UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Maralize Ribeiro Nunes

DIFERENTES PARÂMETROS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA REDUÇÃO DE *Enterococcus faecalis* EM CANAIS RADICULARES

Taubaté – SP
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Maralize Ribeiro Nunes

DIFERENTES PARÂMETROS DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA REDUÇÃO DE *Enterococcus faecalis* EM CANAIS RADICULARES

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.
Área de concentração: Endodontia
Orientador: Prof. Dr. João Marcelo Ferreira de Medeiros
Co-orientadora: Prof. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

Taubaté – SP
2008

Ficha catalográfica elaborada pelo
SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU

N972d Nunes, Maralize Ribeiro
Diferentes parâmetros da terapia fotodinâmica na redução de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares / Maralize Ribeiro Nunes. - 2008.
79f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Taubaté, Programa de Pós-graduação em Odontologia, 2008.
Orientação: Prof. Dr. João Marcelo Ferreira de Medeiros, Departamento de Odontologia.

1. Terapia fotodinâmica. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. Lasers. 4. Tratamento do canal radicular. I. Título.

À Minha Família do Coração

Sem vocês eu não chegaria ao final desse caminho...

Se eu não tivesse esse pai, exemplo de competência, de integridade e, sobretudo de honestidade, eu não seria o que sou...

Se eu não tivesse essa mãe maravilhosa, exemplo de felicidade, de otimismo e de garra, eu não seria o que sou...

Juntando vocês dois, eu só tenho a agradecer pelo imenso amor e pelos ensinamentos de vida que, com certeza, me mostraram como lutar e sorrir sempre, e assim, a valorizar a vida como ela é!!

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador *Prof. Dr. João Marcelo Ferreira de Medeiros,* uma pessoa muito especial, modelo de bondade e alegria. Agradeço pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelo apoio e incentivo. Também pelos ensinamentos transmitidos durante meu estágio, essenciais para essa minha formação profissional. Seu estímulo e confiança me ajudaram a crescer muito!

À *Prof. Dra.Silvana Soléo Ferreira dos Santos,* excelente co-orientadora. Com rigor e disciplina, me instruiu conhecimentos em microbiologia, fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelo extremo cuidado, pela dedicação e por ser minha companheira durante todo esse percurso.

Ao *Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques,* devo agradecimentos sem fim. Uma pessoa maravilhosa que, com grande capacidade e profissionalismo, me deu a oportunidade de concretizar o meu ideal. Obrigada por me socorrer nos momentos desesperadores com muita calma e tranqüilidade...

À *Profa. Dra. Sandra Márcia Habitante,* pessoa muito querida. Agradeço pelos três anos de convivência... Sempre confiante e positiva, me incentivou a ingressar no mestrado, sem o qual eu não estaria aqui. Também agradeço pela oportunidade de contato com os alunos, despertando meu interesse em buscar esse título. Obrigada por me ensinar, por me ajudar e, sobretudo, pelo carinho.

À *Profa. Dra. Denise Pontes Raldi,* obrigada, obrigada, obrigada, obrigada e obrigada! Agradeço por toda a dedicação, disponibilidade, paciência, tempo... Enfim,

por estar ao meu lado em todo meu percurso. Aliás, em vários percursos! E o importante é que, mais que uma professora, agora é minha amiga!

À Coordenadora geral da pós-graduação em Odontologia, *Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves.* Agradeço pela imensa atenção e pela bela oportunidade de estar aqui... Uma pessoa admirável e muito competente, pela qual tenho enorme carinho. Obrigada por tudo.

À *Jane*, pela colaboração essencial. Sempre disposta a ensinar e a ajudar. Obrigada pela paciência e a persistência no meu trabalho, que como o próprio nome diz, deu muito trabalho!!

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, *Ivan, Marisa, Cristiane, Luzia, Karina, Guilherme e Karen,* pela disponibilidade em auxiliar e pela agradável convivência durante todo o meu experimento.

À minha amiga *Mari,* por tudo! Nos momentos desesperados, pelo apoio; nos bons, pelo estímulo; e nos normais, pela companhia e amizade!

Ao querido *Fúlvio,* uma pessoa muito especial. Obrigada por ter estado ao meu lado nessa etapa da minha vida, pela força nas horas difíceis, confiança e a torcida pelo meu sucesso.

À minha nova amiga *Carla*, agradeço pela imensa ajuda, pela boa vontade e pelo carinho.

À *DMC,* pelo desenvolvimento da fibra óptica utilizada nesse trabalho e pelo suporte científico oferecido.

À *CAPES,* pela concessão da bolsa de estudo durante o curso de mestrado.

Nunes MR. Diferentes parâmetros da terapia fotodinâmica na redução de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares [Dissertação de Mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Faculdade de Odontologia, 2008. 79p.

RESUMO

Objetivo: Avaliar, in vitro, a efetividade da terapia fotodinâmica, com e sem o uso da fibra óptica intracanal diante de diferentes períodos de irradiação, na redução de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares. **Método:** Foram utilizados sessenta dentes unirradiculares humanos, preparados e divididos em seis grupos (n=10), de acordo com o tratamento a ser realizado: G1, azul de metileno 0,01% (t=5min) e irradiação com laser de diodo por meio de fibra óptica intracanal (P=90mW), por um minuto e trinta segundos; G2, azul de metileno 0,01% (t=5min) e irradiação do mesmo modo que o G1, por três minutos; G3, azul de metileno 0,01% (t=5min) e irradiação sem fibra óptica intracanal (P=100mW), por um minuto e trinta segundos; G4, azul de metileno 0,01% (t=5min) e irradiação do mesmo modo que o G3 por três minutos; G5, hipoclorito de sódio 1% (t=15min); e G6, sem tratamento. Todas as amostras foram coletadas por meio de cones de papel esterilizados, antes e após os respectivos tratamentos e submetidas à cultura em placas de Petri contendo ágar BHI, em duplicata. Após 24 horas de incubação, promoveu-se a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL). **Resultados:** A aplicação de todos os tratamentos resultou em significativa redução dos microrganismos, apresentando-se em ordem decrescente de redução G5>G2>G4>G1>G3. Observou-se diferença estatisticamente significante entre os grupos G1 X G5 e G3 X G5. **Conclusões:** Os parâmetros utilizados nos diferentes grupos proporcionaram reduções intracanais significativas e semelhantes de *E. faecalis*; a utilização de potências máximas permitiu a redução do tempo de irradiação sem interferir a ação antimicrobiana; e o emprego da fibra óptica intracanal não influenciou de forma significativa nos resultados quando comparado ao uso da peça de mão.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; *Enterococcus faecalis*; Lasers; Tratamento do canal radicular.

Nunes MR. Different parameters of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* within root canals [Dissertação de Mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Faculdade de Odontologia, 2008. 79p.

ABSTRACT

Objective: To evaluate in vitro the effectiveness of photodynamic therapy on the reduction of *Enterococcus faecalis* in root canals, with and without use of the optical fiber into the canal in front of different period of time irradiation. **Method:** Sixty human single-root teeth were prepared and divided into six groups, in accordance with the treatment: G1, methylene blue 0,01% (t=5min) and irradiation by diode laser with intracanal optic fiber (P=90mW) for one minute and thirty seconds; G2, methylene blue 0,01% (t=5min) and irradiation the same way that G1, for three minutes; G3, methylene blue 0,01% (t=5min) and irradiation without optic fiber (P=100mW) for one minute and thirty seconds; G4, methylene blue 0,01% (t=5min) and irradiation the same way that G3 for three minutes; G5, 1% sodium hypochlorite (t=15min); and G6, without treatment. All the samples were collected by sterilized paper points, before and after respective treatments, and submitted to microbiological culture plated on BHI ágar duplicated. After 24 hours of incubation, it was performed the evaluation of colony-forming units (CFU/mL). **Results:** The application of all treatments resulted in significant reduction of microorganisms' viability, showing in reduction's decreasing order: G5>G2>G4>G1>G3. Significant statistical differences were observed among the groups G1 X G5 and G3 X G5. **Conclusions:** All the parameters used in the groups afforded significant and similar numerical reduction of *E. faecalis*; the use the maxim powers allowed a reduction of the irradiation time without compromise the antimicrobial effect; and the use of the intracanal optic fiber didn't influence the results when compared with the use of hand peace.

Keywords: Photochemotherapy; *Enterococcus faecalis*; Lasers; Root canal therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AsGaAl – Arseneto de gálio-alumínio

BHI – Brain heart infusion (infusão cérebro coração)

°C – Graus Celsius

CO_2 – gás carbônico

DNA – ácido desoxiribonucléico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

Er: YAG – Granada de ítrio-alumínio dopada com érbio

g – grama

J – Joule

J/cm² – Joule por centímetro quadrado

He-Ne – Hélio-neônio

Hz – Hertz

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

LASER – Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation

Log – logarítimo

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

mW - miliwatt

NaOCl – hipoclorito de sódio

Nd: YAG – Granada de ítrio-alumínio dopada com neodímio

nm – nanômetro

O_2 – Oxigênio molecular

O_2^- – ânion superóxido

OH – radical hidroxila

PDT – photodynamic therapy

s – segundos

UFC – unidade formadora de colônia

W – Watt

µg – micrograma

µl – microlitro

µm – micrômetro

% – por cento

< – inferior

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo das etapas para formação de espécies reativas 22

Figura 2 – Secagem e fixação das amostras na placa de cultura de células 39

Figura 3 – Distribuição das amostras nos orifícios das placas de cultura de células 39

Figura 4 – Esquema representativo para obtenção da suspensão de concentração final de *E. faecalis* 40

Figura 5 – Contaminação das amostras com a suspensão final de *E.faecalis* e selamento da entrada dos canais radiculares 41

Figura 6 – Esquema representativo das coletas, diluições seriadas e plaqueamento 42

Figura 7 – Equipamento Thera Lase (DMC) - laser de diodo de baixa potência 43

Figura 8 – Peça de mão original do equipamento de 600µm e fibra óptica intracanal de 216µm desenvolvida pelo fabricante (DMC) 44

Figura 9 – Preenchimento das amostras com azul de metileno 0,01% 45

Figura 10 – Irradiação laser por meio de fibra óptica intracanal 45

Figura 11 – Irradiação laser sem a utilização de fibra óptica intracanal 46

Figura 12 – Parâmetros utilizados nos grupos experimentais do grupo piloto 47

Figura 13 – Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) 49

Figura 14 – Representação gráfica das médias do log UFC/mL de *E. faecalis* presentes nas contagens antes e depois dos tratamentos 51

Figura 15 – Representação gráfica das médias das porcentagens de redução de UFC/mL, desvio padrão e análise estatística entre os grupos experimentais. Barras representadas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%, por meio do teste Kruskal-Wallis 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias iniciais e finais das UFC/mL de *E. faecalis* em valores exponenciais (número) e logarítmico (log), médias das porcentagens de redução (%) e o desvio padrão (DP) dos grupos experimentais 50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DE LITERATURA 19

2.1 Histórico 19

2.2 Mecanismo de ação 20

2.3 Terapia fotodinâmica na odontologia 23

2.4 Terapia fotodinâmica na endodontia 29

3 PROPOSIÇÃO 35

4 MÉTODO 36

4.1 Seleção da amostra 36

4.2 Preparo e instrumentação dos espécimes 36

4.2.1 Vedamento e impermeabilização externa das raízes 37

4.2.2 Inclusão em placas de poliestireno 38

4.3 Preparo da suspensão de *Enterococcus faecalis* 39

4.3.1 Contaminação dos espécimes 41

4.4. Coleta prévia ao tratamento 42

4.5. Divisão dos espécimes 43

4.6 Coleta após tratamento 48

4.7 Análise estatística 49

5 RESULTADOS 50

6 DISCUSSÃO 53

6.1 Discussão da importância do tema 53

6.2 Discussão da metodologia empregada 55

6.3 Discussão dos resultados 60

7 CONCLUSÃO **64**

REFERÊNCIAS **65**

APÊNDICES **73**

ANEXO **79**

1 INTRODUÇÃO

A desinfecção do sistema de canais radiculares exerce um papel fundamental durante a terapia endodôntica por estar intimamente ligada ao sucesso do tratamento instituído. Sabe-se que o processo de sanificação é obtido durante o preparo e limpeza do canal radicular, no qual a ação mecânica de instrumentos, manuais e/ou rotatórios, ocorre simultaneamente ao uso de substâncias químicas visando à completa eliminação de microrganismos, matéria orgânica viva ou em decomposição.

Entretanto, a variedade e a complexidade da anatomia interna dental permitem que microrganismos e remanescentes teciduais persistam em túbulos dentinários, canais laterais, istmos e reentrâncias, dificultando assim o tratamento.

Além do mais, sabe-se que alguns microrganismos, a exemplo do *Enterococcus faecalis*, têm mostrado resistência às manobras mecânicas e às medicações, dificultando o processo de descontaminação (Ferrari et al., 2005). Trata-se de um microrganismo anaeróbio facultativo, o qual consegue resistir muitas vezes aos agentes antimicrobianos como: o hipoclorito de sódio (Buck et al., 2001), a clorexidina (Buck et al., 2001; Dunavan et al., 2006), o hidróxido de cálcio (Distel et al., 2002; Ferrari et al., 2005), além de diversos antibióticos (Dahlen et al., 2000). Isso se deve ao fato dessa espécie de bactéria ser capaz de formar biofilme no canal radicular (Distel et al., 2002), o que o torna apto para sobreviver em ambientes diversos (George et al., 2005) por longo período (Sedgley et al., 2005). Dessa forma destaca-se por estar comumente associado aos casos de infecção persistente e conseqüente insucesso endodôntico (Stuart et al., 2006).

Diversos estudos avaliaram associações entre os agentes antimicrobianos já reconhecidos visando potencializar sua ação (Zehnder et al., 2003; Sire'n et al., 2004; Oztan et al., 2006). No entanto, a substância ideal ainda não foi encontrada.

Na busca pela descontaminação, os lasers de alta potência têm sido empregados no interior dos canais radiculares apresentando propriedades capazes de provocar maior limpeza das paredes dentinárias, alterar sua permeabilidade e, sobretudo, diminuir significantemente a microbiota endodôntica. Como resultado, a literatura demonstra que os lasers de alta potência promovem uma redução bacteriana que supera 90% na maioria dos casos (Gutknecht et al.,1996; Moritz et al., 1997; Gutknecht et al., 2000; Schoop et al., 2004). Tal fato é decorrente da alta energia liberada por meio de fibra óptica intracanal, a qual destrói os microrganismos pelo aumento da temperatura.

Entretanto, o alto custo desses aparelhos ainda limitam sua aplicação.

A partir da década de noventa uma nova modalidade terapêutica, denominada terapia fotodinâmica ou PDT (Photodynamic Therapy), passa a ser pesquisada na endodontia com o intuito de superar as limitações dos lasers de alta potência e manter uma ação antimicrobiana eficiente. Estudos têm revelado resultados importantes e satisfatórios, com os quais se consegue uma redução bacteriana significativa no sistema de canais radiculares (Seal et al., 2002; Garcez, 2002; Bonsor et al., 2006; Soukos et al., 2006; Wiliams et al., 2006).

Essa terapia parte do princípio que a associação entre uma luz proveniente de laser de baixa potência e um fotossensibilizador (corante), na presença de oxigênio, resulta em espécies reativas citotóxicas capazes de inviabilizar as células (Machado, 2000). Dessa forma, os microrganismos em contato com o corante tornam-se susceptíveis a luz a ser irradiada, a qual induzirá uma reação fotoquímica

com formação de radicais livres e oxigênio singleto. Estes são os produtos responsáveis pela invasão e ruptura da parede celular bacteriana, levando a destruição do microrganismo.

A terapia fotodinâmica torna-se conveniente devido ao custo reduzido em relação ao laser de alta potência, a rápida destruição bacteriana (Garcez et al., 2003) e, principalmente, ao modo atraumático em relação aos tecidos circundantes, uma vez que seu efeito antimicrobiano não ocorre por aumento de temperatura (Zanin et al., 2003).

Entretanto a seleção e a concentração do corante, o tempo de pré-irradiação, o tempo de irradiação, a potência e o modo de operação utilizados nos estudos, entre outros, constituem ainda uma gama de variáveis, as quais não permitiram estabelecer um protocolo ideal para o uso da terapia fotodinâmica. Deste modo, julga-se necessário o desenvolvimento de pesquisas adicionais que aumentem sua efetividade, visto que tem se mostrado recentemente como uma alternativa de tratamento.

Considerando que o princípio de ação da terapia fotodinâmica difere do princípio do laser de alta potência, uma vez que não se fundamenta pelo aumento de temperatura; e, partindo-se do exposto que não foi estabelecido um protocolo ideal, é de grande valia a realização de estudos que avaliem a efetividade da terapia utilizando-se diferentes períodos de irradiação, empregando-se ou não a fibra óptica intracanal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

A terapia fotodinâmica tem origem no século XX, mais precisamente em 1898 na Alemanha, quando Oscar Raab e Herman von Tappeiner apud Ackroyd et al. (2001) constataram em seus estudos que o corante vermelho de acridina, na presença da luz solar, era letal ao protozoário *Paramecium* causador da malária.

Em seguida o medico francês Prime utilizou o corante eosina via oral no tratamento de epilepsia e observou que as áreas expostas à luz solar induziam o aparecimento de dermatite (Ackroyd et al., 2001).

Baseado nessas descobertas, Von Tappeiner e Albert Jesionek em 1903 apud Ackroyd (2001) analisaram o efeito da eosina em tumores cutâneos. Para tanto, utilizaram o corante na forma de solução tópica 5%, associado à aplicação de luz branca, obtendo sucesso no tratamento.

Em 1907 esses mesmos autores demonstraram também que a presença de oxigênio era fundamental para que houvesse a reação de fotossensibilização. Diante dessas descobertas denominou-se essa reação de terapia fotodinâmica.

Alguns estudos realizados em camundongos e ratos constataram um acúmulo de fotossensibilizadores preferencialmente na área dos tumores. Posteriormente verificaram também que, com a presença de luz incidente na região dos mesmos, obtinha-se como resultado a regressão da doença (Dougherty et al.,1975).

Dessa forma a terapia fotodinâmica passou a ser reconhecida como uma alternativa de tratamento para tumores.

A partir daí, diversas pesquisas buscavam o desenvolvimento da terapia fotodinâmica objetivando combater especificamente as células cancerígenas. Inicialmente a terapia estava voltada à dermatologia e, posteriormente, expandiu-se aos tumores em geral.

Em tratamentos dermatológicos, a solução fotossensibilizadora deve ser administrada topicamente, enquanto nos demais casos, a droga deve ser conduzida por via intravenosa. Após a administração do fármaco, respeita-se o tempo de pré-irradiação, tempo esse necessário para que haja o acúmulo do mesmo no tumor. Em seguida realiza-se a irradiação no local desejado, para que a luz ative o composto levando ao colapso das células cancerígenas e, consequentemente, a cura do paciente (Simplicio et al., 2002).

2.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da PDT é baseado em uma reação fotoquímica, que envolve a ativação de luz proveniente de um laser de baixa potência, na presença de oxigênio, associada a um corante.

Os corantes ou fotossensibilizadores são compostos que absorvem a energia de um específico comprimento de onda coincidente com o espectro de absorção do corante, induzindo reações em moléculas não absorventes (Sibata et al., 2000).

Os fotossensibilizadores possuem uma configuração eletrônica estável no estado de repouso ou fundamental. Quando o fotossensibilizador absorve a energia da luz incidente, sua molécula é ativada do estado fundamental (^{0} FS) para um estado excitado (Tuite & Kelly, 1993). Esse estado excitado do corante, denominado singleto (^{1} FS*), é altamente reativo e instável com meia vida curta de 10^{-6} segundos. Assim sendo, pode retornar rapidamente ao estado fundamental ou converter-se espontaneamente para o estado tripleto (^{3} FS*), com um nível de energia mais baixo e meia vida mais longa, aumentando sua probabilidade de reação com substratos biológicos. Deste modo, a partir do estado tripleto, podem ocorrer dois mecanismos foto-induzidos que geram espécies reativas, as quais podem resultar na morte celular (Figura 1):

Mecanismo tipo 1, no qual há transferência de elétrons entre o estado tripleto e os substratos biológicos oxidáveis, levando a formação de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres como superóxido (O^{2-}), hidroxila (OH), peróxido (H_2O_2) e peróxidos lipídeos (Wainwright, 1998; Metcalf et al., 2006).

Mecanismo tipo 2, no qual há transferência de energia do estado tripleto para as moléculas de oxigênio intracelular no estado fundamental, gerando o oxigênio singleto, poderoso agente oxidante e altamente tóxico para as células (Gabrielli et al., 2003).

Os dois tipos de reação podem ocorrer concomitantemente.

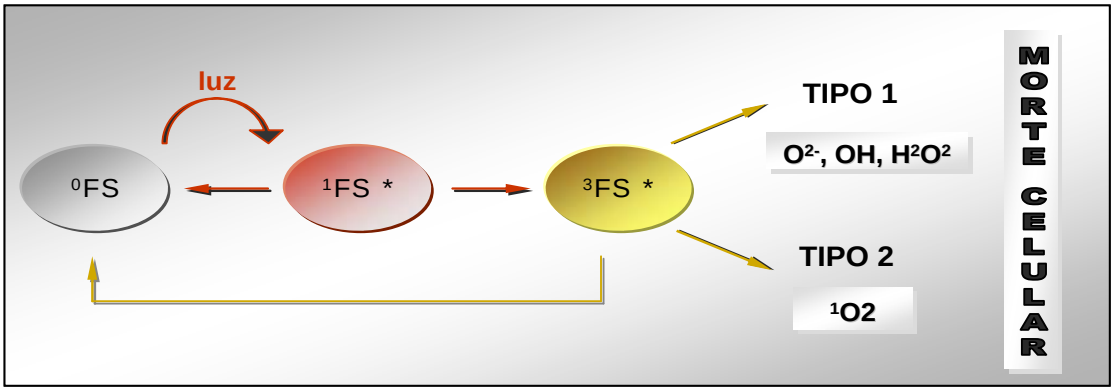

Figura 1 – Esquema representativo das etapas para formação de espécies reativas

Ambos radicais livres e oxigênio singleto são citotóxicos e atuam em diferentes componentes celulares, causando danos nos ácidos nucléicos, lipídeos da membrana celular e proteínas, por meio de reações de oxidação ou redução (Keene et al., 1986; Maisch, 2007).

A inativação celular pode ocorrer por dois processos: pela indução de apoptose ou necrose. O processo necrótico é caracterizado pelo rompimento da membrana plasmática, uma vez que a célula aumenta de volume e derrama o conteúdo celular. Esse vazamento pode causar dano às células vizinhas além de causar inflamação (Plaetzer et al., 2005).

A apoptose baseia-se pelo suicídio da célula quando a mesma já não é mais necessária no organismo, acarretando uma diminuição do volume celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, os quais impedem o extravasamento de matriz intracelular para o meio extracelular. Assim, a apoptose é um processo ativo com características mais favoráveis que a necrose, uma vez que não está relacionada com a inflamação severa (Plaetzer et al., 2005).

Tem sido observado que os fotossensibilizadores, após excitação pela luz e formação de oxigênio singleto, induzem a morte celular por apoptose (Agostinis et

al., 2004) uma vez que agem na mitocôndria organela fundamental no processo apoptótico.

2.3 Terapia fotodinâmica em odontologia

Diante dos importantes resultados obtidos na área médica, novas pesquisas em terapia fotodinâmica têm sido fortemente estimuladas. Dessa forma, houve uma grande expansão desse sistema para a área da odontologia, sendo utilizada atualmente na destruição de microrganismos presentes em lesões cariosas, infecções periodontais e, mais recentemente, infecções endodônticas.

Williams et al. (2003) avaliaram a efetividade da terapia fotodinâmica na destruição de *Streptococcus mutans* em suspensão. Os microrganismos foram corados com azul de O-toluidina e expostos ao laser diodo (633nm), com tempo de irradiação variando de cinco a sessenta segundos e doses de energia de 0,4 a 4,8J. O sistema foi altamente eficaz na eliminação desses microrganismos, aumentando sua ação conforme foi aumentada a dose de energia distribuída. Doses iguais ou superiores a 1,8J resultaram em 100% de destruição das bactérias presentes. Tanto o uso isolado do corante como o do laser não se verificou a ocorrência de efeito antimicrobiano nas condições estudadas.

Chan & Lai (2003) submeteram culturas de patógenos periodontais às radiações do laser He-Ne, comprimento de onda de 632nm (30mW de potência) e de laser diodo, 665nm e 830nm (ambos com 100mW), na presença ou ausência de azul de metileno como fotossensibilizadora. Os microrganismos foram expostos às irradiações por trinta e sessenta segundos. O grupo controle não recebeu o corante

nem irradiação do laser. Os resultados indicaram que a exposição ao laser diodo de 665nm (durante 60s), na presença do fotossensibilizadora, indicou a melhor terapia. Esta foi capaz de eliminar 95% de *Actinomyces actinomycetemcomitans* e *Bacterium fusonucleatum*, e 99% a 100% de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Streptococcus sanguis*. Concluíram que a PDT pode ser usada prevenindo a recolonização de lesões subgengivais.

Comparando uma fonte de luz convencional com laser de baixa potência, Matevski et al. (2003) avaliaram o efeito entre uma lâmpada Xenon com filtro vermelho e o laser de He-Ne (632,8nm) em *P. gingivalis* in vitro. O corante utilizado foi o azul de toluidina (TBO) (50µg/ml) por cinco minutos, com diferentes intensidades de luz (10, 25 e 100mW/cm^2). O efeito antimicrobiano significante foi observado quando utilizada a lâmpada Xenon com os parâmetros de 100 mW/cm^2, 10J/cm^2 e 12,5µg/ml TBO. Os autores concluíram que a lâmpada de Xenon pode ser tão eficiente quanto à luz laser, entretanto, o aumento de temperatura promovido pela luz convencional pode comprometer a aplicação clínica.

Zampieri et al. (2003) avaliaram o efeito da terapia fotodinâmica, in vitro, em bactérias da microflora bucal *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*, diante de diferentes densidades de energia. Foi utilizado o azul de toluidina (75µg/ml) e potência de 30mW, variando-se a densidade em 3, 6 e 9J/cm^2. A redução bacteriana encontrada para tais densidades, respectivamente, foi 83,3%, 84,9% e 77,6% para *S. mitis* e 98,9%, 92,6%, 94,3% para *S. sanguis*.

Feuerstein et al. (2004) avaliaram o efeito fototóxico da luz visível azul em dois patógenos gram-positivos e dois gram-negativos, sem fotossensibilizadores. As fontes de luz empregadas no experimento (lâmpada halógena, LED e lâmpada Xenon) possuem comprimento de onda entre 400-500nm e são comumente usadas

para polimerização de materiais restauradores. Densidades máximas de cada aparelho (260-416, 520 e 1144 mW/cm^2, respectivamente) foram aplicadas sobre as bactérias em períodos de um, 1.5, dois, 2.5 e três minutos. Observaram efeito fototóxico em *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, entretanto, para *Streptococcus mutans* e *E. faecalis* não houve o mesmo efeito. Concluíram que tais fontes de luz, sem fotossensibilizador, exerceram efeito fototóxico nos patógenos gram-negativos *P. gingivalis* e *F. nucleatum* .

Zanin et al. (2005) compararam o efeito do azul de toluidina associado ao laser He-Ne ou ao LED, na viabilidade do biofilme de *S. mutans* formado em três, sete e dez dias. As densidades de energia utilizadas foram 49J/cm^2 (cinco minutos), 147J/cm^2 (15 minutos) e 294J/cm^2 (trinta minutos). Observaram redução do biofilme com ambas as fontes de luz, embora o efeito bactericida tenha sido proporcional à dose de energia. Também concluíram que o biofilme formado por maior tempo foi menos susceptível à terapia fotodinâmica.

A fim de avaliar o efeito da terapia fotodinâmica sobre biofilmes organizados, Zanin et al. (2006) determinaram os níveis de destruição de biofilmes formados após a terapia fotodinâmica, em *Streptococcus mutans, S. sobrinus, S. sanguinis*. Foi utilizado o azul de toluidina O, na concentração de 0,1mg/ml, associado a 85,7J/cm^2 emitidos por laser de diodo. Uma significante redução (95% aproximadamente) foi observada para *S. mutans* e *S. sobrinus*; enquanto que para *S. sanguinis* a redução do biofilme atingiu 99,9%.

Avaliando o efeito fungicida da terapia fotodinâmica, Souza et al. (2006) estudaram sua ação em suspensões de *Candida albicans, C. dubliniensis, C. krusei e C. tropicalis.* As amostras foram irradiadas por laser de Diodo (685nm e 28J/cm^2) e uso de azul de metileno a 0,1%. As espécies que receberam apenas o corante ou

apenas a irradiação não foram afetadas. A radiação na presença do corante reduziu o número de UFC em 88,6% para *C. albicans*, 84,8% para *C. dubliniensis,* 91,6% para *C. krusei e* 82,3% para *C. tropicalis.* Concluíram o efeito fungicida da terapia em espécies de *Candida*, nos parâmetros estudados.

Prates et al. (2006) investigaram a capacidade de destruição do verde de Malaquita (MG) combinado ao laser de baixa potência em *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Analisaram também a fotodegradação do MG após terapia fotodinâmica (PDT) através de um espectroscópio de absorção óptica. As culturas foram expostas a 30mW de laser diodo, na presença e ausência do corante, valendo-se de dois tempos de exposição: t =3min (energia de 5.4J/cm²) e t =5min (energia de 9J/cm²). Observaram *A. actinomycetemcomitans* podem ser inativadas pelo laser na presença do corante, principalmente com a maior dose de energia (99.9%). Entretanto, a irradiação na ausência de MG não foi capaz de destruir bactérias. O espectroscópio demonstrou que os picos de absorção do verde de Malaquita diminuíram após irradiação, concluindo que o corante se degrada com o tempo de exposição ao laser.

Acredita-se que a existe uma correlação entre a eficácia de cada corante e a formação de dímeros na presença de bactérias, o que prejudica sua ação. Usacheva et al. (2003), estudaram a interação entre azul de metileno e azul de toluidina e *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis, Hemophilus influenzae, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para cada bactéria há uma dimerização dos corantes. A análise indicou maior formação de dímeros para azul de toluidina a azul de metileno. Além disso, as bactérias gram-negativas induziram maior dimerização que as gram-positivas.

Bevilacqua et al. (2007) estudaram o efeito da PDT sobre *S. mutans*, utilizando o azul de toluidina e LED. Os parâmetros do aparelho eram: potência de 116mW, energia de 21J e fluência de 2,18J/cm^2. Os autores constataram que 100% das bactérias foram eliminadas.

Buscando avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica em células hospedeiras do tecido normal adjacente, Soukos et al. (1996), avaliaram in vitro queratinócitos e fibroblastos gengivais humanos sadios submetidos a diferentes concentrações de azul de o toluidina (0,5 a 50µg/ml) por cinco minutos. O laser utilizado foi o Helio-Neonio com potência de 7,3mW por dois minutos (0,876J). A maior concentração do corante que não demonstrou alteração na viabilidade das células estudadas, dentro dos parâmetros estabelecidos, foi de 2µg/ml para queratinócitos e de 5µg/ml para fibroblastos. Entretanto, para a destruição de *S. sanguis*, foi necessária uma exposição de 75 segundos (0,547J), na presença de 2,5µg/ml de TBO, possibilitando o uso da terapia em doenças periodontais.

Bhatti et al. (2000) avaliaram a combinação do corante a um anticorpo com a finalidade de atingir especificamente cepas de *P. gingivalis*, na presença de *S. sanguis* e fibroblastos humanos gengivais. O corante utilizado foi o azul de toluidina na concentração de 4µg/ml e a irradiação foi realizada por meio do laser He-ne , na potência de 7,3mW e dose de energia de 4,4J. Entretanto um grupo possuía o anticorpo conjugado ao azul de metileno. Neste grupo, puderam observar uma redução significativa de *P. gingivalis*, não obtida para o *S. sanguis*. Os autores concluíram que a utilização de um anticorpo combinado ao fotossensibilizador pode permitir que ocorra a destruição de um alvo específico.

Paulino et al. (2005) investigaram o efeito da PDT sobre *S. mutans* e fibroblastos, previamente tratados com diferentes concentrações de Rosa Bengala,

empregando um fotopolimerizador (HHP) como fonte de luz. As concentrações variaram de 0 a 50µM, submetidos aos diferentes períodos de irradiação (zero a quarenta segundos). O corante mostrou-se tóxico no escuro quando em concentrações superiores a 5µM. Entretanto, a concentração de 0,5µM em associação com a luz permitiu a destruição de 100% de *S. mutans*, sem afetar a viabilidade dos fibroblastos.

Embora os trabalhos realizados in vitro exerçam grande importância, são necessários testes em cobaias, previamente a aplicação clínica, para que haja maior contribuição e uma avaliação mais rigorosa. Komerick et al. (1998) testaram o efeito da terapia fotodinâmica em mucosa oral de ratos, utilizando-se para tanto, diferentes parâmetros. Variaram a concentração do corante azul de O toluidina (50 a 200µl/ml), o tempo de pré-irradiação (cinco segundos a vinte minutos), a dose de irradiação (50 a 200J/cm^2), além do uso isolado do corante e do laser. Os autores constataram ausência de alterações antiinflamatórias ou necrose na mucosa dos ratos estudados, após 72 horas, frente aos parâmetros utilizados.

Komerick et al. (2003) avaliaram se a terapia fotodinâmica seria capaz de destruir *P. gingivalis* inoculados em molares de ratos e se resultaria na diminuição da bolsa periodontal. Os animais foram expostos ao azul de toluidina nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1mg/ml em combinação com doses de energia de 6, 12, 24 e 48J, provenientes de laser de diodo (630nm) com fibra óptica. Esse estudo mostrou que 1mg/ml de corante foi o suficiente para reduzir a viabilidade de *P. gingivalis*, usando uma exposição de apenas um minuto (6J). Além disso, observaram diminuição da bolsa periodontal, sem causar danos aos tecidos periodontais adjacentes.

2.4 Terapia fotodinâmica em endodontia

Com base nas evidências mostradas na literatura, a partir dessa década, a terapia fotodinâmica passa a ser pesquisada em canais radiculares, visando a eliminação dos microrganismos envolvidos com infecções endodônticas.

Silbert et al. (2000) avaliaram a Terapia Fotodinâmica quanto à sua capacidade de reduzir a contaminação bacteriana em canais radiculares contaminados com *S. mutans* e *E. faecalis*. Assiciaram o corante azul de metileno a uma fonte de laser de diodo (IGaAlP) de 670nm de comprimento de onda por períodos de 30 a 240 segundos. Concluiu-se que a TFD pode ser um efetivo método de redução bacteriana intracanal, porém os parâmetros devem ser ajustados para se obter uma eliminação mais eficaz.

A utilização do laser de baixa potência (He-Ne) associado ao corante azul de O-toluidina em canais radiculares foi testada por Seal et al. (2002). Os autores determinaram in vitro a eficácia bactericida da PDT frente à *Streptococcus intermedius* e compararam seu efeito ao do hipoclorito de sódio a 3%, por dez minutos. Utilizaram combinações de quatro concentrações de azul de O-toluidina (12.5, 25, 50, 100µg/mL), tempo de pré-irradiação de 60, 90, 120, 300, 600s e cinco doses de energia (2.1, 3.2, 4.2, 10.5, 21J). O laser foi aplicado na cavidade de acesso dos canais radiculares, com potência de 35mW, sem a introdução de fibra óptica. A maior redução bacteriana foi encontrada com a associação de 100µg/mL de corante e seiscentos segundos (21J de energia), porém não tão efetiva quanto à irrigação com o NaOCl, que apresentou 100% de eliminação bacteriana.

Analisando a terapia fotodinâmica na redução de *E. faecalis* inoculados em canais radiculares in vitro, Garcez et al. (2006) associou o laser de diodo (685nm) a

uma pasta de corante azuleno (25%) e endo PTC, comparando-a ao uso do hipoclorito de sódio 0,5%. Para tanto, o tempo de pré-irradiação do corante foi de cinco minutos, a irradiação realizada com fibra óptica intracanal (potência de 10mW) por três minutos e com energia de 1,8J. Nos resultados, tanto o sensibilizador quanto o laser sozinhos não obtiveram efeito bactericida. A solução química por trinta minutos reduziu o número de bactérias em 93,25%, enquanto a terapia fotodinâmica resultou em 99,2%, podendo ser usado como adjunto ao tratamento endodôntico.

Williams et al. (2006) examinaram a aplicação da desinfecção fotoativada em suspensão e em canais radiculares. Em suspensão avaliaram a ação antimicrobiana contra *F. nucleatum*, *P. micros, P. intermedia e S. intermedius*. O fotossensibilizador (Tolonium chloride) foi empregado por sessenta segundos, havendo variação em sua concentração. O laser usado no experimento foi o diodo (633nm), potência de 80mW, variando-se a dose de energia (2.4, 4.8 e 7.2J) e o tempo de exposição (30, 60 e 90s). Para os canais radiculares, *S. intermedius* foram inoculados tanto em blocos artificiais quanto em dentes humanos extraídos. O tratamento fotoativado seguiu os parâmetros anteriormente citados, acrescentando-se apenas o uso de uma fibra óptica intracanal de 400µm de diâmetro. Encontraram significante redução bacteriana com a associação de corante e luz, quando comparada à luz e ao corante sozinhos. A efetividade aumentou com o aumento da dose de energia, porém o aumento de concentração do corante não foi um fator importante.

Também Soukos et al. (2006) avaliaram os efeitos da terapia fotodinâmica em suspensão bacteriana (*Porphyromonas gingivalis, P. intermedia, Fusobacterium nucleatum, Peptostreptococcus micros, Porphyromonas endodontalis* e *E. faecalis*) e em biofilme de *E. faecalis* em dentes extraídos humanos. Os microrganismos foram

sensibilizados com azul de metileno (25µg/mL) por cinco minutos e expostos à luz vermelha de 665nm. Em suspensão, a fluência de 30J/cm² eliminou todas as espécies, exceto *E. faecalis* (destruição de 53%). Em dentes, a mesma concentração do corante associada à luz vermelha (222J/cm²) foi capaz de eliminar 97% do biofilme de *E. faecalis*, usando uma fibra óptica com difusores cilíndricos que distribuíam a luz uniformemente em 360 graus. Concluíram que a PDT pode ser desenvolvida como adjunto na destruição de bactérias residuais em canais radiculares.

Fonseca (2006) obteve resultados significativos com a PDT em canais radiculares. O laser de diodo (660nm) com potência de 50mW por 320 segundos, associado ao azul de toluidina a 0,0125% (5min), mostrou-se viável como agente bactericida contra *E. faecalis* obtendo 99,9% de redução.

Entretanto, segundo Brasil (2006) a terapia fotodinâmica não exerceu efeito fungicida contra *Candida albicans* em canais radiculares bovinos. A autora utilizou azuleno 25% associado ao Endo PTC e irradiação com laser de diodo (685nm). A forma de irradiação foi com fibra óptica (P=15mW) por dois minutos e sem a fibra (P=40 mW) por mais dois minutos. A descontaminação foi alcançada somente com o uso do hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos.

PDT foi então utilizada em canais radiculares in vivo por Bonsor et al. (2006). Compararam o efeito da solução de ácido cítrico 20% associada à terapia fotoativada, com o da solução de ácido cítrico e hipoclorito de sódio 2,5%. No grupo um, as amostras foram obtidas após o acesso; após alargamento e terapia fotodinâmica; e após uso de ácido cítrico e hipoclorito de sódio. No grupo dois, as amostras foram obtidas após o acesso; após o preparo com ácido cítrico e hipoclorito de sódio 2,25%; e após subseqüente tratamento fotoativado. Em ambos o

fotossensibilizador foi agitado por sessenta segundos e a irradiação realizada com fibra óptica posicionada 4mm dentro do canal, por sessenta segundos. A luz foi distribuída por dois minutos em cada canal, com potência de 100mW e dose de energia de 12J. Concluíram que a desinfecção foto-ativada se mostrou tão efetiva quanto à técnica convencional químico-mecânica, podendo diminuir o tempo de desinfecção do canal radicular.

Bonsor et al. (2006) avaliaram o efeito microbiológico da desinfecção foto ativada como adjunto na descontaminação de canais radiculares in vivo, após terapia endodôntica convencional. Para tanto, *Tolonium chloride* foi utilizado no interior do canal e uma ponta emissora de luz proveniente de laser de diodo, a 100mW, foi inserida 4mm dentro do mesmo, por dois minutos. Após a PDT, os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio 2,5%, para remoção da solução fotossensibilizadora. Dos trinta canais avaliados, quatro permaneceram infectados após a terapia convencional e, após a terapia fotodinâmica, três apresentaram cultura negativa. No único em que ainda havia presença de bactéria, a fibra mostrou-se fraturada, reduzindo a efetividade da luz. Os autores concluíram que o sistema PDT pode destruir as bactérias residuais após tratamento endodôntico convencional.

Associando também a terapia fotodinâmica ao tratamento convencional em canais radiculares, Garcez et al. (2007), compararam in vitro a efetividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica, do tratamento convencional e da combinação de ambos para eliminação de biofilme bacteriano em canais radiculares. Foram inoculadas bactérias gram-negativas bioluminescentes (*Proteus mirabiles, Pseudomonas aeruginosa*) por três dias para formação de biofilme em dentes preparados. Na PDT foi utilizada a conjugação de clorina e polietileno como fotossensibilizadora, e laser de diodo (660nm) com distribuição da luz por meio de

fibra óptica (200µm). Tal terapia foi comparada e combinada com o tratamento convencional usando debridamento químico e mecânico. Os autores constataram redução bacteriana, por meio da bioluminescência, em 90% com tratamento endodôntico convencional; 95% com PDT e 98% com a associação das mesmas. Concluíram que a imagem bioluminescente é um eficiente caminho para monitorar a terapia endodôntica.

George & Kishen (2007), fizeram uma análise fotofísica, fotoquímica e fotobiológica do azul de metileno dissolvido em diferentes formulações em canais radiculares. Para tanto água, glicerol 70%, polietilenoglicol 70% e a combinação de glicerol/etanol/água (30:20:50) foram analisados. A agregação de moléculas de azul de metileno depende da concentração molar do mesmo, o que é significante maior em água, quando comparado com outras formulações. A formulação combinada efetivamente penetra nos túbulos dentinários. Embora a afinidade do corante para *E. faecalis* (gram positivo) e *A. actinomycetemcomitans* (gram negativo) tenha sido alta na formulação baseada em água, seguida da combinada; esta significantemente aumentou a geração de oxigênio singleto e a foto oxidação de substratos, quando comparada às outras formulações. Também avaliaram tais formulações na redução de biofilme formado por esses microrganismos. A formulação combinada (glicerol/etanol/água) demonstrou desinfecção de canais radiculares, frente ao biofilme bacteriano.

Garcez et al. (2008) analisaram o efeito da terapia fotodinâmica em associação com o tratamento endodôntico. Foram selecionados vinte pacientes, nos quais foram coletadas amostras microbiológicas após a cirurgia de acesso, após a terapia endodôntica e após a PDT. O fotossensibilizador foi deixado dentro do canal por dois minutos e, então, irradiado por meio de uma fibra óptica de 300µm de

diâmetro, proveniente de laser de diodo (660nm). Com uma potência de 40mW, os canais foram irradiados por 240 segundos, perfazendo uma energia de 9,6J. Ao final da primeira sessão os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio e, após uma semana, foi realizada nova coleta para avaliação de recolonização. Uma segunda terapia endodôntica e PDT foram realizadas, como citadas anteriormente. Na primeira sessão, a terapia endodôntica permitiu uma redução de 1,08 log e a combinação com a PDT, uma redução de 1,83 log. A segunda sessão mostrou uma diminuição similar à primeira (1,14 log) e a PDT foi significantemente maior que a primeira. Resultados sugerem que o uso da PDT em conjunto com o tratamento endodôntico conduz a uma diminuição bacteriana, podendo ser utilizado como coadjuvante no tratamento de infecções orais.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar, in vitro, a efetividade da terapia fotodinâmica com e sem o uso da fibra óptica intracanal, diante de diferentes períodos de irradiação, na redução de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares.

4 MÉTODO

4.1 Seleção da amostra

Esse estudo teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté em 30 de novembro de 2007, sob Protocolo nº. 0446/07 (Anexo A).

Na realização desse estudo foram utilizados 72 dentes humanos unirradiculares extraídos, dos quais 12 foram utilizados para a realização do estudo piloto e 60 para a execução do experimento propriamente dito (Garcez et al., 2006; Soukos et al., 2006; Williams et al., 2006). Os dentes, procedentes do Banco de Dentes do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté, foram limpos, autoclavados e armazenados em solução salina para hidratação até o momento do uso.

4.2 Preparo e instrumentação dos espécimes

Os dentes foram seccionados ao nível da junção cemento-esmalte com disco de Carburundum (Carbodent – Gysi S.A. – Buenos Aires – Argentina) acoplado a um mandril em micromotor, de maneira que todas as raízes apresentassem um comprimento padronizado em 15mm.

O comprimento de trabalho foi determinado pelo método visual, subtraindo-se um milímetro do comprimento obtido pela introdução de uma lima tipo Kerr #10 (Dentsply/Maillefer S.A. – Ballaigues – Suiça) até sua observação no forame apical. O preparo do terço cervical foi realizado com broca Gates-Glidden nº 3 e a instrumentação do canal com limas flexofile (Dentsply/Maillefer S.A. – Ballaigues – Suiça) pela técnica seriada, alcançando o diâmetro cirúrgico com a lima tipo Kerr #55.

Os canais foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio 1% (Biodinâmica Química e Farmacêutica – Paraná – Brasil) a cada troca de instrumento, com o auxílio de seringa hipodérmica de 5mL e agulha intramuscular 20 x 5,5 mm (BD – Paraná – Brasil). Após instrumentação, os canais radiculares foram preenchidos com solução de ácido etilenodiaminotetracético 17% (EDTA) (Biodinâmica Química e Farmacêutica – Paraná – Brasil) por três minutos, para remoção da *smear layer* e, então, substituído por solução de hipoclorito de sódio 1% para neutralização. Posteriormente, os espécimes foram irrigados com água destilada para a remoção do hipoclorito de sódio e os canais radiculares secos com cones de papel #55 (Dentsply/Maillefer S.A. – Ballaigues – Suiça).

4.2.1 Vedamento e impermeabilização externa das raízes

O vedamento do forame apical foi realizado com resina composta fotopolimerizável (Filtek Z 250 – 3M – Campinas – Brasil) de acordo com a técnica preconizada para a confecção de restaurações dentárias. Em seguida, as raízes foram impermeabilizadas externamente com duas camadas de adesivo epóxi

Araldite (Brascola LTDA. – Taboão da Serra – SP – Brasil) aplicadas com o auxílio de um pincel, em toda extensão radicular, exceto na região cervical na entrada do canal, respeitando-se o tempo de trinta minutos entre a aplicação das mesmas.

Após o preparo biomecânico, vedamento da região apical e impermeabilização externa das raízes, todas as amostras foram imersas em recipiente com água destilada e autoclavadas a 121ºC por 15 minutos.

Os procedimentos a seguir foram realizados com assepsia em câmara de fluxo laminar (Veco – Piracicaba – SP – Brasil).

4.2.2 Inclusão em placas de poliestireno

Depois de esterilizadas, as amostras foram transferidas, com auxílio de pinças esterilizadas, para placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro (Whatman nº1 – International Ltda. – England) para a secagem das mesmas (Figura 2-A).

Em seguida, os espécimes foram aleatoriamente distribuídos em placas de poliestireno para cultura de células (Costar – Nova York – EUA) e incluídos assepticamente com resina acrílica quimicamente ativada (Artigos Odontológicos Clássico – São Paulo – SP – Brasil) nos 5mm apicais (Figura 2-B). Foram utilizadas seis placas de cultura de 24 poços, com dez espécimes em cada, de modo que os mesmos ficassem dispostos de modo intercalado nos orifícios, para facilitar o tratamento (Figura 3).

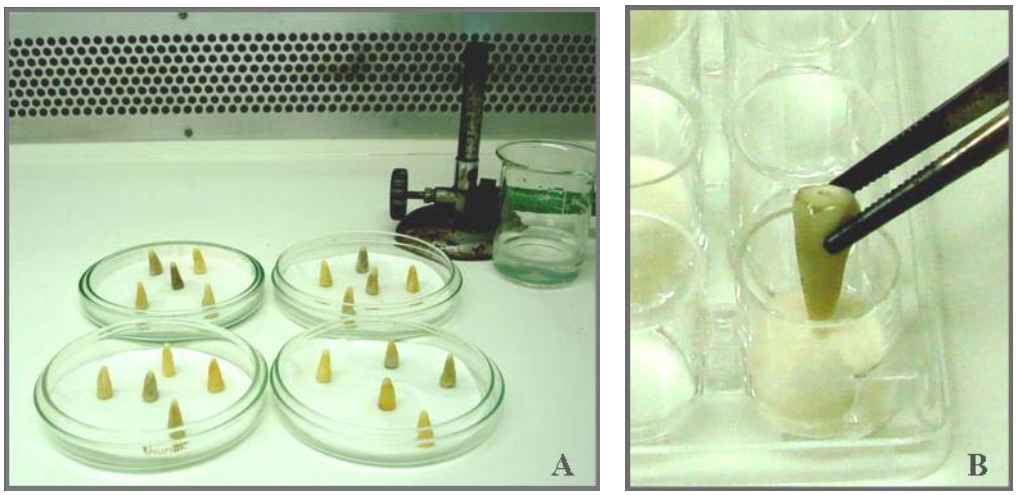

Figura 2 – Secagem e fixação das amostras na placa de cultura de células

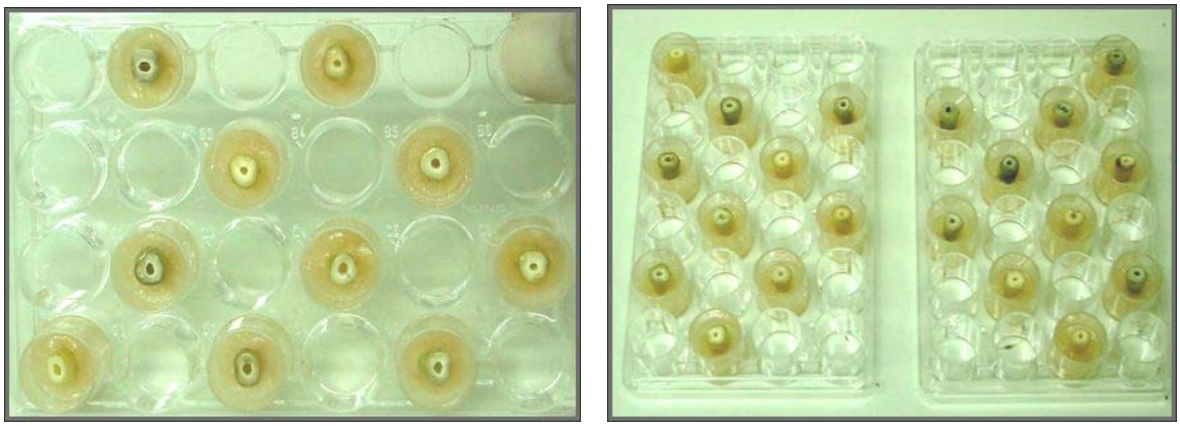

Figura 3 – Distribuição das amostras nos orifícios as placas de cultura de células

4.3 Preparo da suspensão de *Enterococcus faecalis*

Cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi reativada em caldo BHI (*Brain Infusion Hearth*) (Difco – Detroit – Michigan – EUA) e incubada em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC, por 24 horas.

A cultura de 24 horas foi semeada em placa de Petri contendo ágar BHI e, então, incubada em estufa com 5% de CO_2 a 37ºC, por mais 24 horas.

Após crescimento microbiano, foi preparada uma suspensão em tubo, contendo 10mL de solução salina esterilizada (NaCl 0.9%), compatível ao padrão 2 da escala de Mc Farland. Foram misturados em tubo de ensaio esterilizado 5mL da suspensão preparada e 5mL de caldo BHI para obtenção da suspensão de concentração final (Figura 4). Dessa suspensão, foram preparadas diluições seriadas (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}) e alíquotas de 0,1mL das diluições semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI, em duplicata. Estas foram incubadas por 24 horas, com 5% de CO_2 a 37ºC para determinação do número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

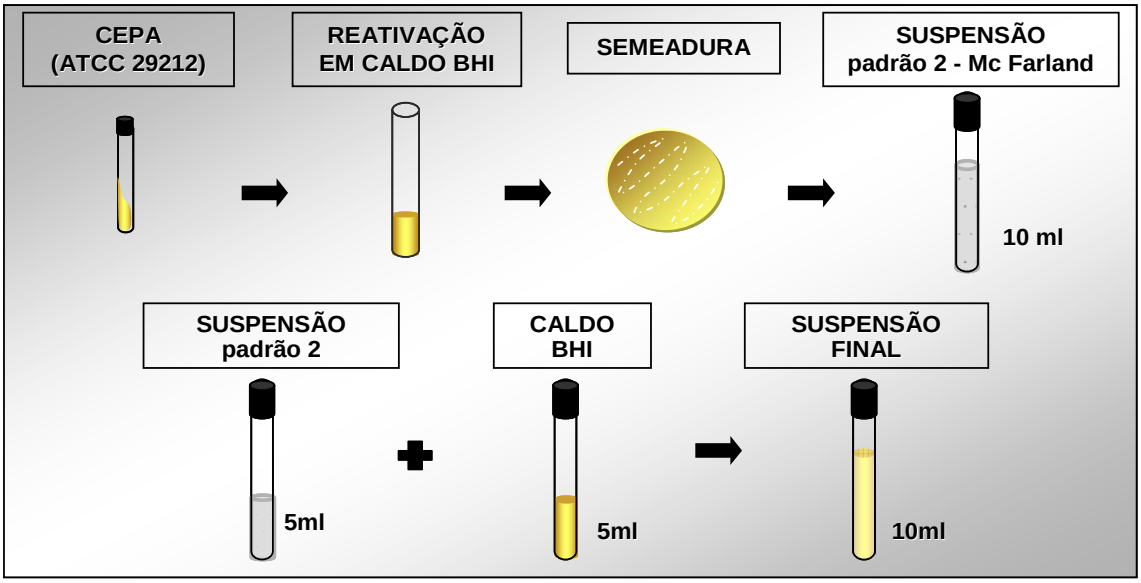

Figura 4 – Esquema representativo para obtenção da suspensão de concentração final de *E. faecalis*

4.3.1 Contaminação dos espécimes

Vinte microlitros da suspensão de concentração final de *E. faecalis* foram injetados dentro do sistema de canais radiculares por meio de seringa para insulina de 0.3 cc (BD Ultra-Fine – New Jersey – Estados Unidos) (Figura 5-A) e, em seguida, foi colocada uma bolinha de algodão esterilizada na entrada do canal radicular de cada amostra (Figura 5-B).

Em cada placa de cultura de células foi colocado algodão esterilizado umedecido em água destilada esterilizada, ocupando quatro poços, para assegurar a umidade do ambiente. A tampa da placa foi fechada, vedada com fita adesiva, e o conjunto mantido em estufa sob condições anteriormente descritas, por 21 dias. A cada dois dias foram acrescentados 20µL de caldo BHI no interior dos canais, com o auxílio da seringa de insulina, e trocado o algodão embebido em água destilada, presente nos poços das placas.

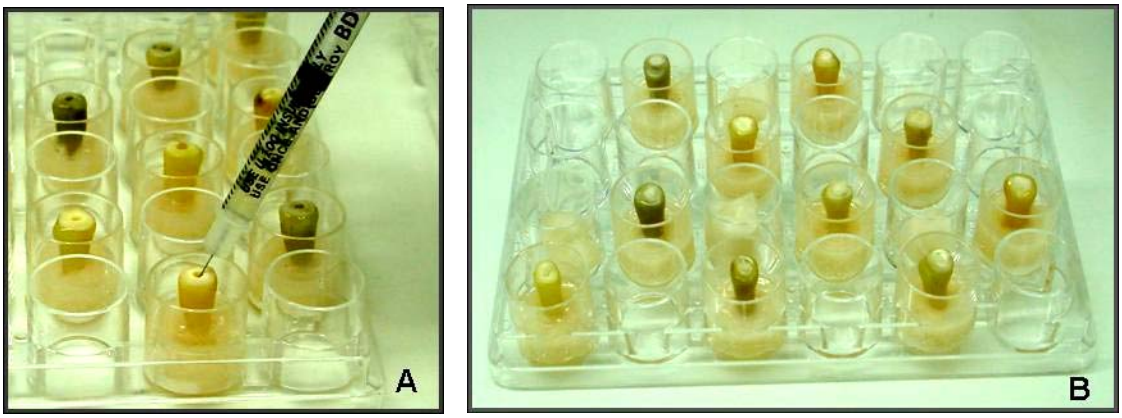

Figura 5 – Contaminação das amostras com a suspensão final de *E. faecalis* e selamento da entrada dos canais radiculares

4.4 Coleta prévia ao tratamento

Após 21 dias de incubação, foi introduzido no interior de cada canal radicular um cone de papel absorvente esterilizado Protaper F3 (Maillefer – S.A. – Suíça), durante um minuto. Com auxílio de uma pinça clínica esterilizada, cada cone foi transferido para um flaconete de polipropileno (Eppendorf) contendo 1mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,9%). Em seguida, o mesmo foi colocado em agitador de tubos (Vórtex AD 56 – Phoenix – Araraquara SP – Brasil) durante trinta segundos e, a partir de cada suspensão, foram preparadas as diluições seriadas (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}). Alíquotas de 0,1mL da suspensão e de cada diluição foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo ágar BHI (Figura 6). As placas foram incubadas conforme descritas anteriormente e, após 24 horas, foi realizada a contagem de colônias nas placas que apresentavam entre trinta e trezentas colônias e calculado o número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

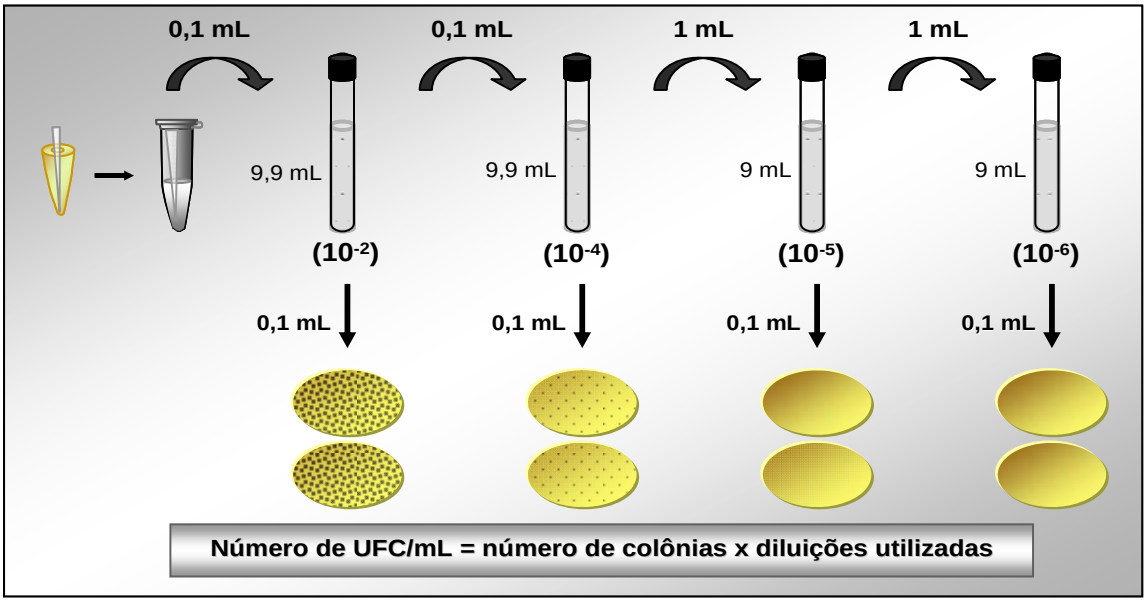

Figura 6 – Esquema representativo da coleta, das diluições seriadas e plaqueamento

4.5 Divisão dos espécimes

Após a coleta inicial para contagem de células (UFC/mL) as sessenta amostras foram divididas aleatoriamente em cinco grupos experimentais e um grupo controle, com dez amostras cada, de acordo com o tratamento a ser realizado.

O equipamento utilizado nesse estudo foi o laser de diodo de baixa potência, modelo Thera Lase (DMC Equipamentos Ltda. – São Carlos – SP – Brasil) com comprimentos de onda de 685nm (vermelho) e 830nm (infravermelho) e potência variável entre 35mW e 100mW (Figura 7). O aparelho é composto por uma peça de mão de 600µm, calibrada para trabalhar até 100mW, de acordo com a aplicação desejada (Figura 8). Para a realização desse estudo, o fabricante desenvolveu uma fibra óptica específica de 216µm para uso intracanal, ajustável até a potência máxima de 90mW.

Figura 7 – Equipamento Thera Lase (DMC) – laser de diodo de baixa potência

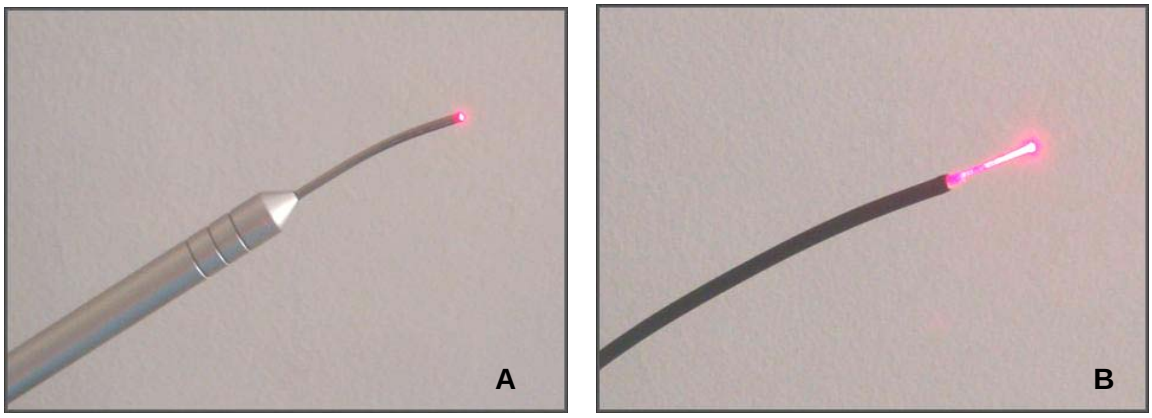

Figura 8 – Peça de mão original do equipamento de 600µm e fibra óptica intracanal de 216µm desenvolvida pelo fabricante (DMC)

Grupo 1 - os espécimes receberam solução de azul de metileno a 0,01% (Fórmula & Ação – São Paulo – Brasil), por meio de uma agulha de insulina em quantidade suficiente para o preenchimento dos canais, por um período de cinco minutos (TPI – tempo de pré-irradiação) (Figura 9). Em seguida, foram irradiados com laser de diodo, no comprimento de onda de 665nm, utilizando-se o sistema de entrega por fibra óptica de diâmetro 216µm e emitindo a potência máxima de 90mW na saída da mesma (Figura 10). A irradiação foi realizada por um minuto e trinta segundos seguindo a técnica helicoidal (Gutknecht et al., 1996) na qual a fibra é introduzida 1mm aquém ápice e recuada em movimentos helicoidais permitindo a irradiação em todas as paredes do canal radicular.

Grupo 2 - os espécimes foram corados como descrito no grupo 1 e irradiados utilizando-se o sistema de entrega por fibra óptica intracanal, do mesmo modo que o grupo 1, por um período de três minutos (duas repetições de um minuto e trinta segundos).

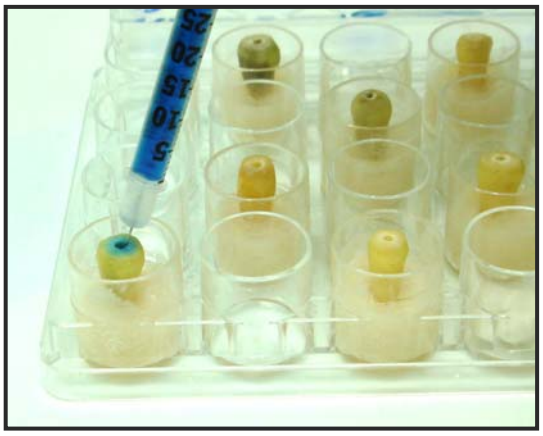

Figura 9 – Preenchimento das amostras com azul de metileno 0,01%

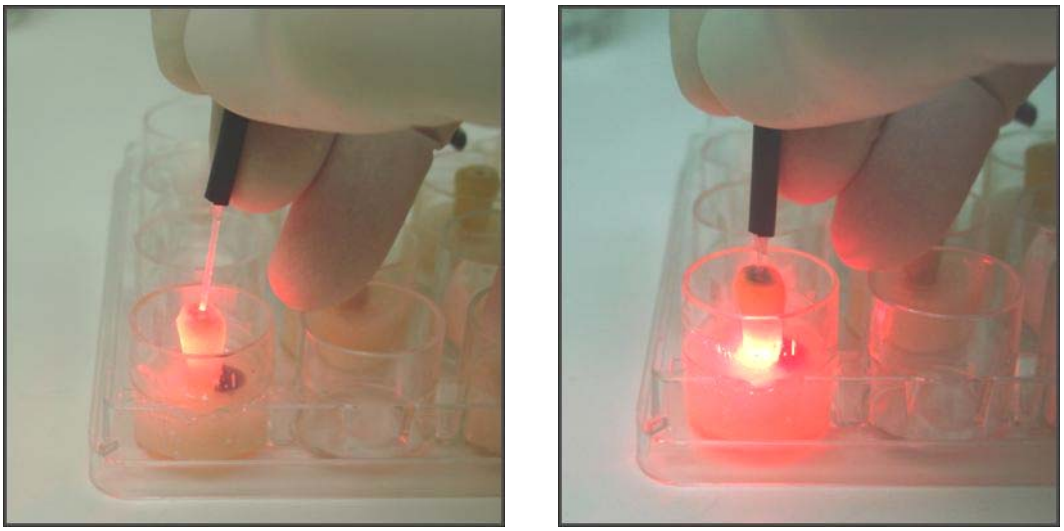

Figura 10 – Irradiação laser por meio de fibra óptica intracanal

Grupo 3 - os espécimes foram corados como descrito no grupo 1 e irradiados com o laser de diodo. O sistema de entrega foi realizado unicamente pela peça de mão emitindo a potência máxima de 100mW. A irradiação foi realizada por um minuto e trinta segundos posicionando-se a peça de mão diretamente na entrada do canal radicular (Figura 11).

Grupo 4 - os espécimes foram corados como descrito no grupo 1 e irradiados utilizando-se sistema de entrega sem fibra óptica intracanal, do mesmo modo que no grupo 3, por um período de três minutos (duas repetições de um minuto e trinta segundos).

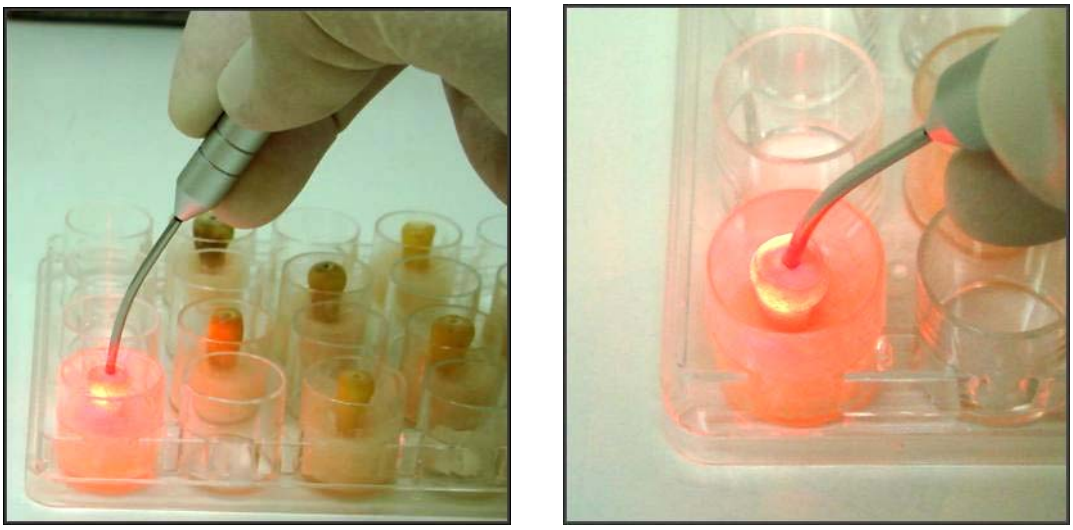

Figura 11 – Irradiação laser sem a utilização de fibra óptica intracanal

Grupo 5 - os espécimes receberam solução de hipoclorito de sódio 1%, em quantidade suficiente para preencher os canais, por um período de 15 minutos.

Grupo 6 - os espécimes não receberam tratamento. Este grupo foi realizado para o controle da contaminação.

Após seus respectivos tratamentos, todos os espécimes foram irrigados com 3mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,9%) a fim de se remover o corante e o hipoclorito utilizado.

Os parâmetros de irradiação utilizados nesse experimento foram baseados nos resultados obtidos após a realização de um estudo piloto. Para tal, doze amostras foram preparadas, padronizadas, contaminadas e coletadas, conforme descrito anteriormente. Em seguida, os canais radiculares foram preenchidos com azul de metileno por cinco minutos (TPI) e irradiados com sistema de entrega por meio de fibra óptica intracanal com 216µm de diâmetro. Quatro grupos (n=3) foram estudados modificando-se a potência e o tempo de irradiação, a seguir:

	TEMPO	**POTÊNCIA**
Grupo 1	5 min	75 mW
Grupo 2	5 min	90 mW
Grupo 3	3 min	90 mW
Grupo 4	1 min 30 s	90 mW

Figura 12 – Parâmetros utilizados nos grupos experimentais do estudo piloto

Após a realização dos tratamentos e irrigação, as amostras foram coletas, diluídas, semeadas e incubadas por 24 horas para a contagem das UFC/mL.

Os resultados mostraram que a redução bacteriana foi em ordem decrescente: G2 > G3 > G4 > G1, entretanto não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (p>0,05 %) (Apêndice A).

Em vista disso e levando-se em consideração que a permanência do corante no interior dos canais radiculares provoca o manchamento dental, optou-se pela utilização de uma potência maior com menores períodos de exposição.

Sendo assim, para o presente estudo selecionou-se a potência de 90mW (potência máxima permitida com o uso da fibra óptica) e os períodos de três minutos e um minuto e trinta segundos.

4.6 Coleta após tratamento

Imediatamente após término dos procedimentos, uma nova coleta foi realizada com cone de papel esterilizado, o qual permaneceu no interior do canal radicular por período de um minuto. Com auxílio de pinça clínica esterilizada, cada cone retirado do canal foi colocado em flaconetes de polipropileno (Eppendorf) contendo 1mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,9%) e agitados por trinta segundos em agitador de tubos. A partir dessa suspensão, foram preparadas diluições seriadas (pura, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}). Alíquotas de 0,1mL da suspensão e de cada diluição foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI.

Todas as placas semeadas foram incubadas na estufa com 5% de CO_2 a 37ºC por 24 horas e, após esse período, procedeu-se a contagem (Figura 13) e o cálculo do número de unidades formadoras de colônias para cada placa.

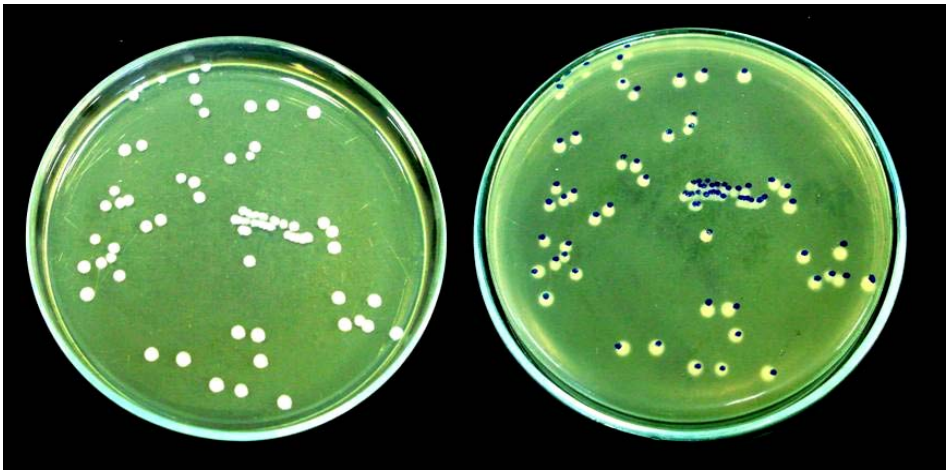

Figura 13 – Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC)

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos, relativos às contagens de unidades formadoras de colônias, foram submetidos à análise estatística por meio do programa estatístico BioEstat 5.0 (Sociedade Civil de Mamirauá, Belém-Brasil).

Para a verificação da distribuição amostral utilizou-se o teste de normalidade Kolmorov-Smirnov (Lilliefors), apresentando distribuição não normal.

Dessa forma, para a verificação da diferença de redução bacteriana dentro de cada grupo, antes e depois dos tratamentos realizados, utilizou-se o teste de Wilcoxon (amostras relacionadas); e, para a verificação da diferença entre os grupos, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis (amostras independentes) com nível de significância estabelecido em 5% ($p<0,05$).

5 RESULTADOS

A eficácia antimicrobiana dos tratamentos realizados, tanto por meio da terapia fotodinâmica quanto do hipoclorito de sódio a 1%, foi avaliada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias de *Enterococcus faecalis* por mililitro (UFC/mL).

Os resultados relativos aos cinco grupos experimentais foram baseados nas médias do número de UFC/mL, antes (inicial) e depois do tratamento (final), e no cálculo das porcentagens de redução (Tabela 1). As médias de UFC/mL obtidas para os cinco grupos estão representadas pela Figura 14, em escala logarítmica.

Os valores absolutos, médias e porcentagens de redução dos microrganismos, para cada amostra, estão disponibilizados nos Apêndices B, C e D.

Tabela 1 – Médias iniciais e finais das UFC/mL de *E. faecalis* em valores exponenciais (número) e logarítimo (log), médias das porcentagens de redução (%) e desvio padrão (DP) dos grupos experimentais

	Número (UFC/mL)		**log (UFC/mL)**		**% MÉDIA DA DE REDUÇÃO**	**DP desvio padrão**
	INICIAL	**FINAL**	**INICIAL**	**FINAL**		
G1	$9,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^4$	6.96	4.31	99.48	0.63
G2	$5,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	6.68	4.17	99.65	0.49
G3	$4,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^4$	6.58	3.75	99.41	0.70
G4	$7,2 \times 10^6$	$9,8 \times 10^3$	6.61	3.38	99.64	0.53
G5	$8,5 \times 10^6$	$2,6 \times 10^2$	6.87	1.95	100	0

G1: PDT - 90 mW / 1 min e 30 s / com fibra; G2: PDT - 90mW / 3min / com fibra;
G3: PDT - 100 mW / 1 min e 30 s / sem fibra; G4: PDT - 100 mW / 3min / sem fibra;
G5: Hipoclorito de sódio 1%

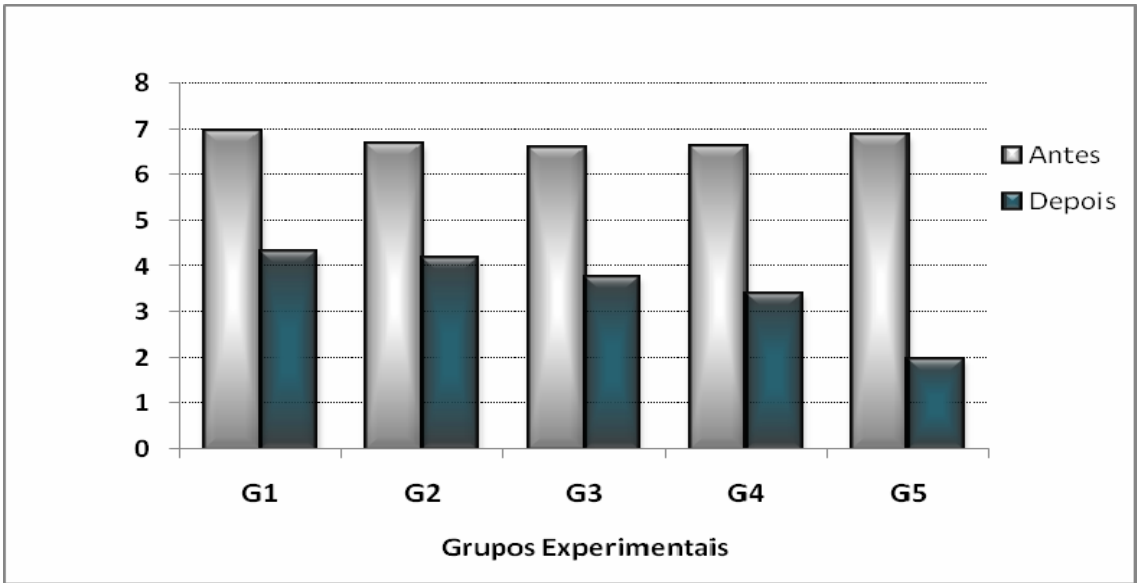

Figura 14 – Representação gráfica das médias do log UFC/mL de *E. faecalis* presentes nas contagens antes e depois dos tratamentos

A porcentagem de redução de unidades formadoras de colônias, após os respectivos tratamentos, foi em ordem decrescente: G5, G2, G4, G1 e G3 (Figura 15).

A análise comparativa da porcentagem de redução de *E. faecalis*, entre os diferentes grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% (Apêndice E), indicou diferença estatística significante entre os grupos 1 e 5, sendo que a porcentagem de redução imediata do grupo 5 foi maior que o grupo 1, confirmando que o tratamento com hipoclorito de sódio 1% foi melhor em relação a terapia fotodinâmica com uso de fibra óptica por um minuto e meio de irradiação. Também foi observado diferença estatística significante entre os grupos 3 e 5, apresentando a média do grupo 5 maior que do grupo 3, o que demonstra uma superioridade do hipoclorito de sódio 1% frente à PDT sem uso de fibra óptica, por um minuto e meio de irradiação. Não houve diferença estatística significante entre os demais grupos denotando que ocorreu semelhança no comportamento de *E. faecalis* frente aos tratamentos utilizados (Figura 15).

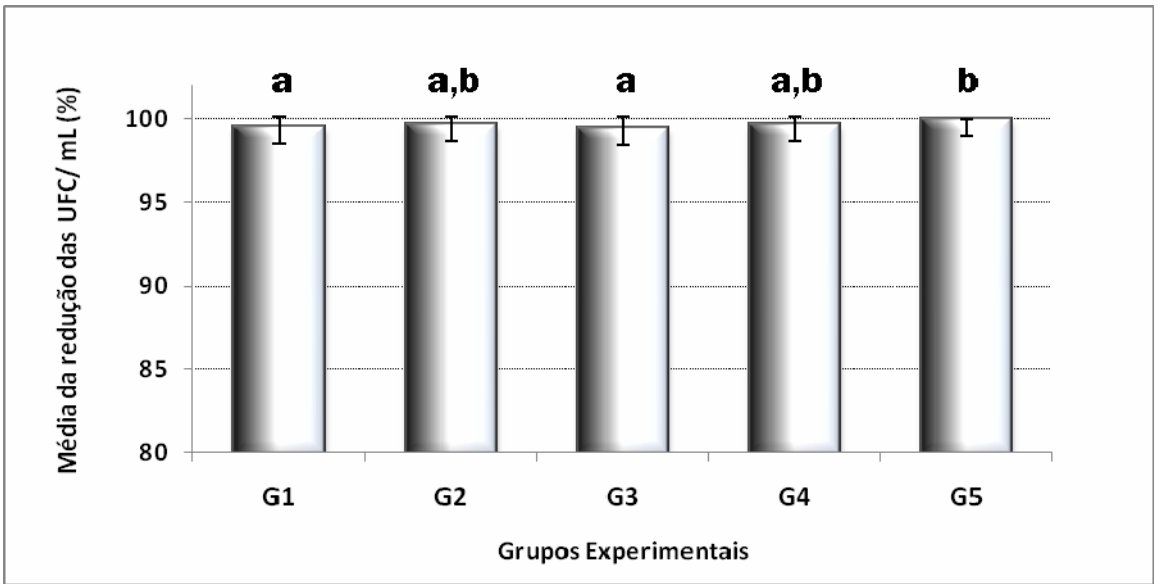

Figura 15 – Representação gráfica das médias das porcentagens de redução de UFC/mL, desvio padrão e análise estatística entre os grupos experimentais. Barras representadas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%, por meio do teste Kruskal-Wallis

Na comparação entre a contagem de microrganismos presentes antes e depois de cada tratamento, pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5% (Apêndice F) foi possível observar diferença estatística significante em todos os grupos, apresentando as médias das contagens iniciais maiores que as finais, demonstrando que houve redução bacteriana imediata significante em todos os tratamentos realizados.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da importância do tema

Mesmo com o avanço técnico-científico presenciado na endodontia nos tempos atuais, depara-se ainda com grande número de insucessos no tratamento endodôntico, causados pela persistência de microrganismos no interior de túbulos dentinários. Tal fato representa grande preocupação e desafio para os pesquisadores.

Diante da problemática da desinfecção, existe uma tendência ao constante desenvolvimento de tecnologias e procedimentos que possam aumentar a efetividade do tratamento endodôntico, atingir melhores resultados, diminuir o tempo de trabalho e, consequentemente, resultarem em maior qualidade de tratamento.

Dessa forma, a laserterapia vem conquistando seu espaço na odontologia moderna. A terapêutica utilizando laser está cada vez mais presente na clínica diária, uma vez que tais aparelhos têm proporcionado múltiplas aplicabilidades.

Sabe-se que o laser de baixa potência promove o aumento do metabolismo celular induzindo a biomodulação, efeito analgésico e antiinflamatório; sendo indicado para o alívio da dor, herpes, trismos, parestesias, hipersensibilidades dentinárias, pós-intervenções endodônticas, aftas, entre outras (Walsh, 1997; Brugnera Junior et al., 2003).

Além disso, estudos na literatura têm mostrado a eficiência desse laser, apresentando-o como uma nova alternativa de tratamento para a redução bacteriana (Williams et al., 2003; Chan & Lai, 2003; Prates et al., 2006; Soukos et al., 2006;

Zanin et al., 2006). Denominada de terapia fotodinâmica, sua principal indicação na odontologia refere-se ao tratamento de infecções localizadas, não devendo, entretanto, ser utilizada como terapia única, e sim como coadjuvante para as infecções orais (Garcez et al., 2003; Zanin et al., 2006). A PDT destaca-se principalmente na endodontia, uma vez que microrganismos desempenham papel fundamental no desenvolvimento de doenças pulpares e periapicais, sendo a desinfecção dos canais radiculares condição imprescindível para a reparação tecidual e sucesso do tratamento.

Cabe ressaltar que no tratamento endodôntico convencional, o hipoclorito de sódio é a substância química de eleição para a sanificação dos canais radiculares, devido suas propriedades de dissolução tecidual, baixa tensão superficial (Naenni et al., 2004) e atividade antimicrobiana (Vianna et al., 2004). Em contrapartida, o mesmo pode ser irritante aos tecidos vitais, acarretando em complicações quando usado indevidamente.

Sabe-se que o extravasamento acidental do hipoclorito de sódio para os tecidos periapicais induz processos inflamatórios severos na região, causados por seu efeito oxidativo, tais como dor intensa, desenvolvimento de edema, hematoma e necrose (Kaufman & Keila, 1989; Becking, 1991). Em vista disso, devem-se enfatizar os casos de rizogênese incompleta, reabsorções radiculares e perfurações, nos quais pode ocorrer, com maior freqüência, a passagem da substância química pelo forame apical ou comunicações com o periodonto. Nessas situações, a agressão determina o atraso da reparação tecidual (Mehra et al., 2000).

Embora pouco citado na literatura, não se deve desprezar a possibilidade dos pacientes serem alérgicos ao hipoclorito de sódio (Caliskan et al., 1994), devendo-se questioná-los quanto à possibilidade de alergia ao cloro.

Diante do exposto, a utilização do laser de baixa potência como agente antimicrobiano somado a sua facilidade de aplicação, ausência de efeitos sistêmicos e características atraumáticas (Zanin et al., 2003) justificam a utilização da terapia fotodinâmica como um tratamento alternativo na endodontia.

6.2 Discussão da metodologia empregada

É unânime na literatura que o *Enterococcus faecalis*, microrganismo de difícil eliminação, está comumente relacionado às infecções endodônticas persistentes, secundárias, recorrentes e aos dentes obturados com falha durante o tratamento (Dunavant et al., 2006; Melker et al., 2006; Stuart et al., 2006; Zoletti et al., 2006).

Além da capacidade de penetrar em profundidade nos túbulos dentinários, dificultando a ação de substâncias químicas, *E. faecalis* permanecem latentes em condições ambientais extremas, tornando-se viáveis com aporte nutricional limitado por longos períodos no sistema de canais radiculares, após o tratamento endodôntico (Sedgley et al., 2005).

Suas propriedades alcalino-tolerantes, associadas a fatores de virulência, permitem sua sobrevivência em meio às substâncias químicas auxiliares e às medicações intracanais comumente usadas em endodontia. Destaca-se também por estar cada vez mais resistente aos antibióticos, entre eles eritromicina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina (Dahle'n et al., 2000).

Dada à importância desse microrganismo nas infecções endodônticas, o presente estudo avaliou a efetividade da terapia fotodinâmica em canais radiculares contaminados com *E. faecalis.*

Quanto aos procedimentos de inoculação dos espécimes, o tempo de contaminação foi estabelecido em 21 dias de acordo com Haapasalo & Orstavik (1987). Esses autores verificaram que o tempo de infecção prolongado leva a uma maior quantidade de túbulos infectados. Entretanto verificam-se na literatura períodos de contaminação distintos dos utilizados nesse estudo, como 24 horas (Garcez et al., 2006), 48 horas (Fonseca, 2006) e três dias (Soukos et al., 2006; Garcez et al., 2007). De acordo com os estudos de Zanin et al. (2005), no qual compararam a terapia fotodinâmica em biofilme de *S. mutans* formado por três, sete e dez dias, os autores constataram que o biofilme formado por maior tempo foi menos susceptível à terapia fotodinâmica.

Em relação à terapia fotodinâmica, trata-se de uma modalidade terapêutica capaz de produzir morte celular por meio da administração de um fotossensibilizador, seguido da aplicação de luz em comprimento de onda adequado.

Dessa forma, qualquer fonte de luz pode ser utilizada, desde que seja coerente com o pico de absorção do agente fotossensibilizante. A maioria dos trabalhos associam a terapia fotodinâmica com o laser helio-neônio (Seal et al., 2002; Williams et al., 2003; Chan & Lai, 2003) ou laser de diodo (Chan & Lai, 2003; Komerick et al., 2003; Prates et al., 2006; Souza et al., 2006; Zanin et al., 2006; Garcez et al., 2008); embora alguns trabalhos demonstrem resultados satisfatórios com o uso do LED (Zanin et al., 2005; Bevilacqua et al., 2007). Um único relato associou a terapia com lâmpada de xenônio (Matevisk et al., 2003), obtendo resultados semelhantes quando comparados ao laser He-Ne.

No presente estudo utilizou-se o laser de diodo de baixa potência (Thera Lase – DMC) por permitir a utilização de uma fibra óptica de diâmetro reduzido (216μm) e apresentar comprimento de onda de 685nm, ressonante ao corante empregado.

Além disso, trata-se de um aparelho de custo intermediário, portátil e eficiente por abranger o espectro vermelho e infravermelho (Walsh, 1997).

Como a maioria das bactérias não é capaz de absorver a luz visível, é fundamental que um fotossensibilizador seja utilizado, com espectro de absorção condizente ao comprimento de onda emitido pelo laser. Além disso, os corantes devem exibir características como baixa toxicidade no escuro (Tardivo et al., 2005) e ter grande rendimento.

Atualmente diversos fotossensibilizadores estão sendo empregados nos estudos, dentre os quais podem ser citados: azul de metileno (Souza et al., 2006) azul de toluidina (Zanin et al., 2006), azuleno (Garcez et al., 2006), clorina, verde de malaquita (Prates et al., 2006) e rosa bengala (Paulino et al., 2005). Entretanto observa-se na literatura que os corantes mais utilizados são o azul de toluidina (Williams et al., 2003; Matevisk et al; 2003; Zampieri et al., 2003; Usacheva et al., 2003; Bevilacqua et al., 2007) e o azul de metileno (Chan & Lai, 2003; Usacheva et al., 2003; Soukos et al., 2006).

O azul de metileno é um composto fenotiazínico de cor azul, com absorção máxima na região do vermelho visível, compatível com o comprimento de onda do laser escolhido (λ=685nm) (Walsh, 1997; Tardivo et al., 2005). Uma característica importante das fenotiazinas é a presença da carga positiva, a qual é atraída por cargas negativas, possibilitando uma maior afinidade por organelas estratégicas como retículo endoplasmático, lisossomos, complexo de Golgi e, sobretudo, mitocôndria, fundamental na morte celular programada. Além disso, possui alto rendimento na geração de espécies reativas, gerando concentrações altas de oxigênio singleto (Ball et al., 1998; Severino et al., 2003). Diante do exposto, o azul de metileno foi o corante selecionado para esse estudo.

Quanto à concentração do agente fotossensibilizador, cabe ressaltar que existe a possibilidade de manchamento dental, uma vez que alterações cromáticas coronárias foram constatadas no estudo de Gonçalves (2005). Exercendo preocupação entre os pesquisadores, estudos recentes têm buscado desenvolver associações dos fotoativadores com Endo PTC (Garcez et al., 2006; Gonçalves, 2005), além do desenvolvimento de novas formulações visando minimizar esse dano (George & Kishen, 2007). Em vista disso, a concentração de 0,01% foi utilizada por se tratar de uma concentração baixa, até o presente momento. Entretanto, novos experimentos devem ser realizados com enfoque no manchamento, evitando-se o comprometimento estético dental.

Com relação ao tempo de pré-irradiação (TPI), necessário para a penetração do corante nas estruturas celulares das bactérias, a literatura oferece relatos que variam de sessenta segundos a dez minutos. Entretanto, o tempo prolongado tornaria essa técnica inviável clinicamente. Optou-se pelo TPI de cinco minutos, fundamentado nos resultados satisfatórios demonstrados (Soukos et al., 1996; Matevisk et al., 2003; Garcez et al., 2006; Fonseca, 2006).

Outro fator a ser considerado é o sistema de entrega do laser, com ou sem a utilização de fibra óptica intracanal. Alguns autores justificam a necessidade do emprego da fibra pelo tamanho compatível aos canais radiculares, o que permite que o feixe de irradiação alcance toda a extensão dos mesmos (Garcez et al., 2006).

Entretanto, o uso da fibra óptica pode ser uma condição limitante, uma vez que o diâmetro da mesma pode restringir sua aplicação diante de canais radiculares mais delgados. Seal et al. (2002) alcançaram em seus estudos uma redução bacteriana de 99,9%, em canais radiculares, sem a utilização da fibra óptica intracanal.

Cabe ressaltar que os lasers de alta potência necessitam da liberação de alta temperatura, adjacente às paredes dentinárias, para exercerem o efeito antimicrobiano, a qual é conseguida por meio de uma fibra óptica intracanal. Em contrapartida, os lasers de baixa potência destroem os microrganismos sem, no entanto, necessitarem do aumento de temperatura. Alguns estudos demonstraram que as alterações de temperatura provenientes dos lasers de baixa potência são mínimas e incapazes de provocar alteração tecidual (Gutknecht et al., 2005). Isso proporciona a segurança dos tecidos subjacentes, ligamento periodontal e osso alveolar, eliminando a possibilidade de necrose dos mesmos (Damante et al., 2004; Gutknecht et al., 2005). Sua eficácia relaciona-se unicamente às reações fotoquímicas induzidas pelo laser. Diante do exposto, o sistema de entrega foi realizado com e sem a utilização de fibra óptica intracanal, para a verificação de sua necessidade.

Devido à ausência de um protocolo, os parâmetros relacionados à irradiação são, sem dúvida, os motivos de maior polêmica entre os autores.

Estudos mostram uma variabilidade no tempo de exposição ao laser, desde trinta segundos (Silbert et al., 2000) até trinta minutos (Zanin et al., 2006). Todavia os mais utilizados são os períodos de dois minutos (Bonsor et al., 2006a; Bonsor et al., 2006b), três minutos (Garcez et al., 2006; Williams et al., 2006) e cinco minutos (Soukos et al., 2006; Fonseca, 2006).

De acordo com os estudos de Williams et al. (2003), Zanin et al. (2005) e Prates et al. (2006), a inativação dos microrganismos é maior conforme a dose de energia é aumentada. Sabendo-se que a dose de energia é proporcional à potência e ao tempo de irradiação, procura-se, do ponto de vista endodôntico, aumentar a potência e diminuir o tempo de exposição ao laser.

Diante do exposto, os parâmetros utilizados no presente estudo foram baseados a partir do estudo piloto. Dessa forma, foram escolhidas as potências máximas permitidas pelo aparelho, tanto para o uso da peça de mão (100mW), quanto para o uso da fibra óptica intracanal (90mW). Em vista da semelhante redução bacteriana apresentada frente aos períodos de tempo de cinco minutos, três minutos e um minuto e meio, os menores tempos foram selecionados.

6.3 Discussão dos resultados

A análise dos resultados obtidos no presente estudo, frente à efetividade dos parâmetros instituídos, mostrou semelhanças de porcentagem de redução microbiana entre todos os tratamentos aplicados, não havendo diferença estatisticamente significante entre os grupos irradiados (G1, G2, G3 e G4).

Dentre os dois grupos irradiados pelo tempo de um minuto e meio (G1 e G3), as amostras irradiadas por meio da utilização de fibra óptica intracanal apresentaram melhores resultados que as amostras irradiadas sem o uso da fibra, embora não tenha havido diferença estatisticamente significante entre eles.

Resultados semelhantes quanto à redução bacteriana alcançada no presente estudo, por meio de fibra óptica, também foram encontrados nos estudos de Garcez (2002), Soukos et al. (2006), Bonsor et al. (2006a) e Bonsor et al. (2006b).

Entretanto, raros trabalhos na endodontia avaliaram a eficiência da terapia fotodinâmica sem o uso de fibra óptica. Os resultados obtidos nos grupos sem fibra óptica (G3 e G4) estão de acordo com Seal et al. (2002), que constataram destruição expressiva de microrganismos (99,9%) sem a utilização da mesma.

Nos estudos de Brasil (2006), o emprego de uma fibra óptica no interior do canal pelo período de dois minutos, seguida da utilização da peça de mão na entrada do canal por mais dois minutos, não proporcionou efeito antimicrobiano. No entanto, tais resultados provavelmente se devem aos baixos parâmetros de irradiação utilizados (15mW e 1.8J, 40mW e 4.8J, respectivamente).

Diante da inexistência de trabalhos comparando os diferentes sistemas de entrega dos lasers de baixa potência, os resultados obtidos, nas condições mencionadas, sugerem que a ativação do corante ocorre mesmo à distância, independente de haver contato com as paredes dentinárias por meio de fibra óptica.

Este fato poderia ser justificado em decorrência da radiação laser sofrer absorção, reflexão, transmissão e espalhamento nos tecidos em diferentes graus.

Nos grupos G2 e G4, nos quais foram mantidos os sistemas de entrega anteriormente citados, duplicou-se o tempo de irradiação para três minutos. As amostras do grupo irradiadas com a utilização da fibra (G2) apresentaram novamente os melhores resultados, embora sem diferença estatisticamente significantes, concordando com os estudos de Garcez (2002), Soukos et al. (2006), Bonsor et al. (2006a) e Bonsor et al. (2006b).

Entretanto, aumentando-se o tempo de exposição, os efeitos antimicrobianos parecem mais evidentes. Considerando que o tempo de exposição é diretamente proporcional à dose de energia distribuída, os resultados desse estudo estão em concordância com os da literatura, na qual autores verificaram que a eficácia antimicrobiana da terapia fotodinâmica aumenta conforme a dose de energia irradiada (Seal et al., 2002; Williams et al., 2003; Prates et al., 2006).

Deve-se levar em consideração que o aumento do tempo de exposição aumenta a possibilidade de manchamento do elemento dental. Fato este constatado

por Gonçalves (2005). Outro dado interessante foi relatado por Prates et al. (2006), quando em seus estudos constataram que o fotossensibilizador se degrada durante a irradiação laser, demonstrando que com o aumento da exposição, há diminuição nos picos de absorção do corante.

Em vista do exposto e da carência de estudos relacionando a atividade da PDT com alterações cromáticas dentais, novas pesquisas devem ser realizadas em busca de novas concentrações dos fotossensibilizadores ou de técnicas de remoção dos mesmos sem que ocorram tais efeitos indesejáveis.

Assim como nos resultados do presente estudo, Soukos et al. (2006) verificaram que, embora a PDT tenha reduzido 97% de *E. faecalis*., a terapia não promoveu a erradicação total da espécie em canais radiculares. O mesmo foi observado nos estudos de Garcez et al. (2006), o qual atingiu uma redução bacteriana de 99,2%. Entretanto, o estudo de Garcez (2002) mostrou resultado de grande valor, o qual alcançou 100% de eliminação de *E. faecalis* em canais radiculares, por meio da terapia fotodinâmica.

Os resultados encontrados quando se comparou a terapia fotodinâmica (G1, G2, G3 e G4) a terapia química (G5) mostraram que o hipoclorito de sódio apresentou os melhores resultados, apresentando diferença estatisticamente significante com o grupo 1 e o grupo 3.

No presente estudo, os resultados obtidos com o hipoclorito de sódio a 1%, coincidem com aqueles alcançados por Seal et al. (2002) e Brasil (2006), os quais obtiveram eliminação bacteriana de 100%.

Diante dos resultados desse experimento e de acordo com os estudos da literatura, o hipoclorito de sódio ainda é a substância química de eleição para a limpeza e desinfecção dos canais radiculares. Desta forma, a terapia fotodinâmica

representa um recurso valioso como coadjuvante, no combate à infecção, principalmente em situações especiais como pacientes alérgicos ao hipoclorito sódio, rizogênese incompleta, reabsorções radiculares e perfurações.

Cabe ressaltar que embora os parâmetros utilizados nesse estudo sejam fatores controláveis na terapia fotodinâmica, deve-se levar em consideração que características das células alvo e do meio, como a concentração de oxigênio, o pH e o substrato, podem ter influência no sucesso do tratamento.

Necessidade de novas pesquisas, para o aperfeiçoamento no que diz respeito à ação da PDT em canais radiculares, deve ser realizada, uma vez que se verificou que a terapia alcançou reduções muito próximas das idealizadas.

Em vista disso, sugere-se a realização de estudos avaliando a ação da terapia fotodinâmica em profundidade de dentina, pois a hipótese de essa terapia alcançar regiões de difícil acesso poderá trazer grandes contribuições para a descontaminação dos canais radiculares.

7 CONCLUSÃO

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

- os parâmetros da terapia fotodinâmica utilizados nos diferentes grupos proporcionaram resultados significativos e semelhantes na redução intracanal de *Enterococcus faecalis,* sem a obtenção de erradicação total das bactérias;
- a utilização de potências máximas permitiu a redução do tempo de irradiação sem interferir na ação antimicrobiana;
- o emprego da fibra óptica não influenciou de forma significativa na redução bacteriana quando comparado ao uso da peça de mão.

REFERÊNCIAS[1]

1. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontics infections. *Int Endod J* 2005; 38(6):372-380.

2. Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various depths in human dentin. *J Endod* 2001 Mar; 27(3):206-208.

3. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *JOE* 2006 Jun; 32(6): 527-531.

4. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002; 28(10):689-693.

5. Dahle'n G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000 Oct; 15(5):309-312.

6. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis. J Endod* 2005; 31(12): 867-872.

7. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 2005; 38:735-742.

8. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *JOE* 2006 Feb; 32(2):93-98.

9. Zehnder M, Grawehr M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5):608-613.

[1] Referências elaboradas de acordo com o modelo Vancouver

10. Sire´n EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Ørstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 2004; 112(4):326-331.

11. Oztan MD, Kiyan M, Gerceker D. Antimicrobial effect, in vitro, of gutta percha points containing root canal medications against yeasts and *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102(3):410-416.

12. Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in vitro root canals. *J Clin Laser Med Surg* 1996 Apr; 14(2):77-80.

13. Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J. In vitro irradiation of infected root canals with diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int* 1997; 28(3):205-209.

14. Gutknecht N, Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg* 2000; 18(2):57-60.

15. Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelik N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med* 2004; 35(2):111-116.

16. Seal GJ, Ng YL, 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; 35:268-274.

17. Garcez AS. *Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para a redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2002. 91p.

18. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study). *Br Dent J* 2006 Mar; 200(6): 337-341.

19. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J O E* 2006 Oct; 32(10):979-984.

20. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent* 2006 Jul; 34(6):363-371.

21. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova* 2000; 23(2):237-243.

22. Garcez AS, Souza FR, Nuñes SC, Karther JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia – laser de baixa potência para redução microbiana. *Revista da APCD* 2003; 57(3):223-226.

23. Zanin IC, Brugnera Junior A, Zanin F, Gonçalves RB. Terapia fotodinâmica na Odontologia (T.F.D.). *RGO* 2003; 51(3):179-182.

24. Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology* 2001; 74(5):656-669.

25. Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* 1975; 55(1):115-121.

26. Simplicio FI, Maionchi F, Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova* 2002 Set/out; 25(5):801-807.

27. Sibata CH, Colussi VS, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res* 2000 Aug; 33(8):869-880.

28. Tuite EM, Kelly JM. Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J Photochem Photobiol B* 1993 Dec; 21(2-3):103-124.

29. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemo* 1998; 42:13-28.

30. Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* biofilms by light fractionation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58(1):190-192.

31. Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochemistry and Photobiology* 2003; 79:227-232.

32. Keene JP, Kessel D, Land EJ, Redmond RW, Truscott TG. Direct detection of singlet oxygen sensitized by haematoporphyrin and related compounds. *Photochemistry and Photobiology* 1986; 43(2):117-120.

33. Maisch T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med Sci* 2007; 22:83-91.

34. Plaetzer K, Kiesslich T, Oberdanner CB, Krammer B. Apoptosis flowing photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection*. Current Pharmaceutical Design* 2005; 11(9):1151-1165.

35. Agostinis P, Buytaert E, Breyssens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic induced apoptosis. *Photochemistry and Photobiology Sciences* 2004; 3:721-729.

36. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 2003; 37:190-193.

37. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2003; 18:51-55.

38. Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lepine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res* 2003; 38:428-435.

39. Zampieri MJP, Cogo JC, Genovese WJ, Barbosa AD. Ação bactericida da terapia fotodinâmica (AsGaAl) sobre bactérias *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis*: in vitro. *Rev Bras Implant* 2003; 9(2):16-17.

40. Feuerstein O, Persman N, Weiss EI. Phototoxic effect of visible light on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: an in vitro study. *Photochemistry and Photobiology* 2004; 80:412-415.

41. Zanin IC, Gonçalves RB, Brugnera Junior A, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of Streptococcus mutans biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *J Antimicrob Chemother* 2005 Feb; 56(2):324-330.

42. Zanin IC, Lobo MM, Rodrigues LK, Pimenta LA, Hofling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of in vitro biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci* 2006 Feb; 114(1):64-69.

43. Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AO. Photosensitization of different Candida species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2006; 83(1):34-38.

44. Prates RA, Yamada Júnior AM, Suzuki LC, Hashimoto MCE, Cai S, Gouw-Soares S, et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B: Biology* 2006 Jan 3; 86(1): 70-76.

45. Usacheva MN, Teichert NC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidineblue monomers and dimmers in the photoinactivation of bacteria. *J Photochem Photobiol B* 2003 Oct; 71(1-3):87-98.

46. Bevilacqua IM, Nicolau RA, Khouri S, Brugnera Júnior A, Teodoro GR, Zangaro RA, et al. The impacto of photodynamic therapy on the viability of *Streptococcus mutans* in a planktonic culture**.** *Photomed Laser Surg* 2007 Dec; 25(6):513-518.

47. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med* 1996; 18(3):253-259.

48. Bhatti M, MacRobert A, Henderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M. Antibody- targeted lethal photosensitization of Porphyromonas gingivalis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000 Oct; 44(10):2615-2618.

49. Paulino TP, Ribeiro KF, Thedei G, Tedesco AC, Ciancaglini P. Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 2005 Mar; 50(3):353-359.

50. Komerick N, Speight P, Cumow A, Postle-Hacon M, Wilson M, Hopper C. The effect of photodynamic therapy on rat buccal mucosa [resumo IADR n 978]. *J Dent Res* 1998; 77:754.

51. Komerick N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003 Mar; 47(3): 932-940.

52. Silbert T, Bird PS, Milbum GJ, Walsh LJ. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization [resumo IADR]. *J Dent Res* 2000; 79:569.

53. Garcez AS, Nunez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. 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 Oct; 102:93-98.

54. Fonseca MB. *Terapia fotodinâmica aplicada in vitro em canais radiculares contaminados com Enterococcus faecalis* [Dissertação de Mestrado]. Heliópolis: Ciências da Saúde do Hospital de Heliópolis, 2006. 65p.

55. Brasil CO. *Avaliação da terapia fotodinâmica, in vitro, aplicada na desinfecção de canais radiculares bovinos contaminados com Candida albicans* [Dissertação Mestrado]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, 2006. 74p.

56. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *British Dental Journal* 2006 Jul; 201(2):101-105.

57. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007 Jan; 39(1):59-66.

58. George S, Kishen A. Photophysical, photochemical and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt* 2007; 12(3).

59. Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of hotodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 2008 Feb; 34(2):138-142.

60. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. *Aust Dent J* 1997 Oct; 42(5):302-306.

61. Brugnera Junior A, Santos AECG, Bologna ED. *Atlas de laser terapia aplicada à clínica odontológica*. São Paulo: Santos; 2003.

62. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004; 30:785-787.

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

64. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod* 1989; 15:224-226.

65. Becking AG. Complications in the use sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Oral Surg* 1991; 71:343-348.

66. Mehra P, Clancy C, Wu J. Formation of a facial hematoma during endodontic therapy. *J Am Dent Assoc* 2000 Jan; 131(1):67-71.

67. Caliskan MK, Turkun M, Alper S. Allergy to sodium hypochlorite during root canal therapy: a case report. *Int Endod J* 1994 May; 27(3):163-167.

68. Melker KB, Vertucci FJ, Rojas MF, Progulske A, Belanger M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. *J Endod* 2006; 32(2):148-151.

69. Zoletti GO, Siqueira Júnior JF, Santos KRN. Identification of Enterococcus faecalis in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and independent approaches. *J Endod* 2006; 32(8):722-726.

70. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66:1375-1379.

71. Tardivo JP, Delgigilo A, Ito AS. Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 ligth source. *Photodyagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2:175-191.

72. Ball DJ, Luo Y, Kessel D, Griffiths J, Brown SB, Vernon DI. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1998 Feb;42(2):159-163.

73. Severino D, Junqueira HC, Gugliotti M, Gabrielli DS, Baptista MS. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. *Photochemistry and photobiology* 2003; 77:459-468.

74. Gonçalves L. *Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal* [Dissertação de Mestrado].São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. 124p.

75. Gutknecht N, Franzen R, Vanweersch JML, Mir M. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med Sci* 2005; 20:99-103.

76. Damante CA, Greghi SLA, Santana ACP, Passanezi E. Clinical evaluation of the effects of low intensity laser (GaAlAs) on wound healing after gingivoplasty in humans. *J Appl Oral Sci* 2004; 12(2):133-136.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados da análise estatística entre os grupos do estudo piloto pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

Teste Kruskal-Wallis (5%)				
H =	85,611			
Graus de liberdade =	3			
(p) Kruskal-Wallis =	0.0357			
R 1 =	590,000			
R 2 =	1,110,000			
R 3 =	790,000			
R 4 =	510,000			
R 1 (posto médio) =	98,333			
R 2 (posto médio) =	185,000			
R 3 (posto médio) =	131,667			
R 4 (posto médio) =	85,000			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	**p**
Postos médios 1 e 2	86,667	21,229	2,635	**ns**
Postos médios 1 e 3	33,333	0.8165	2,635	**ns**
Postos médios 1 e 4	13,333	0.3266	2,635	**ns**
Postos médios 2 e 3	53,333	13,064	2,635	**ns**
Postos médios 2 e 4	100,000	24,495	2,635	**ns**
Postos médios 3 e 4	46,667	11,431	2,635	**ns**

APÊNDICE B - Contagem das UFC de *Enterococcus faecalis* dos grupos 1 e 2 em número absoluto e log, antes e após os tratamentos, e porcentagem de redução bacteriana

Amostras	INICIAL		FINAL		%
Grupo 1	UFC/mL	log UFC/mL	UFC/mL	log UFC/mL	redução
1	7350000	6.87	27500	4.44	99.63
2	15900000	7.20	42000	4.62	99.74
3	5100000	6.71	20000	4.3	99.61
4	6400000	6.81	2360	3.37	99.96
5	8500000	6.93	112500	5.05	98.68
6	7700000	6.89	2690	3.43	99.97
7	11250000	7.05	217000	5.34	98.07
8	9800000	6.99	63000	4.8	99.36
9	12500000	7.10	5000	3.7	99.96
10	10500000	7.02	12000	4.08	99.89

Amostras	INICIAL		FINAL		%
Grupo 2	UFC/mL	log UFC/mL	UFC/mL	log UFC/mL	redução
1	4700000	6.67	33000	4.52	99.30
2	4550000	6.66	67500	4.83	98.52
3	5850000	6.77	1615	3.21	99.97
4	1650000	6.22	2330	3.37	99.86
5	6650000	6.82	225	2.35	100.00
6	5450000	6.74	25000	4.40	99.54
7	2800000	6.45	19000	4.28	99.32
8	8900000	6.95	20	1.30	100.00
9	3200000	6.51	0		100.00
10	10000000	7.00	35	1.54	100.00

APÊNDICE C - Contagem das UFC de *Enterococcus faecalis* dos grupos 3 e 4 em número absoluto e log, antes e após os tratamentos, e porcentagem de redução bacteriana

Amostras	**INICIAL**		**FINAL**		**%**
Grupo 3	**UFC/mL**	**log UFC/mL**	**UFC/mL**	**log UFC/mL**	**redução**
1	1000000	6.00	18500	4.27	98.15
2	8000000	6.90	355	2.55	100.00
3	8100000	6.91	31500	4.50	99.61
4	5400000	6.73	49500	4.69	99.08
5	2450000	6.39	1380	3.14	99.94
6	2400000	6.38	2700	3.43	99.89
7	2500000	6.40	24000	4.38	99.04
8	5550000	6.74	860	2.93	99.98
9	6000000	6.78	635	2.80	99.99
10	3900000	6.59	62000	4.79	98.41

Amostras	**INICIAL**		**FINAL**		**%**
Grupo 4	**UFC/mL**	**log UFC/mL**	**UFC/mL**	**log UFC/mL**	**redução**
1	1500000	6.18	25500	4.41	98.30
2	1000000	6.00	1200	3.08	99.88
3	7850000	6.89	29000	4.46	99.63
4	2900000	6.46	19000	4.28	99.34
5	2550000	6.41	15500	4.19	99.39
6	34000000	7.53	110	2.04	100.00
7	4550000	6.66	1400	3.15	99.97
8	5950000	6.77	5500	3.74	99.91
9	1500000	6.18	110	2.04	99.99
10	9700000	6.99	285	2.45	100.00

APÊNDICE D - Contagem das UFC de *Enterococcus faecalis* dos grupos 5 e 6 em número absoluto e log, antes e após os tratamentos, e porcentagem de redução bacteriana

Amostras	**INICIAL**		**FINAL**		**%**
Grupo 5	**UFC/mL**	**log UFC/mL**	**UFC/mL**	**log UFC/mL**	**redução**
1	4200000	6.62	0		98.30
2	5600000	6.75	20	1.30	99.88
3	6700000	6.83	10	1.00	99.63
4	10500000	7.02	10	1.00	99.34
5	18400000	7.26	500	2.70	99.39
6	3700000	6.57	30	1.48	100.00
7	3100000	6.49	50	1.70	99.97
8	11600000	7.06	600	2.78	99.91
9	10700000	7.03	1000	3.00	99.99
10	10600000	7.03	400	2.60	100.00

Amostras Grupo 6	**UFC/mL**	**log UFC/mL**
1	14000000	7.15
2	25000000	7.40
3	15000000	7.18
4	1100000	6.04
5	5250000	6.72
6	6000000	6.78
7	57500000	7.76
8	13600000	7.13
9	9450000	6.98
10	11200000	7.05

APÊNDICE E – Resultados da análise estatística entre os grupos experimentais pelo teste Kruskal-Wallis, com nível de significância 5%

Teste de Kruskal-Wallis	
H =	169,197
Graus de liberdade =	4
(p) Kruskal-Wallis =	0.002
R 1 =	1,750,000
R 2 =	2,805,000
R 3 =	1,970,000
R 4 =	2,365,000
R 5 =	3,860,000
R 1 (posto médio) =	175,000
R 2 (posto médio) =	280,500
R 3 (posto médio) =	197,000
R 4 (posto médio) =	236,500
R 5 (posto médio) =	386,000

Comparações (método Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	**p**
Postos médios 1 e 2	105,500	16,183	2,807	**ns**
Postos médios 1 e 3	22,000	0.3375	2,807	**ns**
Postos médios 1 e 4	61,500	0.9434	2,807	**ns**
Postos médios 1 e 5	211,000	32,366	2,807	**< 0.05**
Postos médios 2 e 3	83,500	12,808	2,807	**ns**
Postos médios 2 e 4	44,000	0.6749	2,807	**ns**
Postos médios 2 e 5	105,500	16,183	2,807	**ns**
Postos médios 3 e 4	39,500	0.6059	2,807	**ns**
Postos médios 3 e 5	189,000	28,991	2,807	**< 0.05**
Postos médios 4 e 5	149,500	22,932	2,807	**ns**

APÊNDICE F – Resultados da análise estatística pelo teste de Wilcoxon com nível de significância de 5 %.

G1 Antes X Depois	G2 Antes X Depois	G3 Antes X Depois	G4 Antes X Depois	G5 Antes X Depois
p= 0,0051	p= 0,0051	p= 0,0051	p= 0,0051	p= 0,0051

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNITAU

PRPPG-Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação
Comitê de ética em Pesquisa
Rua Visconde do Rio Branco, 210 Centro Taubaté-SP 12020-040
Tel.: (12) 3625.4143 – 3635.1233 Fax: (12) 3632.2947
cepunitau@unitau.br

DECLARAÇÃO Nº 0467/07

Protocolo CEP/UNITAU nº 0446/07 (Esse número de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto)

Projeto de Pesquisa: *Viabilidade da terapia fotodinâmica, sob diferentes parâmetros, na redução de Enterococcus faecalis em canais radiculares*

Pesquisador(a) Responsável: Maralize Ribeiro Nunes

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de **14/11/2007,** e no uso das competências definidas na Resolução CNS/MS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado,** após atendimento às pendências.

Taubaté, 30 de novembro de 2007

Prof. Robison Baroni
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Maralize Ribeiro Nunes

_____

Taubaté, Junho de 2008.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo