo prazo (Figdor *et al.* 2003, Sedgley *et al.* 2005). É um microrganismo anaeróbio facultativo, sendo um saprófita componente da microbiota intestinal. Raramente é encontrado em infecções endodônticas primárias, no entanto é a espécie frequentemente isolada nos casos de insucesso do tratamento endodôntico. Não é um microrganismo residente da microbiota da cavidade oral indicando que uma infecção exógena foi responsável pela contaminação do SCR, sobrevivendo após o preparo químico-mecânico e a obturação do canal radicular (Siren *et al.* 1997, Sundqvist *et al.* 1998).

A Terapia Fotodinâmica, também conhecida como PDT, acrônimo de *Photodynamic Therapy*, surge como uma promissora terapia antimicrobiana. Envolve a utilização de um fotossensibilizador (corante), que é ativado pela luz de um específico comprimento de onda na presença de oxigênio. A transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio disponível resulta na formação de espécies tóxicas de oxigênio, conhecido como oxigênio singlete e radicais livres. Estes são espécimes químicos altamente reativos que danificam proteínas, lípedes, ácidos nucleicos e outros componentes celulares microbianos (Konopka & Goslinski, 2007).

Pesquisas recentes utilizando a PDT (Silva Garcez *et al.* 2006, Soukos *et al.* 2006, Garcez *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2008, Garcez *et al.* 2008) têm sugerido que a mesma pode ser utilizada como um coadjuvante do tratamento endodôntico, com uma significativa redução microbiana, destruindo microrganismos remanescentes no interior do SCR após preparo químico-mecânico convencional. Não há desenvolvimento de resistência dos microrganismos, sendo uma técnica de fácil rápida aplicação clínica, podendo ser utilizada em tratamentos endodônticos realizados em sessão única ou múltiplas sessões, complementando a antissepsia do SCR.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica na redução microbiana em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* em um estudo comparativo *in vitro*.

MATERIAL E METÓDOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa PUC Minas e possui registro CAAE – 0185.0.213.000-08.

Foram utilizados 30 dentes unirradiculados humanos, extraídos por motivos diversos, doados de forma livre e espontânea (com termo de consentimento devidamente preenchido). Os dentes foram radiografados, sendo descartados para a amostra os que apresentavam: rizogênese incompleta, reabsorções internas e externas, linhas de fratura, raízes curvas, canais obturados ou cáries extensas. Por outro lado, os dentes tiveram como critérios de inclusão: canais e raízes retas, com rizogênese completa e com no mínimo 16 mm de raiz, mensurados da margem cervical (junção cimento-esmalte) ao vértice radicular.

PREPARO DA AMOSTRA

Os remanescentes de cálculos e debris orgânicos aderidos à superfície radicular, foram removidos com a utilização de curetas universal para raspagem periodontal, números 13-14 (SS White Artigos Dentários, Rio de Janeiro, Brasil). Os dentes foram armazenados em solução de hipoclorito de sódio a 0.5% (Lenza Farmacêutica, Divisão Odontológica, Belo Horizonte, Brasil) por um período de 2 a 4 semanas até o momento da execução do preparo do SCR. As coroas foram removidas na junção cimento-esmalte com disco diamantado (KG Sorensen Ind. Com. Ltda, São Paulo, Brasil). Os canais foram instrumentados sequencialmente com lima tipo-K número # 15 (Dentsply Maillefer, Ballaiguess, Swiss) até o número # 20 (Dentsply Maillefer, Ballaiguess, Swiss), no nível do forame apical, que foi estabelecido por meio de visualização direta. A instrumentação preliminar foi auxiliada pela irrigação com 1 mL de solução de hipoclorito de sódio a 5.25% (Lenza Farmacêutica Ltda, Belo Horizonte, Brasil) entre cada lima. Para remover a *smear layer*, o canal radicular foi inundado com 1 mL de solução de EDTA 17%, pH7.4 (Lenza Farmacêutica Ltda, Belo Horizonte, Brasil) por 3 minutos, seguido de irrigação final com a solução de hipoclorito de sódio a 5.25 %.

Após a secagem do canal com ponta de papel absorvente # 20 (Endpoints Industrial da Amazônia, Manacapuru, Brasil), uma lima tipo-K # 20 foi estabilizada no comprimento de trabalho (CT), determinado em 1 mm aquém do forame apical. A seguir, o forame apical e os 3 mm finais da raiz foram selados com duas camadas de cianocrilato (Super Bonder, Henkel Loctite Adesivos Ltda., Itapevi, Brasil). Cada raiz foi acoplada na porção central de uma tampa de borracha de um recipiente de vidro (Fig.1). Essa unidade experimental foi esterilizada por gás de óxido de etileno (Curar Centro de Esterilização Ltda, Belo Horizonte, Brasil), sendo empacotada adequadamente (Fig.2).



Fig. 1- Unidade experimental



Fig. 2- Esterilização por óxido de etileno

MICROORGANISMO INDICADOR

Foi utilizado o microrganismo indicador proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC) – *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083).

INOCULAÇÃO MICROBIANA

Os canais radiculares foram contaminados com suspensão de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). O microrganismo foi semeado em meio sólido, Ágar Brain Heart Infusion - BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Para o preparo da suspensão, 3 a 5 colônias de um cultivo de 24 horas foram inoculadas em 5 mL de água destilada e ajustadas à escala de turvação de Mc Farland (3×10^8 células / mL). Dessa suspensão microbiana foi retirado 1 mL para o preparo de uma nova suspensão em 10 mL de caldo BHI (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Após 5 horas de incubação a 37° C, em condição de aerobiose, cada unidade experimental recebeu aproximadamente 20 µl da suspensão bacteriana, suavemente injetada em cada canal radicular, por meio da seringa plástica Injex (Ind. Cirúrgica Ltda, São Paulo, Brasil - Fig.3). Posteriormente, uma lima tipo k # 15 foi utilizada para conduzir até o CT a suspensão bacteriana. Cada unidade experimental foi colocada num frasco plástico com tampa rosqueável estéril (J. Prolab, São José dos Pinhais, Brasil - Fig.4), incubados por 24 horas em 37 °C, também em condição de aerobiose. Em intervalos de 48 horas os canais radiculares foram reinoculados com suspensão fresca de *E. faecalis*, preparada conforme descrito anteriormente por um período de 21 dias.

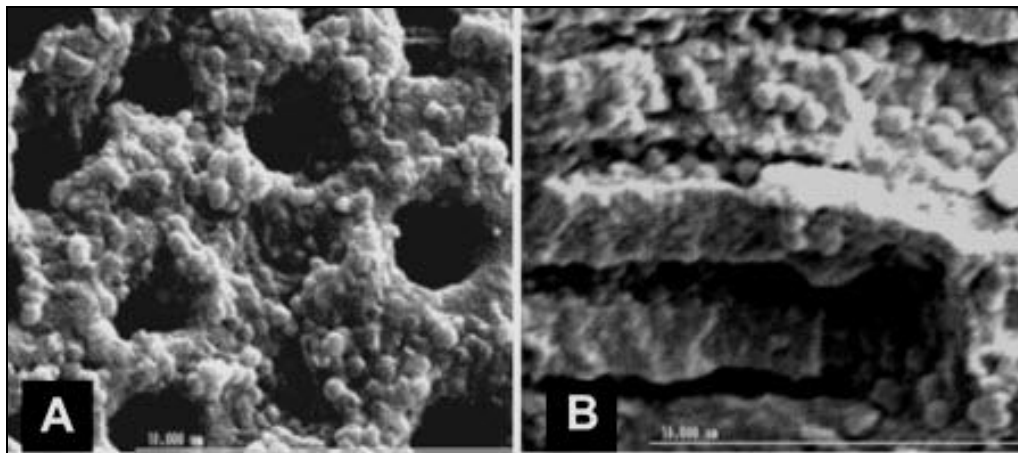


Fig. 3- Inoculação *E. faecalis*

Fig. 4- Frasco plástico estéril

DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS

Os canais radiculares foram divididos em 2 grupos experimentais e 2 grupos controles, sendo 1 controle positivo e 1 controle negativo. No grupo 1 (n=10), foi realizado o preparo químico-mecânico utilizando como irrigante solução de NaOCl 5.25% (Lenza Farmacêutica, Divisão Odontológica, Belo Horizonte, Brasil). No grupo 2 (n=10), foi realizado o preparo químico-mecânico sendo os canais irrigados com NaOCl 5.25%, seguido da utilização de PDT. Um grupo controle positivo com 4 canais, instrumentados e irrigados com solução salina 0.85% (Lenza Farmacêutica, Divisão Odontológica, Belo Horizonte, Brasil) e um grupo controle negativo com 4 canais que não receberam inoculação do microrganismo indicador. Outro grupo com dois espécimes foram preparadas após o período de 21 dias de inoculação microbiana para análise com microscopia eletrônica de varredura (MEV). As raízes foram sulcadas longitudinalmente no sentido vestibulo-lingual com disco diamantado (KG Sorensen, São Paulo, Brasil) e clivadas com fórceps em hemipartes mesial e distal. Após fixação em solução de glutaraldeído a 2.5% em solução de tampão fosfato (PBS-pH7.2), por 12 horas, foi realizada a desidratação em série crescente de álcool etílico, por 20 minutos cada, seguido de metalização com ouro. Em seguida foi realizada a MEV (JEOL, Akishima, Japão) com aumentos de 7200 X. Foram avaliados os túbulos dentinários, a formação de biofilmes nas paredes do canal radicular e a colonização dos túbulos dentinários por *E. faecalis*. (Figs. 5 A e B)



Figs.5 A - *E. faecalis* nas paredes dentinárias. B - *E. faecalis* no interior dos túbulos dentinários.

PREPARO QUÍMICO-MECÂNICO E TERAPIA FOTODINÂMICA

Todos os canais foram instrumentados até o comprimento de trabalho com técnica de instrumentação rotatória, utilizando-se sequencialmente limas Protaper (Dentsply Maillefer, Ballaiguess, Swiss), S1, S2, F1, F2, F3, sendo o preparo finalizado com a Protaper F4 (# 0.40 mm). Durante todo o preparo foi realizada irrigação com 1 mL de hipoclorito de sódio a 5,25% entre cada troca de instrumento, utilizando-se seringa plástica estéril, descartável, Injex (Ind. Cirúrgica Ltda, São Paulo, Brasil). Ao final do preparo radicular, os canais foram irrigados com 1 mL de solução de EDTA 17%, pH7.4 (Lenza Farmacêutica Ltda, Belo Horizonte, Brasil) por 3 minutos, seguido de irrigação final com 1 mL de solução de hipoclorito de sódio a 5.25 %.

Para realização da PDT foi utilizado a associação do fotossensibilizador azul de metileno 0.005% (Chimiolux, Hypofarma, Belo Horizonte, Brasil) ao laser Twin Flex (MMOptics, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 660 nm e potência de 40 mW, totalizando 1,8 J de energia em área de spot. Foi utilizado uma fibra ótica (MMOptics, São Carlos, Brasil) com 300 µm acoplada ao laser diodo, a qual foi inserida 2 mm aquém do CT, onde ficou parada, para permitir um melhor espalhamento da luz (Fig.6).



Fig.6- Aplicação laser com fibra óptica

Previamente a colocação do fotossensibilizador, os canais foram irrigados com 1 mL de solução salina 0.85 % e em seguida secos com pontas de papel absorvente Endopoints (Endopoints Industrial da Amazônia, Manacapuru, Brasil) de tamanho FM. O fotossensibilizador foi colocado no interior do canal por meio de seringa plástica Injex, estéril, descartável, com agulha gauge 23 e deixado por 5 minutos como tempo de pré-irradiação. Decorrido este período, foi feita a irradiação com fibra óptica por 180 segundos. Foram obtidas amostras microbiológicas antes da instrumentação, imediatamente após e 72 horas pós-instrumentação. Os canais foram preenchidos com solução salina 0.85% por meio seringa plástica Injex, estéril, descartável, agulha gauge 23 e cada amostra foi obtida com 3 pontas de papel absorvente de tamanho FM, previamente esterilizadas por óxido de etileno, que permaneceram no canal por um período de 1 minuto. Entre cada procedimento de coleta, os canais foram novamente preenchidos com solução salina 0.85%, de modo que sempre continuavam hidratados para obtenção da amostra. As pontas de papel absorvente foram então transferidas para tubos contendo 2 mL de solução salina a 0.85% e agitados por 1 minuto em Vortex (Eletrolab, São Paulo, Brasil). Para avaliação quantitativa, foi realizado diluições em triplicata e alíquotas de 0.1 mL do espécime puro e das diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram semeadas em meio BHI, incubados a 37°C , por 48 horas, em condições de aerobiose. Após o período de incubação e a partir dos crescimentos obtidos, foram realizadas a contagem e observação das características morfológicas coloniais típicas do grupo microbiano estudado.

Para a avaliação qualitativa, e de maneira similar, as amostras microbiológicas foram obtidas dos espécimes puros, através de três pontas de papel absorvente utilizadas antes da instrumentação, imediatamente após e 72 horas pós-instrumentação. Em

seguida foram semeadas em triplicata, em caldo BHI, incubadas nas mesmas condições anteriores e avaliadas por meio de ausência ou presença de turbidez dos meios.

Para obtenção das características morfotintoriais dos microrganismos recuperados, as amostras estudadas foram observadas pelo método de coloração de Gram (Fig.7).

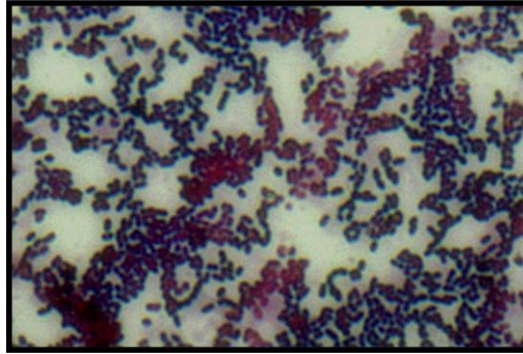


Fig.7- *E. faecalis* corado pelo método de Gram

Os dados quantitativos obtidos foram tabulados e analisados estatisticamente pelo teste paramétrico de Anova, seguido pelo teste de Bonferroni. Da mesma forma, os dados qualitativos foram avaliados pelo teste Q de Cochran e pelo teste exato de Fisher.

RESULTADOS

O efeito da Terapia Fotodinâmica em canais radiculares contaminados com *E. faecalis* foi avaliado em um estudo comparativo *in vitro* por meio de avaliação quantitativa, pela contagem de unidades formadoras de colônias e por meio de avaliação qualitativa, pela turbidez do meio. Os resultados foram listados nas tabelas numeradas de 1 a 9.

Tabela 1
Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e Log10
Grupo controle positivo – Solução salina 0,85 %

Leitura Dente	Pré-instrumentação		Pós-instrumentação		72 Horas	
	UFC	Log 10	UFC	Log 10	UFC	Log 10
1	3,52 x10 ⁶	6,546	3,7 x 10	1,568	1,9 x 10 ²	2,278
2	1,8 x10 ⁶	6,255	4,3 x10	1,633	1,02 x10 ²	2,008
3	4,4 x10 ⁶	6,643	7,8 x10	1,892	6,3 x 10	2,008
4	1,54 x 10 ⁶	6,187	9,1 x10	1,959	5,6 x 10	1,799

Tabela 2
Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e Log10
Grupo experimental - NaOCl 5.25%

Leitura	Pré-instrumentação		Pós-instrumentação		72 Horas		
	Dente	UFC	Log10	UFC	Log10	UFC	Log10
1		1,52 x10 ⁵	5,181	0	0	0	0
2		5,28 x10 ⁵	5,722	0	0	0	0
3		1,7 x10 ⁵	5,230	9,1 x10	1,959	0	0
4		6,8 x10 ⁵	5,832	0	0	0	0
5		1,7 x10 ⁶	6,230	0	0	0	0
6		1,04 x 10 ⁶	6,017	0	0	0	0
7		1,0 x 10 ⁶	6,000	0	0	0	0
8		1,14 x10 ⁶	6,056	0	0	0	0
9		1,18 x 10 ⁵	5,071	0	0	0	0
10		2,9 x10 ⁶	6,462	0	0	0	0

Tabela 3
Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e Log10
Grupo experimental NaOCl 5.25%, seguido de PDT

Leitura	Pré-instrumentação		Pós-instrumentação		72 Horas		
	Dente	UFC	Log10	UFC	Log10	UFC	Log10
1		4,2 x10 ⁶	6,623	0	0	0	0
2		3,0 x10 ⁵	6,477	0	0	0	0
3		4,5 x10 ⁴	4,653	0	0	0	0
4		2,04 x10 ⁵	5,309	0	0	0	0
5		1,1 x10 ⁶	6,041	0	0	0	0
6		1,34 x10 ⁶	6,127	0	0	0	0
7		4,3 x10 ⁵	5,633	0	0	0	0
8		1,96 x10 ⁵	5,292	0	0	0	0
9		1,7 x10 ⁶	6,230	0	0	0	0
10		2,2x10 ⁵	5,342	0	0	0	0

Tabela 4

Avaliação da turbidez do meio. Positiva (+) ou Negativa (-)

Grupo controle negativo

Dentes	Turbidez
1	-
2	-
3	-
4	-

Tabela 5

Avaliação da turbidez do meio. Positiva (+) ou Negativa (-)

Grupo controle positivo – Solução salina 0.85%

Dentes	Pré-Instrumentação	Pós- Instrumentação	72 Horas
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+

Tabela 6
 Avaliação da turbidez do meio. Positiva (+) ou Negativa (-)
 Grupo experimental – NaOCl 5.25%

Dentes	Pré-Instrumentação	Pós-Instrumentação	72 Horas
1	+	-	-
2	+	+	-
3	+	-	-
4	+	+	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	+	+	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	+	-	-

Tabela 7
 Avaliação da turbidez do meio. Positiva (+) ou Negativa (-)
 Grupo experimental – NaOCl 5.25%, seguido de PDT

Dentes	Pré-Instrumentação	Pós-Instrumentação	72 Horas
1	+	-	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	+	-	-

Tabela 8: Valores médios da avaliação de UFC (Log10)

	Pré-Instrumentação	Pós-Instrumentação	72 Horas	Valor de P
Solução salina	6,4078	1,7630	1,9583	P<0,01
NaOCl	5,7801	0,1959	0	P<0,01
NaOCl + PDT	5,7727	0	0	P<0,01

O valor de P foi obtido pelo teste de Anova

Tabela 9: Valores médios da avaliação da turbidez do meio:
Positiva (+) ou Negativa (-)

	Pré-Instrumentação		Pós-Instrumentação		72 Horas		Valor de P
	+	-	+	-	+	-	
Turbidez Solução salina (n=4)	4	0	4	0	4	0	P >0,05
NaOCl (n=10)	10	0	3	7	0	10	P <0,05
NaOCl + PDT(n=10)	10	0	2	8	0	10	P <0,05

O valor de P foi obtido pelo teste exato de Fisher

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a endodontia evoluiu substancialmente com o desenvolvimento e adoção de novas tecnologias e materiais, facilitando o trabalho do endodontista e diminuindo o tempo para execução do tratamento endodôntico. Apesar disto, a maioria das falhas ou insucessos endodônticos, está relacionada com a persistência de microrganismos que resistiram ao preparo químico-mecânico ou a medicação intracanal (Siqueira & Roças 2008).

A eliminação da microbiota do SCR é um dos principais objetivos da terapia endodôntica. Os microrganismos e seus subprodutos possuem papel crucial no desenvolvimento de infecção na polpa e nos tecidos periapicais (Takehashi *et al.* 1965).

Microrganismos localizados em ramificações, istmos, túbulos dentinários, podem escapar dos efeitos dos instrumentos e irrigantes usados durante o procedimento químico-mecânico de limpeza do SCR (Nair *et al.* 2005).

A microbiota do canal radicular presente nos casos de infecção primária difere dos casos de fracasso endodôntico, mesmo quando estes foram relativamente bem tratados. A infecção primária é mista, com equilíbrio entre gram-positivos e gram-negativos, com predomínio de anaeróbios estritos. Nos casos de fracasso da terapia endodôntica, a microbiota apresenta prevalência de bactérias anaeróbias facultativas gram-positivas (Molander *et al.* 1998, Sundqvist *et al.* 1998, Pinheiro *et al.* 2003, Siqueira & Roças 2008).

Nesta pesquisa, foi selecionado o *E. faecalis* como microrganismo indicador porque o mesmo pode sobreviver na ausência de sinergia com outros microrganismos e parece tolerar as mudanças ecológicas no canal radicular e persistir melhor que outras espécies (Fabricius *et al.* 1982). O *E. faecalis* tem sido identificado em uma considerável proporção de dentes com lesão periapical persistente que apresentam tratamento endodôntico tecnicamente bem realizado (Sundqvist *et al.* 1998) assim como em tratamentos com obturação inadequada do canal radicular (Peciulienė *et al.* 2000).

O *E. faecalis*, assim como outros microrganismos anaeróbios facultativos, pode ser resistente aos agentes antimicrobianos, aos procedimentos endodônticos e a medicação intracanal (Evans *et al.* 2002). Embora a habilidade do *E. faecalis* em

penetrar nos túbulos dentinários possa ser questionada, uma vez que a dentina da porção apical dos dentes de humanos adultos é esclerótica (Mjör *et al.* 2001), dificultando a invasão de microrganismos (Shovelton 1964), pesquisadores como Haapasalo & Ørstavik (1987) avaliando *in vitro* os túbulos dentinários por meio de MEV, observaram penetração bacteriana acima de 1.000 µm no interior dos túbulos dentinários. Por outro lado, as ramificações do SCR são clinicamente mais importantes porque estão em contato direto com o periodonto (Nair *et al.* 2005).

Os resultados de tratamentos endodônticos em sessão única foram avaliados por pesquisadores (Oliet 1983, Pekruhn 1986), indicando sucesso em longo prazo da terapia endodôntica. Entretanto, outros pesquisadores têm enfatizado a importância do tratamento em sessões múltiplas para erradicar toda a infecção do canal, contestando o tratamento em sessão única (Sjögren *et al.* 1997, Trope *et al.* 1999)

A solução de hipoclorito de sódio é uma das soluções irrigadoras mais empregadas no tratamento endodôntico. Não há um consenso geral a respeito da concentração ideal da solução, considerando o efeito antimicrobiano e toxicidade sobre os tecidos periapicais. Sua ação antimicrobiana é proporcional a sua concentração. Microrganismos como o *E. faecalis* são resistentes ao NaOCl em baixas concentrações (Baumgartner & Cuenin 1992, Heling & Chandler 1998, Ayhan *et al.* 1999). Gomes *et al.* (2001) avaliando a ação da atividade antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio em várias concentrações na eliminação do *E. faecalis*, concluíram que a concentração de NaOCl a 5.25% foi a mais eficiente considerando o menor tempo para eliminação.

Siqueira *et al.* (2000) avaliaram a redução microbiana proporcionada pelo preparo químico-mecânico com solução de NaOCl em concentrações de 1%, 2.5% e 5.25% sobre canais radiculares inoculados com *E. faecalis*. Os resultados deste estudo, sugerem que o uso regular e de grandes quantidades de irrigantes pode manter a ação antibacteriana da solução de NaOCl, compensando o efeito da concentração. A solução de NaOCl a 5.25% foi a que apresentou o melhor resultado na redução microbiana.

A Terapia fotodinâmica desponta como uma nova terapia, coadjuvante ao tratamento endodôntico, na tentativa de eliminar microrganismos persistentes ao preparo químico-mecânico. Sendo de fácil aplicação clínica, não desenvolve resistência

microbiana, podendo ser indicada em tratamentos endodônticos em sessão única ou múltiplas sessões.

Vários métodos *in vitro* foram utilizados para avaliar a eficiência da PDT (Silva Garcez *et al.* 2006, Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2008). Entretanto, no presente trabalho a prévia dilatação do canal radicular foi limitada a ação de dois instrumentos tipo K # 15 e 20, visando realizar uma simulação mais parecida com a realidade clínica. Este procedimento foi realizado no estudo de Siqueira *et al.* (2000). Outras pesquisas realizaram o preparo completo do canal radicular previamente a inoculação do microrganismo, com tempo médio de inoculação e incubação de 48 ou 72 horas (Silva Garcez *et al.* 2006, Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2008). A carga microbiana inoculada na maioria dos trabalhos foi correspondente a escala 1 de Mc Farland, o que também foi utilizada na presente pesquisa. Embora a carga microbiana inoculada tenha sido semelhante, diferentemente destes estudos, a inoculação e incubação no presente estudo foram realizadas por um período de 21 dias, em intervalos de 48 horas, com repique bacteriano de 24 horas, visando uma total contaminação do SCR. Neste sentido, não foi observado à carga microbiana inicial, obtida por amostras biológicas previamente aos procedimentos endodônticos nos referidos estudos (Silva Garcez *et al.* 2006, Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2008). No presente estudo, a cultura inicial apresentou uma média 5.28×10^5 nos grupos experimentais, previamente ao início dos procedimentos.

Na endodontia, os fotossensibilizadores derivados das fenotiazinas, compostos heteroaromáticos tricíclicos, corantes azuis, como o corante azul de toluidina e o azul de metileno têm sido amplamente empregados nas pesquisas envolvendo PDT (Seal *et al.* 2002, Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2008). O azul de metileno tem sido utilizado como alvo para microrganismos da microbiota endodôntica (Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008). Em razão de sua natureza hidrofílica, acompanhada de baixo peso molecular (Wainwright 1998), o corante azul de metileno (Chimiolux) foi utilizado no presente estudo. Possui banda de absorção ressonante com o comprimento de onda da fonte de luz utilizada e uma concentração de 0.005%, superior a concentração utilizada na maioria dos trabalhos similares (Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008).

A fibra óptica empregada na presente pesquisa possui um comprimento de 55 mm, diâmetro inicial de 1 mm, com redução do diâmetro, de modo que na ponta o diâmetro é de 0,3 mm. Segundo o fabricante, a potência de saída da fibra óptica é de 10 mW. Considerando a potência do aparelho ajustada em 40 mW, há uma perda de potência da ordem de 30 mW. Portanto, trabalhando com um tempo de exposição de 180 segundos, alcançamos uma energia de 1,8 J em área de spot, similar ao estudo de Silva Garcez *et al.* (2006). Por outro lado, considerando a área de 0,3 mm da ponta da fibra óptica, obteve-se uma densidade de energia de 2546,0 J/cm², superior a todas as pesquisas reportadas (Seal *et al.* 2002, Silva Garcez *et al.* 2006, Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2008). Segundo Fimple *et al.* (2008), aumentando a concentração do azul de metileno e a densidade de energia da luz (J/cm²), há um aumento na destruição bacteriana. Ainda em relação ao fotossensibilizador, foi utilizado como tempo de pré-irradiação os mesmos tempos utilizados em estudos similares (Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007).

Os parâmetros da luz utilizados, potência, densidade de energia e tempo de exposição foram capazes de melhorar a redução da carga microbiana, nas condições testadas, com um tempo de aplicação reduzido em relação a outros protocolos sugeridos em outras pesquisas (Soukos *et al.* 2006, Foschi *et al.* 2007, Fimple *et al.* 2008, Fonseca *et al.* 2008).

Os resultados do estudo quantitativo, do grupo controle positivo, evidenciaram a importância da utilização de uma solução irrigadora com ação antimicrobiana como o NaOCl. Foi verificada redução da carga microbiana utilizando-se solução salina a 0.85% devido ao efeito físico da irrigação, concordando com os achados de Byström & Sundqvist (1983). No entanto, foi observado o crescimento bacteriano quando decorridas 72 horas pós-instrumentação, indicando a viabilidade e presença de microrganismos remanescentes. Na avaliação qualitativa, em todas as amostras microbiológicas foi confirmado a presença microbiana por meio da turbidez do meio.

No grupo controle negativo, não foi verificada a presença microbiana por meio da turbidez do meio, comprovando a esterilização dos espécimes por óxido de etileno.

No grupo experimental com NaOCl a 5.25% foi observado a drástica redução microbiana pós-instrumentação. No estudo quantitativo, em apenas uma amostra dos espécimes foram recuperados microrganismos, em número de UFC. Quando foi

utilizado a PDT como coadjuvante do preparo químico-mecânico houve redução de 100% da carga microbiana em número de UFC, sugerindo a ausência de microrganismos cultiváveis. Os mesmos grupos experimentais apresentaram resultados diferentes quando avaliados pela turbidez do meio. No grupo NaOCl a 5.25% foi verificado a presença de 3 espécimes ainda contaminados pós-instrumentação, caracterizando uma redução de 70%. No grupo NaOCl a 5.25%, seguido de PDT, foi observado a presença de microrganismos em 2 espécimes com carga microbiana pós-instrumentação, atingindo uma redução de 80%. Não foi verificada a presença microbiana nos mesmos grupos quando avaliados em 72 horas pós-instrumentação.

Os resultados avaliados pelos estudos qualitativos e quantitativos apresentaram divergências, mas apresentam justificativas. O *E. faecalis* pode estar presente em números abaixo do detectável pela contagem de UFC, quando avaliados pelo método de cultura. Gomes *et al.* (2006) avaliaram a ocorrência relativamente alta do *E. faecalis* em infecções primárias quando o método de PCR (Polymerase Chain Reaction) foi empregado para identificar e compararam com o método de cultura convencional. O *E. faecalis* foi identificado em 82% dos casos versus 4% para o método de cultura. Entretanto, pela avaliação da turbidez do meio, pode-se verificar a presença do *E. faecalis*, possivelmente viável, como remanescente do preparo químico-mecânico e da PDT mas em número não capaz de ser recuperado em meio sólido (Ágar BHI).

Deve-se considerar que um estudo *in vitro* não é capaz de simular todas as condições microbiológicas de uma situação clínica, mas a PDT desponta como uma possibilidade a ser empregada como coadjuvante do tratamento endodôntico, tanto em sessão única como em múltiplas sessões, na tentativa de reduzir ou eliminar microrganismos persistentes.

Os resultados avaliados foram promissores quando utilizada a PDT associada à irrigação com NaOCl 5.25%, entretanto, sob o ponto de vista da análise estatística não houve diferença significativa entre os grupos.

CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais em que foi realizada a presente pesquisa e o microrganismo indicador, podemos concluir que:

- Os resultados obtidos evidenciaram melhor redução microbiana quando utilizado a irrigação com NaOCl a 5.25% associado à aplicação da PDT.

REFERÊNCIAS

- Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi M, Bodur H (1999) Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* **32**, 99-102.
- Baumgartner J, Cuenin P (1992) Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* **18**, 605-12.
- Byström A, Sundqvist G (1985) The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* **18**, 35-40.
- 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* **55**, 307-12.
- Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* **35**, 221-28.
- Fabricius L, Dahlén G, Holm S, Möller A (1982) Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* **90**, 200-06.
- Figdor D, Davies J, Sundqvist G (2003) Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* **18**, 234-39.
- Fimple J, Fontana C, Foschi F *et al.* (2008) Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* **34**, 728-34.
- Fonseca M, Júnior P, Pallota R *et al.* (2008) Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg* **26**, 209-13.
- Foschi F, Fontana C, Ruggiero K *et al.* (2007) Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* **39**, 782-87.
- Garcez A, Nuñez S, Hamblin M, Ribeiro M (2008) Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* **34**, 138-42.

- Garcez A, Ribeiro M, Tegós G, Núñez S, Jorge A, Hamblin M (2007) Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* **39**, 59-66.
- Gomes B, Ferraz C, Vianna M, Berber V, Teixeira F, Souza-Filho F (2001) In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* **34**, 424-28.
- Gomes B, Pinheiro E, Sousa E *et al.* (2006) *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**, 247-53.
- Haapasalo M, Ørstavik D (1987) In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* **66**, 1375-79.
- Heling I, Chandler N (1998) Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* **31**, 8-14.
- Takehashi S, Stanley H, Fitzgerald R (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **20**, 340-49.
- Konopka K, Goslinski T (2007) Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* **86**, 694-707.
- Mjör I, Smith M, Ferrari M, Mannocci F (2001) The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J* **34**, 346-53.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* **31**, 1-7.
- Nair P, Henry S, Cano V, Vera J (2005) Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **99**, 231-52.
- Oliet S (1983) Single-visit endodontics: a clinical study. *J Endod* **9**, 147-52.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen H, Haapasalo M (2000) Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* **26**, 593-95.

- Pekruhn R (1986) The incidence of failure following single-visit endodontic therapy. *J Endod* **12**, 68-72.
- Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Souza Filho F (2003) Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* **18**, 100-103.
- Seal G, Ng Y, Spratt D, 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**, 268-74.
- Sedgley C, Lennan S, Appelbe O (2005) Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* **38**, 735-42.
- Silva Garcez A, Núñez S, Lage-Marques J, Jorge A, Ribeiro M (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**, e93-98.
- Siqueira JF Jr, Lopes H (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* **32**, 361-69.
- Siqueira JF Jr, Machado A, Silveira R, Lopes H, de 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**, 279-82.
- Siqueira JF Jr, Magalhães K, Rôças I (2007) 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**, 667-72.
- Siqueira JF Jr, Rôças I (2008) Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* **34**, 1291-1301.e3.
- Siqueira JF Jr, Rôças I, Favieri A, Lima K (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**, 331-34.
- Siren E, Haapasalo M, Ranta K, Salmi P, Kerosuo E (1997) Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* **30**, 91-95.

- Shovelton DS (1964) The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *British Dental Journal* **117**, 101-7.
- Sjögren U, Figdor 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.
- Soukos N, Chen P, Morris J *et al.* (2006) Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* **32**, 979-84.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **85**, 86-93.
- Trope M, Delano E, Ørstavik D (1999) Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod* **25**, 345-50.
- Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* **42**, 13-28.
- Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D (2005) Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* **31**, 863-66.
- Walton R (1976) Histologic evaluation of different methods of enlarging the pulp canal space. *J Endod* **2**, 304-11.

ARTIGO II

TERAPIA FOTODINÂMICA NA ENDODONTIA: REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO

A persistência de microrganismos remanescentes ao preparo químico-mecânico ou a medicação intracanal está relacionada como a principal causa de insucesso na endodontia. A Terapia Fotodinâmica desponta como uma promissora terapia antimicrobiana sendo utilizada como coadjuvante do tratamento endodôntico. Sendo uma técnica de fácil e rápida aplicação, pode ser utilizada em sessão única ou múltiplas sessões, não desenvolvendo formas de resistência microbiana. O presente estudo objetiva discutir os principais fatores que envolvem a Terapia Fotodinâmica e sua utilização no tratamento endodôntico por meio de uma revisão de literatura.

Palavras-chave: Endodontia. Terapia Fotodinâmica.

PHOTODYNAMIC THERAPY IN ENDODONTICS: REVIEW OF LITERATURE

ABSTRACT

The persistence of remaining microorganisms to either chemical-mechanical preparation or intracanal medication is reported as the main failure cause in endodontics. The photodynamic therapy has risen as a promising antimicrobial therapy as a support to endodontic treatment. As it is easily and quickly applied, it can be used both in a single session or in multiple ones, besides not allowing forms of microbial resistance. The present study aims at discussing the principal factors that involve the photodynamic therapy as well as its application in the endodontic treatment through a literature review.

Key words: Endodontics. Photodynamic Therapy.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a endodontia evoluiu substancialmente com o desenvolvimento e adoção de novas tecnologias e materiais, facilitando o trabalho do endodontista e diminuindo o tempo para execução do tratamento endodôntico. Apesar disto, a maioria das falhas ou insucessos endodônticos, está relacionada com a persistência de microrganismos que resistiram ao preparo químico-mecânico ou a medicação intracanal¹.

A Terapia Fotodinâmica desponta como uma nova terapia, coadjuvante ao tratamento endodôntico, na tentativa de eliminar microrganismos persistentes ao preparo químico-mecânico. Sendo de fácil e rápida aplicação clínica, não desenvolve resistência microbiana, podendo ser indicada em tratamentos endodônticos em sessão única ou múltiplas sessões.

O presente artigo tem como objetivo fazer uma revisão de literatura sobre a utilização da Terapia Fotodinâmica na endodontia.

HISTÓRICO

A utilização da luz como agente terapêutico tem sido empregada no tratamento de doenças desde a antiguidade. No Egito, Índia, e China, utilizava-se a luz solar para tratamento de doenças da pele como psoríase, vitiligo, e câncer. O famoso médico grego Heródoto, enfatizava a importância da exposição à luz solar para restauração da saúde².

O conceito de morte celular induzido pela interação de luz e substâncias químicas é reconhecido há mais de 100 anos. No ano de 1900, as primeiras experiências com tratamento fotodinâmico foram relatadas por Oscar Raab, um estudante de medicina,

e seu professor, Herman Von Tappeiner em Munique. Eles estudaram o efeito do corante de acridina sobre culturas de paramécios, e descobriram que a combinação do corante de acridina e luz foi letal para os mesmos. Durante uma tempestade com ocorrência de muitos raios, houve alteração das condições luminosas do ambiente no momento dos experimentos, o que levou os autores a postularem que este efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila. Nem a luz ou o corante isoladamente tiveram qualquer efeito aparente sobre os paramécios, mas juntos eles foram altamente citotóxicos^{2,3}.

MECANISMO DE INTERAÇÃO

A Terapia Fotodinâmica, também conhecida como PDT, acrônimo de *Photodynamic Therapy*, surge como uma promissora terapia antimicrobiana. Envolve a utilização de um fotossensibilizador (corante), que é ativado pela luz de um específico comprimento de onda na presença de oxigênio. A transferência de energia do fotossensibilizador ativado para o oxigênio disponível resulta na formação de espécies tóxicas de oxigênio, conhecido como oxigênio singlete e radicais livres. Estes são espécimes químicos altamente reativos que danificam proteínas, lípedes, ácidos nucleicos e outros componentes celulares microbianos⁴.

É importante que a fonte de luz seja ressonante com o corante para que a PDT seja efetiva na inviabilização de células².

A maioria das bactérias orais não absorve a luz visível de lasers que operam em baixa potência, com exceção de alguns microrganismos gram-positivos, *Actinomyces odontolyticus* e *Porphyromonas gingivalis*, que sintetizam porfirinas endógenas⁵. A

utilização de um agente de absorção óptica não tóxico que se fixe à parede celular bacteriana atraindo para si a luz laser é necessário para que ocorra a ação antimicrobiana sobre as bactérias orais.

Quando uma molécula aromática absorve luz de certa quantidade de energia, ela pode sofrer transição eletrônica ao estado excitado singleto (spin eletrônico emparelhado). Dependendo da estrutura molecular e do ambiente, a molécula pode perder sua energia por processos físicos ou eletrônicos, retornando ao seu estado fundamental, ou pode sofrer transição ao estado excitado tripleto (spin eletrônico desemparelhado). Neste estágio, a molécula pode sofrer novamente decaimento eletrônico e retornar ao seu estado fundamental, sofrer reação redox com o ambiente ou sua energia de excitação ser transferida ao oxigênio molecular conduzindo a formação do oxigênio singleto instável. A habilidade da molécula em formar reação redox ou oxigênio singleto depende da produção suficiente de moléculas no estado tripleto, que por sua vez depende da taxa de decaimento de ambos estados tripleto e singleto inicialmente formados⁶.

Segundo Machado⁷ (2000), a reação envolvida decorre primariamente da excitação eletrônica do corante pela luz, seguida de dois mecanismos principais de reação a partir do seu estado excitado. Na reação do tipo I, ocorre transferência de elétron entre o fotossensibilizador no estado tripleto excitado e componentes do sistema, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados, como peróxido de hidrogênio, íons hidroxila, radicais hidroxila, ânion superóxido, que são tóxicos aos microrganismos. Na reação do tipo II, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizador no estado tripleto, com a geração de oxigênio singleto, um agente altamente citotóxico.

Em PDT é difícil fazer distinção entre os dois tipos de mecanismos, mas em ambos, o mecanismo de dano à célula alvo é dependente da tensão de oxigênio e concentração do fotossensibilizador⁴. A reação do tipo II é considerada como a predominante no dano fotooxidativo às células microbianas⁶.

No caso dos fotossensibilizadores é importante que o estado tripleto seja bem povoado (presença de muitos elétrons / fótons) e relativamente maior duração. Se isto ocorrer, o fotossensibilizador excitado terá tempo de reagir com seu ambiente (transferência eletrônica / reações redox) ou transferir sua energia de excitação a uma molécula de oxigênio e produzir o altamente reativo oxigênio singlete. Assim o fotossensibilizador danifica os alvos biológicos principalmente por oxidação. O importante em PDT é a capacidade de excitar o fotossensibilizador em seu alvo e com mínimo de dano no tecido circunvizinho³.

EFEITOS FOTOTÓXICOS DA PDT

A destruição microbiana proporcionada pela PDT a nível molecular é bem estabelecida em muitos casos. A reação do tipo I com água em meio microbiano pode elevar os radicais hidroxila, que podem reagir com biomoléculas ou combinar-se para formar peróxido de hidrogênio *in situ*. Os subsequentes resultados citotóxicos incluem a remoção de hidrogênio de moléculas insaturadas como os fosfolípedes da membrana citoplasmática bacteriana, alterando a permeabilidade e integridade da membrana. A inativação de enzimas da membrana e receptores também é possível. Na reação do tipo II, o fotossensibilizador no estado tripleto transfere sua energia para o oxigênio molecular, formando *in situ* o oxigênio singlete, que então reage rapidamente com componentes celulares como a parede celular, ácido nucléico, peptídeos e moléculas

envolvidas na manutenção estrutura da parede celular / membrana, tais como fosfolípedes, esteróis e peptídeos. O período curto de vida do oxigênio singleto novamente assegura uma resposta localizada. A reação do tipo II é geralmente aceita como o principal caminho fotooxidativo no dano celular microbiano⁶.

TEMPO DE PRÉ-IRRADIAÇÃO

O tempo de pré-irradiação corresponde ao tempo decorrido entre a aplicação do fotossensibilizador no alvo e sua ativação pela luz. É um ponto crítico para o sucesso da PDT, uma vez que se o fotossensibilizador não estiver próximo ao alvo, sua ativação pela luz irá resultar na formação de espécies tóxicas em local não desejado. A morfologia microbiana pode variar com as espécies causando diferenças na localização do fotossensibilizador⁸.

O tempo necessário para absorção do corante antes da iluminação é importante para o sucesso na PDT⁶. Nas aplicações da PDT antimicrobiana, espera-se que o corante una-se ao microrganismo ou chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular e neste período o fotossensibilizador não sofra degradação antes da ativação pela fonte de luz.

FOTOSENSIBILIZADORES

O fotossensibilizador deve possuir uma banda de absorção ressonante com o comprimento de onda da fonte de luz a ser utilizada. Ele deve possuir estabilidade biológica, eficiência fotoquímica, seletividade pela célula alvo e mínimo efeito tóxico as células normais⁸.

Na endodontia, os fotossensibilizadores derivados das fenotiazinas têm sido amplamente empregados nas pesquisas envolvendo PDT^{9, 10, 11, 12, 13}. As fenotiazinas são

compostos heteroaromáticos tricíclicos, corantes azuis, como o corante azul de toluidina e o azul de metileno. Em baixas concentrações não produzem ação citotóxica e a dose necessária para a morte bacteriana é menor que a dose para causar danos a células, como queratinócitos e fibroblastos¹⁴.

Segundo Fimple *et al.*¹² (2008), aumentando a concentração do azul de metileno e a densidade de energia da luz (J/cm^2), há um aumento na destruição bacteriana. Os principais alvos destes fotoabsorvedores parecem ser componentes do DNA e da membrana celular, causando aumento de sua permeabilidade. De acordo com Wainwright⁶ (1998), sua banda de absorção da luz situa-se no comprimento de onda entre 620 nm e 660 nm.

A fotossensibilização de bactérias está relacionada com a carga do fotossensibilizador. Em geral, os de carga neutra ou positiva interagem eficientemente e inativam bactérias Gram-positivas, enquanto que interagem em alguma extensão na membrana externa de bactérias Gram-negativas. A camada de poros de peptideoglicano e ácido lipoteicóico na membrana citoplasmática externa de bactérias gram-positivas permite a difusão do fotossensibilizador. A membrana externa de bactérias Gram-negativas age como uma barreira física e funcional entre as células e o meio biológico⁸,¹⁵.

Segundo Wainwright⁸ (1998), as fenotiazinas são mais efetivas contra espécies de microrganismos gram-positivos do que contra espécies Gram-negativas. O azul de metileno tem sido utilizado como alvo para microrganismos da microbiota endodôntica^{10,11, 12}. Em razão de sua natureza hidrofílica, acompanhada de baixo peso molecular e carga positiva, permite a passagem através dos canais de proteína-porina na membrana externa de bactérias gram-negativas. O azul de metileno interage predominantemente

com macromoléculas lipopolissacárides aniônicas, participando assim, do processo de fotossensibilização⁸. Segundo Usacheva *et al.*¹⁶ (2003) o azul de toluidina, em um estudo *in vitro*, interagiu com a endotoxina bacteriana (LPS) das bactérias Gram-negativas mais significativamente que o azul de metileno, o qual pode ser um dos principais fatores determinantes no efeito fotooxidativo contra bactérias Gram-negativas.

FONTES DE ENERGIA

As primeiras fontes de luz utilizadas em PDT foram lâmpadas convencionais, emitindo luz não coerente e policromática, com um forte componente térmico associado. O desenvolvimento dos lasers de diodo de baixa intensidade, com luz monocromática e coerente, facilitou a associação com fotossensibilizadores com banda de absorção ressonante com o comprimento de onda emitido pelo laser. A dose de radiação é facilmente calculada, a área de irradiação é controlada, focalizando o tratamento. A luz pode ser transmitida por meio de fibra óptica, sendo que estas fibras podem receber adaptações para melhor acessar a lesão alvo, com microlentes e difusores^{2,3}.

Os lasers de Hélio-neon (He-Ne) apresentaram bons resultados na redução microbiana de diversas culturas de bactérias e fungos, utilizando os corantes azul de toluidina e azul de metileno, demonstrando a importância da ressonância entre o corante e o comprimento de onda emitido pela fonte de luz¹⁷.

Atualmente, são utilizados lasers de diodo, emitindo no espectro do vermelho, em baixa intensidade, por serem bem absorvidos pelos tecidos biológicos. Na Terapia Fotodinâmica, os efeitos obtidos não são por incremento de temperatura, mas sim por

reações fotoquímicas entre o fotossensibilizador, luz e o substrato. Pode-se variar a densidade de potência (W/cm^2), o tempo de exposição (s) ou ambos, mantendo-se a mesma fluência ou densidade de energia (J/cm^2). No entanto, uma densidade de potência alta sobre um curto período de tempo pode oferecer resultados diferentes em relação à destruição microbiana, quando comparado a uma densidade de potência baixa aplicado por um período mais longo, embora a densidade de energia tenha sido a mesma em cada caso⁶.

Uma fonte de luz alternativa para a PDT são os LEDs (diodos emissores de luz), que podem ser utilizados como fontes de ativação em PDT, apresentando um baixo componente térmico e luz monocromática, com banda estreita de comprimento de onda¹⁸. Nos LEDs predomina o mecanismo espontâneo de radiação, com pouca energia para geração de luz, apresentando largo espectro de luz não coerente e com maior divergência¹⁹.

PESQUISAS RECENTES NA ENDODONTIA

Fimple *et al.*¹² (2008) investigaram *in vitro* a resposta de infecção polimicrobiana em canais uniradiculados de humanos, submetidos à PDT, após sensibilização com azul de metileno e exposição à luz. Os espécimes foram contaminados com *Actinomyces israeli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Os canais radiculares foram expostos ao azul de metileno ($25 \mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 minutos e em seguida foram irradiados por meio de fibra ótica com laser emitindo no vermelho com comprimento de onda de 665 nm. Foram feitas duas irradiações de 2.5 minutos com energia de fluência de $15 \text{ J}/\text{cm}^2$, com

intervalo de 2.5 minutos, totalizando 30 J/cm². Os resultados obtidos com a PDT alcançaram uma redução microbiana de 80% nas unidades formadoras de colônias.

Garcez *et al.*²⁰ (2008) avaliaram os efeitos da PDT em 20 pacientes portadores de dentes com necrose pulpar e lesão periapical. Amostras microbiológicas foram obtidas após o preparo da cavidade de acesso dos canais radiculares. Posteriormente, os canais foram preparados manualmente até uma lima tipo K # 35, seguido da aplicação de PDT no final da primeira sessão. Os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e os pacientes atendidos após uma semana. Novas amostras microbiológicas foram obtidas na segunda sessão antes e após nova aplicação de PDT. Os resultados mostraram redução microbiana após terapia endodôntica, sendo que a combinação com PDT aumentou a redução microbiana. Neste estudo, a segunda sessão com PDT foi significativamente mais eficiente que a primeira sessão. Os resultados sugerem que a PDT proporcionou uma redução substancial da carga microbiana quando associado ao tratamento endodôntico.

Fonseca *et al.*¹³ (2008) avaliaram *in vitro* os efeitos da PDT em canais radiculares de dentes humanos contaminados com *Enterococcus faecalis*. Os canais foram sensibilizados com azul de toluidina em concentração de 0.0125 %. Os espécimes foram irradiados com laser emitindo no vermelho com comprimento de onda de 660 nm, por meio de fibra ótica com energia de fluência de 400 J/cm², por 05 minutos e 20 segundos. Os resultados obtidos evidenciaram uma redução microbiana de 99.9% nas unidades formadoras de colônias.

Foschi *et al.*¹¹ (2007) investigaram os efeitos da PDT sobre espécies de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes extraídos. Os dentes foram sensibilizados com azul de metileno (6.25 µg/ ml) por 05 minutos. Os canais foram

irradiados por meio de fibra ótica com laser emitindo no vermelho com comprimento de onda de 665 nm e energia de fluência de 60 J/cm². A PDT alcançou uma redução de 77.5% na viabilidade do *Enterococcus faecalis*.

Soukos *et al.*¹⁰ (2006) avaliaram *in vitro* os efeitos da PDT em dentes humanos contaminados com biofilmes de *Enterococcus faecalis*. Os dentes foram expostos ao azul de metileno (25 µg/mL) por 05 minutos e em seguida foram irradiados por meio de fibra ótica com laser emitindo no vermelho com comprimento de onda 665 nm, com energia de fluência de 222 J/cm². Os resultados evidenciaram uma redução microbiana de 97 %.

Silva Garcez *et al.*²¹ (2006) avaliaram *in vitro* a redução microbiana do *Enterococcus faecalis*, submetido a PDT e com solução de hipoclorito de sódio 0.5%. Foi utilizado o fotossensibilizador pasta-base de azuleno e os canais foram irradiados com laser emitindo no vermelho com comprimento de onda 685 nm, por 03 minutos com energia de 1.8 J. O fotossensibilizador sozinho ou laser sozinho não apresentaram nenhum efeito bactericida. A solução química reduziu em 93.25 % a carga microbiana. A redução microbiana proporcionada pela PDT alcançou 99.2 % sobre o *E. faecalis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a revisão de literatura, verificou-se que a Terapia Fotodinâmica surge como uma promissora terapia coadjuvante em endodontia, viabilizando a destruição microbiana como um coadjuvante do tratamento endodôntico. Não existe um protocolo estabelecido em relação aos parâmetros da luz, fotossensibilizadores e tempo de exposição. No entanto, surge uma nova perspectiva na eliminação de microrganismos persistentes ao preparo químico-mecânico na endodontia.

REFERÊNCIAS

1. Siqueira JF, Rôças I. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008; 34(11):1291-301.e3.
2. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 74(5):656-69.
3. Ribeiro MS, Zezell DM. Laser de baixa intensidade. In: Gutknecht N, Eduardo CP. *A odontologia e o laser, a Atuação do laser na especialidade odontológica*. 1 ed. São Paulo: Quintessence; 2004. p. 217-40.
4. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007; 86(8):694-707.
5. König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000; 46(7):1297-303.
6. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(1):13-28.
7. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nov* 2000; 23(2):237-43.
8. Wainwright M, Phoenix D, Marland J, Wareing D, Bolton F. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 19(1):75-80.
9. Seal G, Ng Y, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. 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* 2002; 35(3):268-74.
10. Soukos N, Chen P, Morris J, Ruggiero K, Abernethy A, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006; 32(10):979-84.
11. Foschi F, Fontana C, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas A, et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2007; 39(10):782-7.
12. Fimple J, Fontana C, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis T, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008; 34(6):728-34.

13. Fonseca M, Júnior P, Pallota R, Filho H, Denardin O, Rapoport A, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg* 2008; 26(3):209-13.
14. Soukos N, Wilson M, Burns T, Speight P. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med* 1996; 18(3):253-9.
15. Hamblin M, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3(5):436-50.
16. Usacheva M, Teichert M, Biel M. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med* 2003; 33(5):311-9.
17. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992; 25(2):77-81.
18. Walsh L. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J* 2003; 48(3):146-55; quiz 98.
19. Sthal F, Ashworth SH, Jandt KD, Mills RW. Light-emitting diode (LED) polymerization of dental composites: flexural properties and polymerization potential. *Biomaterials, Guildford* 2000 ; 21(13):1379-85.
20. Garcez A, Nuñez S, Hamblin M, Ribeiro M. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 2008; 34(2):138-42.
21. Silva Garcez A, Núñez S, Lage-Marques J, Jorge A, Ribeiro M. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(4):e93-8.

ANEXOS

ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA PUCMINAS.....	57
ANEXO B: AFERIÇÃO DA POTÊNCIA DO APARELHO LASER TWIN FLEX MMOPTICS.....	58



Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

Belo Horizonte, 11 de dezembro de 2008.

De: Profa. Maria Beatriz Rios Ricci
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Para: Rodrigo Rodrigues Amaral
Programa de Mestrado em Odontologia

Prezado(a) pesquisador(a),

O Projeto de Pesquisa CAAE - 0185.0.213.000-08 "*Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares*" foi **aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas.

Atenciosamente,

Prof. Maria Beatriz Rios Ricci
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – PUC Minas



São Carlos, 26 de maio de 2009.

Equipamento: TWIN FLEX
N° série: TC-654

Prezado Dr. Rodrigo R. Amaral,

O equipamento enviado à MM Optics para manutenção sofreu os seguintes procedimentos:

1. Revisão geral;
2. Aferição da potência. OK;

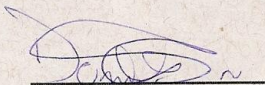
Valores aferidos:

Caneta 660	
Temperatura = 25,5°C	
Potência referente	Potência medida (mW)
5	5,41
10	10,1
15	15,6
20	20,1
25	25,0
30	30,8
35	35,9
40	39,9

Caneta 780	
Temperatura = 25,4°C	
Potência referente	Potência medida (mW)
5	6,1
10	10,5
15	15,7
20	20,7
25	25,9
30	31,0
35	35,8
40	40,7
50	50,1
60	61,0
70	70,6

Qualquer dúvida ou problemas com o equipamento, por favor, não hesite em nos contactar.

Cordialmente,


Danilo T. da Silva
Assistência Técnica

www.mmo.com.br