

REGINA CÉLIA LOPES VALADARES

**COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO ÓPTICA DO LASER
VERMELHO EM CANAIS RADICULARES PREENCHIDOS COM CORANTES.
ESTUDO *IN VITRO***

CAMPINAS
2008

REGINA CÉLIA LOPES VALADARES

**COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO ÓPTICA DO LASER
VERMELHO EM CANAIS RADICULARES PREENCHIDOS COM CORANTES.
ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa

CAMPINAS
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca "São Leopoldo Mandic"

V136c Valadares, Regina Célia Lopes.
Comparação do coeficiente de absorção óptica do laser vermelho em canais radiculares preenchidos com corantes. Estudo *in vitro*. / Regina Célia Lopes Valadares. – Campinas: [s.n.], 2008.
76f.: il.

Orientador: Rui Barbosa de Brito Júnior.
Dissertação (Mestrado em Endodontia) – C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação.

1. Agentes corantes. 2. Dente premolar. 3. Cavidade pulpar. 4. Endodontia. I. Brito Júnior, Rui Barbosa de. II. C.P.O. São Leopoldo Mandic – Centro de Pós-Graduação. III. Título.

**C.P.O. - CENTRO DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS
SÃO LEOPOLDO MANDIC**

Folha de Aprovação

A dissertação intitulada: “**COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO ÓPTICA DO LASER VERMELHO EM CANAIS RADICULARES PREENCHIDOS COM CORANTES. ESTUDO *IN VITRO***” apresentada ao Centro de Pós-Graduação, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração: _____ em __/__/____, à comissão examinadora abaixo denominada, foi aprovada após liberação pelo orientador.

Prof. (a) Dr (a)
Orientador

Prof. (a) Dr (a)
1º Membro

Prof. (a) Dr (a)
2º Membro

Aos meus pais.....

... pelo exemplo de vida e pela educação recebida.

Ao Brum e ao Arthur.....

Pelo carinho, apoio, incentivo e paciência nas horas difíceis.....

Recebam meu Respeito e Gratidão:

Ao Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, na pessoa do Professor Doutor José Luiz Junqueira, presidente do Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, meus sinceros agradecimentos.

Ao Professor Dr. Thomaz Wassall, diretor do Centro de Pós-Graduação CPO / São Leopoldo Mandic, pela confiança e incentivo.

À Professora Dra. Vera Cavalcanti Araújo, coordenadora do Curso de Doutorado do Centro de Pós-Graduação / CPO São Leopoldo Mandic, o meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Gerdal Roberto de Sousa, pela amizade, inestimável ajuda, incentivo e apoio à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Pinotti Barbosa, é com grande satisfação que te dedico os meus sentimentos sinceros de admiração, respeito e gratidão.

Ao Departamento de Engenharia Mecânica da UFMG, por disponibilizar o laboratório e por acreditar e praticar a transdisciplinidade.

Ao Prof. Marcos Vinícius Lucas Ferreira, pelo apoio, confiança e participação efetiva na parte prática do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior, pela segura orientação neste trabalho.

A Hypofarma, pelo fornecimento dos corantes.

A MM Optics, pelo fornecimento da fibra óptica.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a absorbância de três diferentes corantes quando irradiados por um laser vermelho de baixa intensidade, com comprimento de onda de 660nm e potência de 40mw. Sessenta dentes humanos, pré-molares inferiores unirradiculares, tiveram seus canais preparados pela técnica *ProTaper* com instrumentos de níquel titânio acionados a motor, irrigação com hipoclorito de sódio e EDTA. Os dentes foram separados em três grupos experimentais: no grupo A, foi utilizado o corante azul de metileno; no grupo B, o corante azul de orto toluidina; no Grupo C, o corante verde malaquita, todos na concentração de 0,01%. Os valores da absorbância foram obtidos por meio da leitura da transmissividade realizada pelo aparelho *Power Meter* inicialmente com todos os dentes irrigados com água (grupo *baseline*) e em seguida, em cada um dos grupos com os respectivos corantes. A análise estatística pelo método de *Friedman* e pelo teste das “Diferenças Mínimas Significativas” comprovou que, ao nível de 5%, o corante azul de orto toluidina gerou valores estatisticamente maiores que o corante verde malaquita em termos de transmissividade, porém, não foi identificada diferença em relação ao corante azul de metileno. Pelos resultados obtidos foi possível concluir que o corante verde malaquita apresentou valores de absorção estatisticamente maiores que o corante azul de orto toluidina e azul de metileno sendo promissor seu uso em terapia fotodinâmica em endodontia.

Palavras-chave: Corantes. Laser. Terapia fotodinâmica. Tratamento endodôntico.

ABSTRACT

The aim of the present work was to compare the absorbance of three different dyes when radiated by a low intensity red laser, with 660nm wave length and 40mw power. Sixty human teeth, uniradicular lower premolar had their canals prepared by the ProTaper technique with NiTi rotatory instruments, rinsed with sodium hypochlorite and EDTA. The teeth were separate in three experimental groups: group A, was made use of methylene blue; group B, toluidine blue O; group C, malachite green, all of them in 0.01% concentration. The value of absorbance was accomplished by means of lecture of transmissivity by Power Meter appliance with all teeth rinsed with water (baseline group) and consequently, in each one of the groups with the respective dyes. The statistics analysis by Friedman method and through "Significative Minimum Differences" proved that, at the level of 5%, toluidine blue O generated values statistically bigger than the malachite green in transmissible terms, however, was not identified a difference related to the methylene blue. The results showed that it was possible to conclude that the malachite green presented absorption values statistically bigger than the toluidine blue O and methylene blue, being promising its use in photodynamic therapy in endodontics.

Keywords: Dyes. Endodontic treatment. Laser. Photodynamic therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Espectro eletromagnético.	23
Figura 2 - Desenho didático ilustrando a penetração do laser em função do seu comprimento de onda.....	25
Figura 3 - Interação da luz com a matéria.....	26
Tabela 1 - Principais corantes utilizados em terapia fotodinâmica com suas respectivas bandas de absorção.....	30
Figura 4 - Dente fixado a estativa e com o ápice em contato com o sensor do Power Meter.....	49
Figura 5 - Medidor de Potência- Power Meter® - Nova - Ophir Optronics Jerusalém - Israel.....	50
Figura 6 - Laser em baixa intensidade (Twin Laser - MM Optics- SP).....	51
Figura 7 - Dente irrigado com água e irradiado através da fibra óptica.....	51
Figura 8 - Dente sendo secado com ponta de papel absorvente.....	52
Figura 9 - Dente sendo irrigado com o corante azul de metileno.....	53
Figura 10 - Dente irrigado com um dos corantes sendo irradiado e a leitura da transmissividade sendo feita pelo Power Meter.....	53
Figura 11- Leitura no visor do medidor de potência.....	54
Gráfico 1 - Média da transmissividade por corante e pela água utilizados em cada grupo.....	56
Tabela 2 - Valores de potência luminosa transmitida através das amostras.....	57
Gráfico 3 - Redução percentual média da transmissividade dos corantes em relação à água.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	- comprimento de onda
$^1\text{O}_2$	- oxigênio no estado singleto
^3T	- estado tripleto
μg	- micrograma
$\mu\text{g/ml}$	- micrograma por mililitro
μl	- microlitro
μm	- micrômetro
A	- área
CO_2	- dióxido de carbono
AsGaAl	- arseneto de gálio- alumínio
EDTA	- ácido etilenodiamino tetracético dissódico
Er:YAG	- érbio-ítrio-alumínio-granada
He-Ne	- Hélio- Neônio
Ho:YAG	- hólmio-ítrio-alumínio-granada
Hz	- Hertz
I	- intensidade
J	- joule
J/cm^2	- joule por centímetro quadrado
LED(s)	- light emitting diode (diodos emissores de luz)
LILT	- low intensity laser therapy (terapia laser de baixa intensidade)
LPS	- lipopolissacarídeo bacteriano
MB	- methilene blue (azul de metileno)
MEV	- microscopia eletrônica de varredura
mg	- miligrama
MG	- malachite green (verde malaquita)
min	- minutos
mJ	- milijoules
ml	- mililitro
mW	- miliwatts
mW/cm^2	- miliwatts por centímetro quadrado
Nd:YAG	- neodímio-ítrio-alumínio-granada
NiTi	- níquel-titânio

nm	- nanômetro
ns	- nanosegundos
P	- potência
PDT	- photodynamic therapy (terapia fotodinâmica)
pH	- potencial hidrogeniônico
PIT	- pre-irradiation time (tempo de pré-irradiação)
pps	- pulsos por segundo
s	- segundos
t	- tempo
TBO	- azul de orto toluidina
UV	- ultravioleta
W	- watts
W/cm ²	- watts por centímetro quadrado
µg/ml	- micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Aspectos microbiológicos das infecções endodônticas.....	15
2.2 Laserterapia de baixa intensidade.....	21
2.2.1 Aspectos históricos do laser	21
2.2.2 Características do Laser.....	23
2.2.3 Terminologia.....	26
2.2.4 Tipos de Lasers	28
2.3 Corantes fotossensibilizadores	29
2.4 Terapia Fotodinâmica	33
3 PROPOSIÇÃO	46
4 MATERIAL E MÉTODO.....	47
5 RESULTADOS.....	56
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO A - Carta de doação do banco de dentes da SLMANDIC	75
ANEXO B - Aprovação do COEP.....	76

1 INTRODUÇÃO

O objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação completa do tecido pulpar inflamado, infectado, degenerado ou necrótico e de todos os microrganismos do interior do sistema de canais radiculares durante a instrumentação (limpeza e modelagem) e a realização de uma obturação hermética tridimensional deste sistema em todo o seu volume e comprimento (Schilder, 1967; De Deus, 1992; Gutmann et al., 1999; Hizatugu, 2002; Kratchman, 2004).

Devido a fatores diversos como a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, acesso restrito aos túbulos dentinários, formação de lama dentinária e microbiota diversa, várias substâncias antimicrobianas para irrigação foram acrescentadas à fase de instrumentação, além de medicações entre - sessões do tratamento na tentativa de se obter uma maior desinfecção desta região, mas sem nunca conseguir a tão desejada esterilização do sistema de canais radiculares (Briseño et al., 1992; Katebzadeh et al., 1999; Fava et al., 2001; Cook et al., 2007; Davis et al., 2007; Siqueira Júnior et al., 2007a, b).

Bactérias e seus produtos estão associados à indução e à perpetuação das doenças pulpo-perirradiculares e são os principais responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico. Mais de duzentas espécies bacterianas diferentes, muitas potencialmente patogênicas, têm sido isoladas de canais radiculares infectados, usualmente em combinações de quatro a sete espécies, com grande prevalência de anaeróbias estritas. A formação de biofilmes tem importante significado clínico porque não somente os mecanismos de defesas do hospedeiro, mas também os esforços terapêuticos incluindo tratamento químico e mecânico antimicrobiano tem maior dificuldade de lidar com organismos que estão agrupados

em um biofilme (Kakehashi et al., 1965; Distel et al., 2002; Noiri et al., 2002; Leonardo et al., 2002; Siqueira Júnior, 2002; Estrela, 2004; Svensäter, Bergenholtz, 2004; Chávez de Paz, 2007).

Cientes da importância de se conseguir a inativação ou eliminação dos microrganismos do interior do sistema de canais radiculares visando à restituição das funções dentais normais, vários pesquisadores vêm estudando novos fármacos e novas tecnologias na tentativa de atingir este objetivo (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998; Stabholz, Sahar- Helft, Moshonov, 2004; Cordeiro, 2004).

Na Medicina e na Odontologia, os lasers têm sido utilizados como coadjuvantes nos tratamentos convencionais, principalmente por seus efeitos destrutivos contra microrganismos e com grandes vantagens sobre as medicações sistêmicas por não apresentarem efeitos colaterais, dano aos tecidos adjacentes, alteração da microbiota normal e tempo de tratamento curto (Fingar et al., 1990; Wilson, 1993; Zanim et al., 2002; Garcez et al., 2002, Wilson, 2004).

Na Endodontia, têm sido utilizados os lasers de baixa potência de diodo com emissão na região vermelha do espectro eletromagnético. Além de não provocarem aumento da temperatura intrapulpal ou no ligamento periodontal, o que poderia levar à necrose pulpar ou a reabsorções ósseas, são mais potentes, têm menor custo, é fácil fazer-se o cálculo da dose e a luz pode ser facilmente transmitida por uma fibra óptica fina compatível com o diâmetro da maioria dos canais (Garcez et al., 2003; Wilson, 2004; Soukos et al., 2006; Garcez, 2007; George, Kishen, 2007).

Os lasers substituíram as lâmpadas convencionais, que emitem luz branca, devido as suas características, como coerência temporal e espacial (propaga-se na mesma fase no espaço e no tempo) e podem apresentar uma alta

densidade de energia em pequenos pontos devido a sua alta direcionalidade e a monocromaticidade, que facilita a associação com um corante de banda de absorção ressonante ao comprimento de onda emitido pelo laser. Tais características conferem ao laser suas propriedades terapêuticas (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998; Mello, Mello, 2001; Garcez et al., 2003; Almeida-Lopes, 2004).

A terapia fotodinâmica (PDT) consiste na associação de um agente fotossensibilizador, normalmente exógeno, e uma fonte de luz potente que coincide com o espectro de absorção do fotossensibilizador utilizado, com o objetivo de provocar necrose celular (utilizada em tratamento de tumores) e morte microbiana. O mecanismo de ação se dá quando o agente fotossensibilizante absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado e transfere sua energia ao oxigênio e outras moléculas, resultando na liberação de substâncias energéticas, altamente reativas e de meia-vida curta, que interagem com os sistemas biológicos provocando dano aos tecidos tumorais e/ou aos microrganismos marcados pelo corante (Henderson, Dougherty, 1992; Dougherty, 1993; Fisher et al., 1995; Oleinick, Evans, 1998).

A busca por agentes fotossensibilizantes menos tóxicos, de maior absorção e mais ressonantes com o comprimento de onda emitido pelos lasers tem sido uma constante no campo da terapia fotodinâmica, tanto para o tratamento de cânceres como para a eliminação de microrganismos. E quanto mais próximos destes ideais novos agentes fotossensibilizantes se mostrarem, mais a terapia fotodinâmica realizará seu potencial na redução microbiana. Para isto, diversos corantes vêm sendo testados, nas cores azuis, roxas, marrons, verde, entre outras (Okamoto et al., 1992; Usacheva et al., 2001, 2003a, b; Gonçalves, 2005).

Pelo exposto, a terapia fotodinâmica com fotossensibilização letal apresenta capacidade comprovada na redução bacteriana, o que é de grande interesse na área endodôntica. Justifica-se comparar dentre os corantes mais utilizados na PDT e também nos consultórios odontológicos aquele que apresenta melhor absorção em uma banda mais próxima à emissão do laser de comprimento de onda de 660nm disponível à classe odontológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos microbiológicos das infecções endodônticas

Embora fatores não-microbianos endógenos ou exógenos possam estar envolvidos em alguns casos de insucesso endodôntico, microrganismos e seus produtos, constituindo infecção persistente ou secundária, são os principais responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico (Kakehashi, 1965; Noiri et al, 2002; Siqueira Júnior, 2002; Lopes, Siqueira Júnior, 2004).

O fracasso da terapia endodôntica pode ocorrer mesmo quando realizado de forma adequada, devido à impossibilidade de remoção dos microrganismos localizados nos túbulos dentinários, em irregularidade das paredes do canal, em deltas e ramificações, em lacunas de reabsorção e em lesões perirradiculares (Sjögren et al., 1990; De Deus, 1992; Leonardo et al., 2002; Lopes, Siqueira Júnior, 2004; Svensäter, Bergenholtz, 2004).

A maioria da microbiota endodôntica encontra-se em suspensão, mas grandes aglomerações de células bacterianas podem ser vistas aderidas às paredes do canal e muitas das vezes se estendem ao interior dos túbulos dentinários, formando biofilme de multiespécies e multicamadas (Noiri et al, 2002; Svensäter, Bergenholtz, 2004; Nair et al., 2005; Chávez de Paz, 2007).

Os microrganismos que compõem um biofilme apresentam elevada resistência aos efeitos de agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Podem ser no mínimo, dez vezes mais resistentes a antibióticos do que células planctônicas (em suspensão) (Lopes, Siqueira Júnior, 2004).

Takehashi et al. (1965) verificaram o papel dos microrganismos no reparo de polpas expostas ao meio oral em ratos convencionais e *germ-free*. Após oito dias, nos ratos convencionais, ocorreu completa necrose pulpar com granuloma e abscesso. Ao contrário, nos animais *germ-free* não houve necrose pulpar, granuloma e nem abscessos. Nestes, ponte dentinária começou a ser formada no 14º dia e completou-se no período de 21 a 28 dias, independente da severidade da exposição. Concluíram que a presença ou ausência de microrganismos é o principal determinante na cicatrização de polpas expostas ao meio bucal.

Sjögren et al. (1990) avaliaram os vários fatores que poderiam afetar o resultado em longo prazo (oito a dez anos) pós-tratamento endodôntico. Os resultados foram diretamente dependentes da condição pré-operatória da polpa e dos tecidos periapicais, da instrumentação em todo o comprimento do canal, do nível da obturação e a presença ou não de radiolusência periapical. O estudo mostrou que dentes sem lesão periapical tiveram 96% de sucesso. Por outro lado, dentes com polpa necrótica e lesão periapical e aqueles com lesão periapical sob retratamento tiveram baixa taxa de sucesso, de 86% a 62% respectivamente. Estes resultados deram suporte à hipótese de que a persistência de bactéria em locais inacessíveis aos procedimentos endodônticos poderia ser a causa primária de falha do tratamento.

Leonardo et al. (2002) avaliaram a presença de biofilme bacteriano e microrganismos na superfície externa do ápice radicular em dentes com polpa necrótica com e sem lesão periapical visível e em dentes com polpa vital. Concluíram que microrganismos estavam sempre presentes em dentes com polpa necrótica e com lesão periapical visível, às vezes sozinhos ou em biofilme apical.

Nenhum microrganismo foi encontrado na superfície radicular externa de dentes saudáveis ou em dentes com polpa necrótica sem lesão periapical visível.

Noiri et al. (2002) avaliaram a participação de biofilme bacteriano extra-radicular em periodontite periapical refratária, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Examinaram a superfície dos dentes extraídos, os ápices radiculares e as pontas dos cones de guta-percha removidas durante tratamento cirúrgico ou endodôntico, a presença de biofilme nestes e em lesões periapicais. Em nove das onze amostras examinadas, biofilme bacteriano foi encontrado na área extra-radicular. Os achados deste estudo, no qual biofilme bacteriano foi encontrado na área extra-radicular dentro do corpo de lesões, é evidência da presença de bactéria dentro de lesão periapical e está relacionada à periodontite periapical refratária.

Distel et al. (2002) avaliaram por meio de microscopia eletrônica de varredura e da microscopia de varredura a laser a hipótese de que o *Enterococcus faecalis* forma biofilme, o que o permite resistir à medicação intracanal com hidróxido de cálcio e infectar cronicamente o sistema de canais radiculares. Houve total colonização de todas as amostras após uma média de 77 dias de incubação em canais medicados com pasta de hidróxido de cálcio. Houve colonização da superfície dentinária e do hidróxido de cálcio. Os autores sugeriram que a formação de biofilme poderia ser o mecanismo que permite a estes organismos a resistirem ao tratamento endodôntico.

Siqueira Júnior et al. (2002) investigaram o padrão de colonização da dentina radicular por cinco espécies de fungo. Diferente das outras espécies, *Candida albicans* colonizou a maioria dos espécimes e mostrou diferentes padrões de infecção da dentina. Algumas áreas das paredes do canal foram cobertas por

espessas colônias e alguns túbulos dentinários foram profundamente infectados, o que explicaria porque *C. albicans* é a espécie de fungo mais freqüente encontrada em infecção endodônticas.

Svensäter & Bergenholtz (2004) em uma revisão da literatura, apresentaram o conceito de biofilme, as condições sob as quais ocorrem em infecções endodônticas e as medidas a serem tomadas para sua erradicação. O estabelecimento de um biofilme em uma superfície segue uma série de estágios, incluindo deposição de um filme condicionador, adesão e colonização de microrganismos planctônicos em matriz extracelular polimérica, co-adesão de outros organismos e deslocamento de microrganismos para espalhamento e colonização de outros sítios. Bactérias reunidas em biofilme são capazes de degradar moléculas complexas de nutrientes, as quais não poderiam ser degradadas individualmente, e se tornam mais resistentes a agentes antimicrobianos e que este agrupamento por si leva a surgir vários fenótipos de diferentes espécies. Microrganismos orais têm a capacidade de responder e adaptar às alterações das condições do meio ambiente. As bactérias comunicam entre si para controlar funções celulares e várias propriedades microbianas, incluindo virulência, a habilidade de formar biofilme e incorporar DNA extracelular. Exacerbações de lesões endodônticas podem ser explicadas pela alteração de nutrientes no espaço do canal, provocando alterações ecológicas, que promovem o crescimento de bactérias proteolíticas e também devido à injúria aos tecidos periapicais, sobreinstrumentação ou perda do selamento coronário.

Nair et al. (2005) avaliaram, *in vivo*, a infecção residual intracanal em raízes mesiais de molares após tratamento em sessão única, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados revelaram que 14 dos 16 dentes

tratados endodonticamente revelaram infecção intracanal residual após instrumentação, irrigação antimicrobiana com hipoclorito de sódio 5,25% e 10ml de EDTA a 17% e obturação em sessão única. Os microrganismos estavam localizados em áreas inacessíveis (istmos, canais acessórios), principalmente em biofilme. Os achados demonstraram a importância de aplicação severa de toda medida químico-mecânica não antibiótica para tratar dentes com polpa necrótica e infectada tanto para desfazer o biofilme quanto para reduzir a contaminação microbiana intraradicular para níveis mais baixos possíveis.

Chávez de Paz (2007), revisando a literatura, apresentou evidências de que a natureza da infecção endodôntica persistente depende da capacidade de adaptação fisiológica às novas condições do meio ambiente, tais como o aumento do pH pelo hidróxido de cálcio ou o efeito de antimicrobianos. Tais alterações são capazes de disparar alterações genéticas em cascata que modificam as características fisiológicas das células bacterianas. Conclui que o papel de espécies individuais é secundário na persistência da infecção endodôntica quando comparada com as alterações adaptativas da comunidade polimicrobiana em biofilme sob alterações genéticas e fisiológicas em resposta a alterações do meio ambiente do canal radicular.

Schirrmeister et al. (2007) estudaram, *in vivo*, a presença de microrganismos em dentes obturados, assintomáticos, com lesão periapical, antes e após o retratamento endodôntico. Os métodos de cultura e PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) mostraram que os dentes obturados portadores de lesão periapical tinham 60% e 65% de microrganismos, respectivamente. Durante o retratamento o regime de desinfecção usado foi irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5% e EDTA a 17%, clorexidina a 2% e curativo com hidróxido de cálcio. Foram

realizadas amostras microbianas após cada passo de desinfecção durante o retratamento. Nenhum microrganismo, nem DNA bacteriano foram detectados após a remoção da obturação, reparo do canal e irrigação com hipoclorito e EDTA. Concluíram que adequada remoção do material obturador, adequado preparo do canal radicular, irrigação copiosa com hipoclorito e EDTA são suficientes para descontaminação do sistema de canais radiculares durante o retratamento endodôntico, não sendo necessária a irrigação com clorexidina e curativo com hidróxido de cálcio.

Cook et al. (2007) avaliaram os efeitos da obturação do canal com ou sem curativo de hidróxido de cálcio ou clorexidina na persistência de bactérias ou presença de DNA bacteriano em túbulos dentinários. Não foi observado crescimento em nenhum dos grupos medicados. Usando PCR (polymerase chain reaction) *Enterococcus faecalis* só não foi detectado no grupo irrigado por dez minutos com clorexidina a 2%. Concluem que tratamento com clorexidina seguida pela obturação foi mais efetivo na remoção de DNA de *E. faecalis* do que colocação de hidróxido de cálcio ou obturação imediata.

Siqueira Júnior et al. (2007a) avaliaram a redução bacteriana após preparo químico-mecânico usando 0,12% de solução de clorexidina como irrigante e adicional efeito bactericida de curativo intracanal com hidróxido de cálcio associado com 0,12% de clorexidina gel. Concluíram que o preparo químico-mecânico com 0,12% de clorexidina gel como irrigante reduziu significativamente o número de bactérias no interior do canal, mas falhou em tornar o canal livre de bactérias cultiváveis em pouco mais da metade dos casos (53,8%). Sete dias de medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio/paramonoclorofenol canforado (CPMC) aumentou significativamente o número de culturas negativas.

Siqueira Júnior et al. (2007b) investigaram a redução bacteriana após instrumentação usando hipoclorito de sódio a 2,5% como substância irrigadora e um curativo adicional entre as sessões de tratamento com pasta de hidróxido de cálcio / paramonoclorofenol canforado (CPMC) em dentes com infecção intra-radicular primária e periodontite apical crônica. Amostras bacterianas foram obtidas antes do tratamento, após o preparo químico-mecânico usando a irrigação com hipoclorito e após os sete dias medicados com pasta de hidróxido de cálcio em paramonoclorofenol canforado. Concluíram que o preparo químico-mecânico com irrigação com hipoclorito a 2,5% reduziu o número de bactérias no canal, mas falhou em tornar o canal livre de bactérias cultiváveis em mais da metade dos casos (54,5%). Sete dias de medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio/CPMC aumentou significativamente o número de culturas negativas (apenas um caso foi positivo).

2.2 Laserterapia de baixa intensidade

2.2.1 Aspectos históricos do laser

A palavra laser é um acrônimo composto pelas iniciais da expressão Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, cuja tradução seria: amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Esta radiação é do tipo eletromagnético não ionizante, sendo uma fonte luminosa com características bastante específicas (Brugnera Junior, Pinheiro, 1998; Mello, Mello, 2001; Almeida Lopes, 2004).

A emissão estimulada foi descrita pela primeira vez por Albert Einstein em 1917. Em 1958, Shawlow & Townes sugeriram que os princípios básicos da emissão estimulada poderiam ser aplicados à amplificação da luz. Em 1961, foram

desenvolvidos os lasers de Nd:YAG e o laser de dióxido de carbono (CO₂), em 1965, para serem utilizados nos procedimentos cirúrgicos. Mais tarde surgiam os lasers de Ho:YAG, diodos, e Er:YAG (Almeida-Lopes, 2004).

As primeiras aplicações clínicas com laser operando em baixa intensidade datam de 1966, ocasião da apresentação dos primeiros relatos de casos clínicos sobre bioestimulação pelo professor Endre Mester, de Budapeste, usando lasers de rubi e de argônio.

Os lasers terapêuticos mais utilizados nas décadas de 70 e 80 foram os de He-Ne com emissão na região do vermelho (632,8nm). Nesta região do espectro eletromagnético, a radiação laser apresenta pequena penetração nos tecidos biológicos, o que limitava a sua utilização em lesões mais profundas, sendo preciso uma fibra óptica para conduzir a luz para o interior do corpo do paciente, o que tornava a técnica invasiva (Almeida-Lopes, 2004).

A partir do final da década de 70, começaram a serem desenvolvidos lasers diodo semicondutores, capazes de gerar comprimento de ondas diverso. As vantagens deste sobre o laser de He-Ne é que, além da menor dimensão, apresenta maior penetração nos tecidos biológicos e pode operar de forma contínua ou pulsada, enquanto que o He-Ne só opera de modo contínuo.

A utilização adequada da tecnologia laser está na dependência das características de absorção de determinado comprimento de onda e das propriedades ópticas do tecido irradiado (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998; Zanim, 2003; Almeida-Lopes, 2004).

2.2.2 Características do Laser

A luz pode ser descrita como emissões eletromagnéticas, as quais estão contidas em uma grande banda ou faixa e estão organizadas segundo o que se chama de Espectro de Radiações Eletromagnéticas, baseado no comprimento de onda (figura 1).

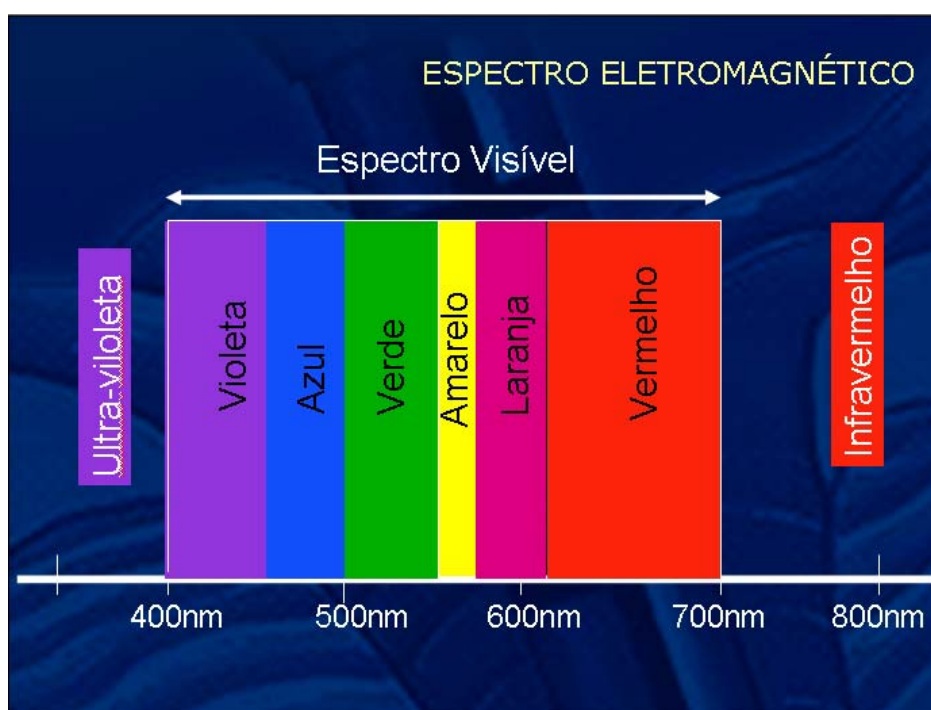


Figura 1 - Espectro eletromagnético.

Fonte: Gerdal, 2007.

Os lasers de baixa intensidade utilizados em Medicina e Odontologia emitem radiações que estão situadas na porção visível do espectro das radiações eletromagnéticas, bem como no infravermelho próximo, não são ionizantes, com comprimento de onda entre 600 e 1000 nanômetros e com características bastante distintas. A radiação laser é monocromática, ou seja, apresenta um único comprimento de onda. Apresenta coerência temporal e espacial, isto é, propaga-se

com mesma fase no espaço e tempo, o que permite concentrar intensa quantidade de energia em pequenos pontos (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998).

Sua unidade básica é conhecida como fóton. O laser é um tipo de luz cujos fótons são idênticos e se propagam sobre trajetórias paralelas, com velocidade constante, diferentemente da luz comum, onde fótons de comprimentos de onda diversos são emitidos e se propagam em todas as direções (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998; Almeida-Lopes, 2004).

O comprimento de onda é um dos quesitos que define a profundidade de penetração no tecido alvo. A grandeza física para comprimento de onda é representada pela letra grega lâmbda (λ) e tem como unidade de medida o micrômetro ($\mu\text{m}=10^{-6}\text{m}$) ou nanômetro ($\text{nm}=10^{-9}\text{m}$).

As radiações emitidas na região do ultravioleta e na região do infravermelho médio apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, fazendo com que a radiação seja absorvida na superfície, enquanto que na região do infravermelho próximo (820 e 840nm) constata-se baixo coeficiente de absorção, implicando em máxima penetração no tecido (figura 2) (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998; Almeida-Lopes, 2004).

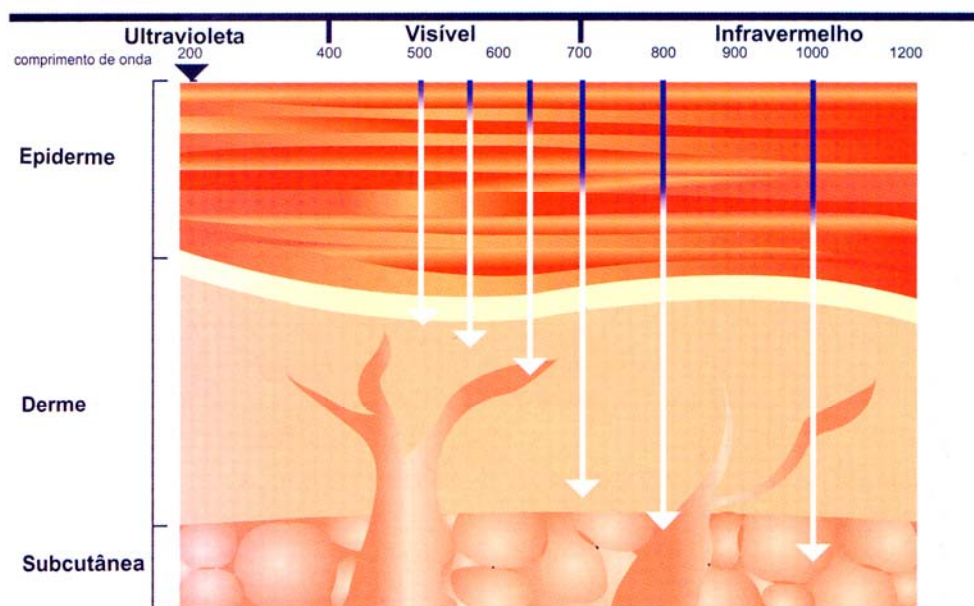


Figura 2 - Desenho didático ilustrando a penetração do laser em função do seu comprimento de onda

Fonte: Almeida-Lopes, 2004. p. 27.

O feixe laser pode ser absorvido ao atingir a superfície do tecido; transmitido quando a luz atravessa a região irradiada; refletido quando atinge o tecido; ou sofrer espalhamento, quando o feixe espalha-se no interior do tecido em várias direções (figura 3).

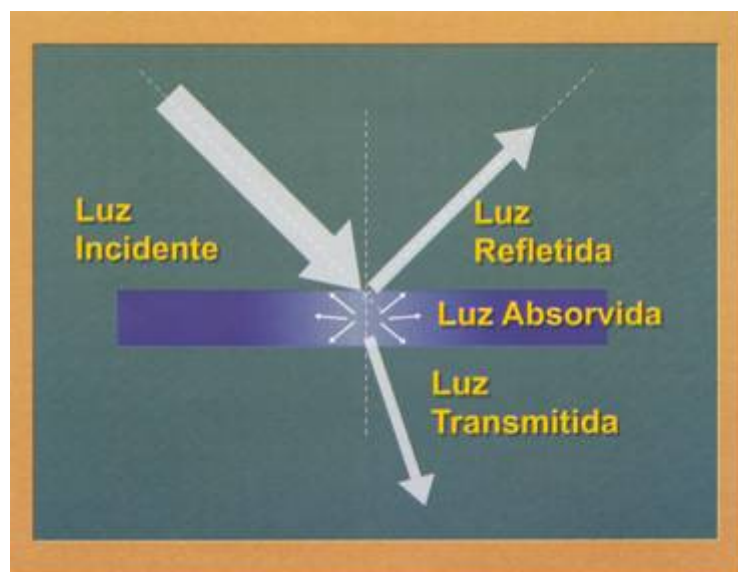


Figura 3 - Interação da luz com a matéria

Fonte: Almeida-Lopes, 2004. p. 16

Para a identificação do laser precisamos conhecer sua fonte geradora, caracterizada pelo meio ativo, e sua intensidade caracterizada pela potência óptica produzida ou energia gerada do laser. A potência é expressa em Watts ou fração dela (mW=miliWatt=0,001Watt) (Marques, Eduardo, 1998).

2.2.3 Terminologia

Irradiância, intensidade ou densidade de potência (DP) é definida como sendo a potência óptica útil do laser, expressa em Watts (W), dividida pela área irradiada, expressa em centímetros quadrados (cm^2) (Equação 1).

Fluência é o termo utilizado para descrever a dose de energia que está sendo aplicada no tecido biológico. Ao multiplicarmos a potência (W) pelo tempo de exposição (expresso em segundos), dividindo-se pela área de *spot* (em centímetros quadrados), obteremos a fluência ou dose, ou ainda, densidade de energia (DE)

expressa em joules por centímetros ao quadrado (J/cm^2) (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998; Mello, Mello, 2001) (Equação 2).

(Equação 1)

$$DP \text{ (W/cm}^2\text{)} = \frac{P(W)}{A \text{ (cm}^2\text{)}}$$

(Equação 2)

$$DE \text{ (J/ cm}^2\text{)} = \frac{P(W) \times T \text{ (s)}}{A \text{ (cm}^2\text{)}}$$

DP = Densidade de potência

DE = Densidade de energia

P = Potência

T = tempo

A = Área

A partir desses conhecimentos básicos pode ser notado que a densidade de potência, o tempo de irradiação ou ambos podem variar para fornecer a mesma dose de luz, que é a densidade de energia depositada no tecido alvo. Percebe-se, ainda, que a densidade de potência pode ser controlada pelo tamanho do spot (saída da luz) do feixe luminoso incidente. Ao dobrar a área de spot a densidade de potência torna-se quatro vezes menor (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998).

2.2.4 Tipos de Lasers

Existem dois tipos básicos de lasers: alta e baixa intensidade.

- a) lasers em alta intensidade ou em alta densidade de energia são os lasers cirúrgicos, promovem corte, vaporização tecidual, hemostasia e resultam em efeito térmico;
- b) lasers em baixa intensidade ou em baixas densidades de energia são designados lasers frios, não térmicos ou não cirúrgicos e podem ocasionar efeitos de bioestimulação a nível celular, com produção de resposta fisiológica e aumento de atividade funcional.

Os lasers utilizados em baixa intensidade estão situados na porção visível do espectro das radiações eletromagnéticas, bem como no infravermelho próximo. Os comprimentos de onda mais utilizados estão entre 600 e 1000nm, e de um modo geral, são relativamente pouco absorvidos, portanto, apresentam uma boa transmissão em tecidos moles, tanto em pele como em mucosas. Apresentam potências inferiores aqueles em alta intensidade, tendo como potência média 30 a 100mW (Brugnera Júnior, Pnheiro, 1998; Almeida-Lopes, 2004).

Os efeitos biológicos dos lasers em baixa intensidade são relatados desde 1964, pelo grupo do professor Endre Mester (Budapeste). Sabe-se desde então que a irradiação de um tecido vivo com lasers de baixa intensidade provoca um aumento na síntese de proteínas da célula e mudança na distribuição de cargas elétricas na membrana celular. Os efeitos observados demonstram aceleração de cicatrização, analgesia e redução do processo inflamatório.

Os lasers de baixa intensidade são utilizados para biomodulação da resposta celular frente a uma situação de inflamação instalada. Atuam no local da

irradiação com efeitos antiinflamatórios, bioestimulante e analgésico local, através de seu efeito fotodinâmico e fotoquímico. São indicados com propósitos terapêuticos, em caso de aceleração de respostas fisiológicas e reparativas e supressão de dor (Almeida-Lopes, 2004; Lizarelli, 2005).

Os principais efeitos biológicos são: crescimento celular estimulado, reparo ósseo, regeneração celular, efeito antiinflamatório, redução de edema, revascularização, redução de fibrose e função analgésica (Brugnera Júnior, Pinheiro, 1998; Mello, Mello, 2001; Sousa, 2001; Almeida-Lopes, 2004).

2.3 Corantes fotossensibilizadores

Um agente fotossensibilizador ideal deve ser biologicamente estável, fotoquimicamente eficiente, seletivo, e minimamente tóxico aos tecidos normais.

Segundo Acroyd et al. (2001) e Garcez et al. (2003), as pesquisas no campo dos corantes se concentram nas porfirinas, que têm um anel heterocíclico, similar ao da clorofila e da hemoglobina.

Os fotossensibilizadores ou corantes absorvem os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado excitado e transfere energia ao oxigênio e a outras moléculas, resultando em espécies altamente reativas e de vida curta, como o oxigênio singleto, que interagem com os sistemas biológicos, provocando dano aos tecidos (Oleinick, Evans, 1998; Wainwright, 1998; Acroyd et al., 2001).

Os principais corantes encontrados na literatura com suas respectivas bandas de absorção, são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Principais corantes utilizados em terapia fotodinâmica com suas respectivas bandas de absorção

Corantes	Banda de absorção
Derivados da hematoporfirina	620 - 650nm
Fenotiazinas (MB, TBO)	620 - 700nm
Cianinas (Indocianina verde)	600 - 805nm
Fitoterápicos (Azuleno)	550 - 700nm
Ftalocianinas	660 - 700nm
Triarilmetano (MG)	617 - 630nm

Fonte: Modificado de Garcez, 2003. p. 224

A toxicidade dos fotossensibilizadores mais utilizados em PDT ainda é elevada, tornando o uso viável apenas em pequenas concentrações, o que diminui a absorção de luz e, conseqüentemente, a eficácia (Okamoto et al., 1992; Ackroyd et al., 2001; Usacheva et al., 2001).

A procura por agentes fotossensibilizadores menos tóxicos, de maior absorção, mais ressonantes com os comprimentos de onda dos aparelhos utilizados e mais eficientes tem sido uma constante no campo da PDT, tanto no tratamento de tumores, como na eliminação de microrganismos (Garcez et al., 2003).

A estrutura molecular do fotossensibilizador, sua interação com o comprimento de onda da luz, atividade lipofílica, ionização, sua intensidade de absorção de luz e a eficiência na produção de oxigênio singleto são importantes para determinação do seu perfil antimicrobiano, podendo agir sobre bactérias, fungos, leveduras e vírus (Felber et al., 1973; Wainwright, 1998; Hamblin et al., 2002; Souza et al., 2006; Amorim, 2007).

A possibilidade de um composto funcionar como fotossensibilizador é determinada, em parte, pela sua capacidade de absorver luz do comprimento de onda emitido pela fonte. A íntima relação entre absorção do corante e comprimento de onda tem que ser observado no uso da PDT. A toxicidade na célula somente ocorre quando a banda de absorção do fotossensibilizador é ressonante com a radiação emitida (Henderson, Dougherty, 1992; Ackroyd et al., 2001).

Quando associado ao laser de baixa-intensidade de He-Ne, o TBO é mais eficiente fotossensibilizador do que o azul de metileno (MB), pois sua absorção máxima está no comprimento de 632,2nm, ressonante ao do laser de He-Ne, que é 632,8nm, enquanto o corante MB tem sua absorção máxima sob o comprimento de onda de 664nm (Dobson, Wilson, 1992; Wilson, Dobson, 1993).

A concentração do corante é fator relevante para o sucesso da terapia. Devem ser utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, não deve produzir danos ao alvo sem a ativação da luz (toxicidade no escuro). As concentrações variam de um fotossensibilizador para outro, de acordo com as características químicas de cada composto e de sua toxicidade (Okamoto et al., 1992; Usacheva et al., 2001).

Os corantes TBO e MB do grupo das fenotiazinas utilizados neste estudo, em baixas concentrações não produzem ação citotóxica e a dose necessária para a morte bacteriana é menor que a dose necessária para provocar danos à célula do hospedeiro (queratinócitos e fibroblastos) (Soukos et al., 1996; George, Kishen, 2007).

Os corantes TBO e MB são usados rotineiramente na clínica médica e odontológica e apresenta a característica de interagir com várias substâncias orgânicas, inclusive com o biofilme bacteriano (Dobson, Wilson, 1992; Soukos et al., 2000; Seal et al., 2002; Zanim et al., 2002).

Diversos estudos demonstram a ação bactericida dos corantes MB e TBO quando associados ao laser de baixa intensidade em bactérias cariogênicas (Soukos et al; 2000; Zanim et al., 2002; Zampieri et al., 2003; Wilson, 2004), periodontopatogênicas (Dobson, Wilson, 1992; Wilson, Dobson, 1993; Soukos et al., 1996; Chan, Lai, 2003; Kömerik et al., 2003; Wilson, 2004; Sousa, 2007) e endodônticas (Usacheva et al., 2001; Seal et al., 2002; Wilson, 2004; Soukos et al; 2006; George, Kishen, 2007).

Periodontistas usam o verde malaquita (MG) a 0,1% w/v para evidenciar a placa bacteriana. Entretanto, apesar de seu uso na prática clínica, não tem sido usado como fotossensibilizador em aplicações da PDT oral. Este corante catiônico pertence à família dos triarilmetano, que inclui também violeta cristal e azul vitória, mostra forte absorção no fim do espectro vermelho visível e apresenta trânsito fácil através da membrana celular de espécies gram-positiva e gram-negativa (Prates, 2005).

Golding et al. (1998) avaliaram o potencial de isotiocianato de verde malaquita como fotossensibilizador para a inativação de *Staphylococcus aureus*. Demonstraram a inativação da bactéria após exposição a ondas contínuas de luz de xenônio de alta potência com filtros apropriados e que o corante possui a maioria das qualidades requeridas de um eficiente fotossensibilizador, incluindo absorção de luz no fim do vermelho do espectro visível, fotoprodutos descoloridos e forte efeito bactericida em meio anaeróbio.

Prates et al. (2007) investigaram a habilidade do corante verde malaquita associado ao laser vermelho de baixa intensidade em eliminar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen, Kilian, 2006) (anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) e a fotodegradação do corante

após a PDT por espectroscopia de absorção óptica. Mostraram que MG age como fotossensibilizador e que houve redução de 99,9% de *A. actinomycescomitans* com dose de energia de 9J/cm² e redução de 97,2% usando 5,4J/cm². Observaram ainda que o corante sofre fotodegradação após a irradiação e novos fotoprodutos foram formados em suspensão.

2.4 Terapia Fotodinâmica

Os lasers de baixa intensidade quando associados a alguns corantes, geralmente exógenos, podem produzir morte bacteriana. Esse processo é conhecido por terapia fotodinâmica ou PDT (Photodynamic Therapy). A morte microbiana ocorre quando o corante absorve a energia luminosa, levando-o a produzir substâncias altamente reativas, que causam danos ao microrganismo ou à célula alvo (Henderson, Dougherty, 1992; Dougherty, 1993; Bonnet, 1995; Oleinick, Evans, 1998).

Embora sua principal aplicação seja o tratamento de tumores, o uso da PDT no tratamento de psoríase e na inativação de bactérias, fungos e vírus (incluindo HIV), tem sido documentado (Felber et al., 1973; Fisher et al., 1995; Chan, Lai, 2003; Souza et al., 2006).

Na Odontologia, sua utilização é bastante indicada, visto que a terapia fotodinâmica mostra-se mais eficiente em infecções localizadas, de pouca profundidade e de microbiota conhecida. Além de ser uma terapia de baixo custo, com mínimos efeitos colaterais e sem efeitos sistêmicos (Garcez et al., 2003; Wilson, 2004).

Dobson & Wilson (1992) avaliaram a capacidade de sensibilização letal de vários corantes em bactérias em biofilme sob a luz de um laser de baixa intensidade. Foram estudados os biofilmes de *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Os corantes azul de orto toluidina (TBO) e azul de metileno (MB) foram efetivos contra biofilme de todas as espécies periodontopatogênicas estudadas após a exposição ao laser de He-Ne (7,3mW) por 30s para MB e apenas 10s para TBO com dose de 16,5J/cm². As porfirinas não foram efetivas contra bactérias gram-negativas em biofilme. Apenas os corantes violeta cristal, MB, TBO, *arianor steel blue* e ftalocianina alumínio dissulfonatada foram capazes de sensibilizar os *S. sanguis* quando em biofilme, e eliminá-los após exposição ao laser de He-Ne por 10s com dose de 5,5J/cm².

Okamoto et al. (1992) investigaram, *in vitro*, o efeito bactericida da irradiação com laser de He-Ne em microrganismos cariogênicos utilizando 17 diferentes tipos de corantes (azuis, roxos, verdes, amarelo e vermelho). O efeito bactericida foi determinado pela formação de halo inibitório de crescimento ou pela contagem de colônias de bactérias viáveis. Concluíram que o efeito letal aos microrganismos era conseguido apenas na presença de corantes específicos.

Em um estudo sobre terapia fotodinâmica na inativação de bactérias gram-negativas Malik et al. (1992) apresentaram os problemas e as possíveis soluções. Citaram como principal problema de resistência a fototoxicidade mediada por porfirinas às características complexas da membrana externa que impedem a ação das porfirinas sobre a membrana interna. Apresentaram como possíveis soluções para alterar a estrutura da membrana externa, o uso do pré-tratamento com EDTA para remoção do lipopolissacarídeo da membrana externa, seguido de

fotoativação com ftalocianinas, ou o uso de baixas concentrações de substâncias policatiônicas Lys 20 e Polimixina B nonapeptídeo (PMBN). Ambas as substâncias tornam várias bactérias gram-negativas sensíveis aos antibióticos hidrofóbicos, corantes e detergentes.

Algumas bactérias da cavidade oral, incluindo as anaeróbias periodontopatogênicas *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, são suscetíveis a morte por luz vermelha após sensibilização com baixas concentrações de certos corantes. Wilson & Dobson (1993) investigaram o potencial de três corantes, azul de toluidina, diematoporfirina ester (DHE) e alumínio dissulfonatada ftalocianina (ADP) sobre estas bactérias. Concluíram que TBO é um efetivo fotossensibilizador para ambas as bactérias quando usado em baixa concentração (25µg/ml) e com baixa dose de luz (292mJ) numa densidade de 22 J/cm². Os corantes ADP e DHE foram eficientes contra *P. gingivalis*, mas totalmente ineficientes contra *F. nucleatum*. Estes achados pressupõem que a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos e anti-sépticos na profilaxia e/ou controle de doenças causadas por estes microrganismos.

Em uma revisão da literatura sobre novas substâncias sensibilizadoras, usadas em terapia fotodinâmica, Bonnet (1995) abordou os mecanismos fotodinâmicos, os sensibilizadores em uso, as pesquisas e qualidades desejáveis da segunda geração de fotossensibilizadores. O *m-THPC* (m-tetrahidroxifenil clorina) pareceu ser o mais promissor dos quatro novos sensibilizadores estudados, pois tem alta seletividade para o tecido tumoral, forte absorção em 652nm, é uma substância simples, suficientemente solúvel em mistura de solvente hidroxílico, apresenta baixa toxicidade no escuro, não é mutagênico e causou menos fotossensibilização em

tecidos normais (pele, músculo) do que o bem estabelecido Photofrin®¹ (mistura heterogênea de porfirinas). Concluiu que as grandes indústrias farmacêuticas não revelaram ainda interesse nesta área, provavelmente devido a não familiaridade com a tecnologia laser.

Soukos et al. (1996) estudaram, *in vitro*, os efeitos fotodinâmicos do laser vermelho (He-Ne 7,3mW) e do corante azul de orto toluidina sobre queratinócitos, fibroblastos e *Streptococcus sanguis*. O objetivo do trabalho foi avaliar se a terapia fotodinâmica poderia ser usada no tratamento da doença periodontal de forma que apenas as bactérias seriam mortas sem causar dano aos tecidos adjacentes. Em uma cultura de queratinócitos e fibroblastos obtidos do tecido gengival humano, os autores avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de TBO (0,5 a 50µg/ml) e também a absorção do corante pelas células. Como resultados obtiveram que, após exposição ao corante nas concentrações de 2,0µg/ml e 5,0µg/ml, a viabilidade de queratinócitos e fibroblastos, respectivamente, não foi afetada pela exposição ao laser por mais de 2min. A porcentagem de absorção de TBO pelas células foi de 7,5% para queratinócitos e 6,9% para fibroblastos. *Streptococcus sanguis* foram eliminados quando expostos à luz por 75 segundos na presença de TBO em concentração de 2,5µg/ml.

Wainwright et al. (1997a) estudaram, *in vitro*, a atividade fotobactericida de vários fotossensibilizadores do grupo das fenotiazinas em amostras de bactérias gram-positivas e gram-negativas usando uma fonte de luz não laser de 1,75mW. Concluíram que houve um aumento da atividade bactericida e que a iluminação resultou em considerável diminuição no nível da concentração letal mínima requerida.

¹ PHOTOFRIN® é a marca registrada da Axcan Pharma PDT Inc. usada sob licença pela Axcan Pharma (Ireland) Ltd.

Wainwright et al. (1997b) estudaram a citotoxicidade e fototoxicidade do corante azul de metileno (MB) e seus derivados dimetil - metileno e 1 metil - metileno em tumores de rato. Sucessivas metilações levaram ao aumento da produção de oxigênio singleto explicando o aumento da toxicidade dos derivados quando comparados ao azul de metileno sob a luz de $7,2\text{J}/\text{cm}^2$. A fototoxicidade do MB aumentava com o aumento da fluência, o que não ocorria com seus derivados. As taxas de redução mais baixa, junto com a localização intracelular e maior absorção podem explicar o aumento da toxicidade no escuro dos derivados metilados.

Wainwright (1998) revisando a literatura propôs o termo Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) ou Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Discorreu sobre os vários fotossensibilizadores naturais e sintéticos, a ação antimicrobiana fotodinâmica e sobre as perspectivas futuras da técnica, que até então tinha como principal uso a desinfecção de produtos do sangue, particularmente para inativação viral. Relatou que a técnica tem mostrado ser efetiva, *in vitro*, contra bactérias, incluindo cepas droga-resistente, fungos, vírus e parasitas. Finalizou dizendo que PACT é uma terapia de baixo custo proposta para o tratamento de infecções localizadas.

Wainwright et al. (1998) avaliaram, *in vitro*, a atividade fotodinâmica antibacteriana de uma série de corantes fenotiazínicos em cepas de *Staphylococcus aureus*, quatro das quais eram resistentes à meticilina (MRSA), principal causa de infecção hospitalar. As amostras de MRSA não foram suscetíveis à série análoga da meticilina, a flucloxacilina. A iluminação dos fotossensibilizadores, com exceção do Azure B, numa fluência de $1,75\text{mW}/\text{cm}^2$, resultou em intensificação da atividade antibacteriana em cultura líquida e em maior eficácia do que a flucloxacilina. Dimetil azul de metileno (DMMB) e novo azul de metileno (NMB) foram mais eficientes

contra cepas epidêmicas de MRSA em concentrações mais baixas do que a Vancomicina ($\geq 0,5\mu\text{M}$).

Soukos et al. (2000) investigaram se ondas fotomecânicas geradas por laser de rubi ($\lambda=694,3\text{nm}$) podem aumentar a permeabilidade de um biofilme de *Actinomyces viscosus*. A profundidade de penetração do corante azul de metileno ($50\mu\text{g/ml}$) foi medida por meio da microscopia de varredura a laser e revelou que apenas uma onda fotomecânica de 23ns induziu a 75% de aumento na profundidade de penetração do corante no biofilme, capacitando a sua destruição quase total.

Usacheva et al. (2001) compararam a atividade fotobactericida dos corantes azul de metileno e azul de orto toluidina em concentrações variando de 1 a $200\mu\text{g/ml}$ em diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas, sob luz e no escuro. Ambos os corantes foram eficientes em inativar todas as bactérias em questão sob a irradiação com laser. O corante azul de toluidina exibiu maior atividade bactericida do que azul de metileno contra a maioria das bactérias no escuro e sob a luz do laser. Concluíram que o efeito fotobiológico foi dependente do tipo de corante e da sua concentração, da fluência e intensidade do laser, tanto quanto da espécie bacteriana.

Mellish et al. (2002) investigaram, *in vitro*, a atividade fotodinâmica de uma série análoga de azul de metileno, com vários graus de metilação. Os resultados mostraram que todos os análogos de cadeia longa, tiveram uma significativa melhora de fototoxicidade comparado ao azul de metileno e que estes componentes agem fora do núcleo, em lisossomos ou mitocôndrias o que reduziria o potencial mutagênico associado com a localização nuclear do azul de metileno.

Zanin et al. (2002) avaliaram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica sobre os microrganismos mais diretamente relacionados à cárie em humanos. Para tanto, utilizaram o laser diodo de 660nm, com densidade de energia de 28,8J/cm² associado ao corante TBO na concentração de 100µg/ml. Observaram total inibição do crescimento, na associação do tratamento laser/corante, em suspensões bacterianas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*. Os resultados sugerem que a PDT é efetiva para a redução de bactérias cariogênicas, *in vitro*.

Com o objetivo de determinar o efeito da fotossensibilização letal em biofilme de *Streptococcus intermedius* no interior do canal radicular usando diferentes concentrações de azul de toluidina e um laser de He-Ne de 35mW, com diferentes tempos de aplicação, Seal et al. (2002) compararam o efeito bactericida da terapia fotodinâmica com a irrigação final com hipoclorito de sódio. O efeito do uso combinado do laser (21J por 600s) e TBO (100µg/ml) foram bactericidas, mas não conseguiu 100% de morte bacteriana, diferentemente da irrigação com hipoclorito a 3% por 10 minutos, que foi 100% efetivo.

Kömerik et al. (2003) pesquisaram, *in vivo*, se a *Porphyromonas gingivalis* poderia ser eliminada por terapia fotodinâmica com azul de toluidina como fotossensibilizador sem causar danos aos tecidos periodontais e também estabelecer se tal tratamento teria algum efeito na destruição óssea que acompanha as periodontites. Para isto, utilizaram um laser de 660nm, com diferentes doses (6-48J), variando o tempo de exposição (1-8 minutos) e diferentes concentrações do corante (0,01; 0,1; 1mg/ml). Os resultados mostraram que o uso de 1mg/ml de TBO em combinação com todas as doses eliminou todas as bactérias, não houve dano aos tecidos periapicais e resultou em diminuição da perda óssea.

Em uma revisão da literatura sobre a eficácia da terapia fotodinâmica na Odontologia produzida por Zanim et al. (2003) foi verificado que o efeito antimicrobiano relacionado ao desenvolvimento das lesões de cárie e doença periodontal vem sendo atingido em maiores ou menores proporções. Citaram como uma das limitações da técnica a ausência de parâmetros definidos para que a terapia fotodinâmica seja efetiva na eliminação de bactérias presentes em biofilme e nas lesões de cárie, onde as bactérias são mais resistentes do que aquelas crescidas em caldo de cultura. Sugerem ainda que estudos paralelos devam ser realizados avaliando a toxicidade dos fotossensibilizadores sobre os tecidos dentais e gengivais.

As interações do corante azul de metileno (MB) e azul de orto toluidina (TBO) com o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa bacteriana foram estudadas por Usacheva et al. em 2003. Foi utilizada a espectrofotometria para estimar o peso equivalente do LPS de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* e *Serratia marcescens* com os corantes usados. TBO interage com o LPS mais significativamente do que o MB *in vitro*, sendo, portanto, mais fotobactericida contra bactérias gram-negativas. O número de moléculas do corante ligadas à superfície do LPS é maior e mais profundo para o TBO.

Zampieri et al. (2003) pesquisaram a atividade bactericida da terapia fotodinâmica com laser de baixa intensidade de diodo de AsGaAl, sobre bactérias da microbiota oral humana como *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*. Verificaram também as melhores densidades energéticas para a potência de 30mW para se ter o efeito bactericida. A interação entre o laser de baixa intensidade (670nm), com 30mW de potência e o corante azul de orto toluidina (75µg/ml) em

densidades energéticas variando de 3,6 e 9J/cm² foram eficientes na promoção do efeito bactericida da PDT nas bactérias estudadas.

Garcez et al. (2003), após revisão da literatura, apresentaram as principais indicações da terapia fotodinâmica na Odontologia, as principais fontes de luz e os corantes mais utilizados. Enumeram como os corantes mais utilizados os derivados da hematoporfirina, fenotiazinas (azul de metileno e azul de orto toluidina), cianinas (indocianina verde), fitoterápicos (azuleno) e ftalocianinas cujas bandas de absorção variam de 550 a 700nm. Os autores concluíram a viabilidade do uso desta terapia como auxiliar no tratamento de infecções na cavidade oral e sugeriram o uso de corantes menos tóxicos, com banda de absorção ressonante ao comprimento de onda emitido pelos lasers de diodo entre 600nm e 1000nm, o que aumentaria a eficiência dessa terapia.

Usacheva et al. (2003) avaliaram a interação entre os corantes fenotiazínicos, azul de metileno e azul de orto toluidina e bactérias gram-positivas e gram-negativas, por meio de espectrofotometria. Foram avaliadas as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O trabalho confirmou que existe uma correlação entre a eficácia fotobactericida do corante e sua habilidade em formar dímero, confirmando o papel essencial dos dímeros do corante na morte bacteriana. O corante TBO teve maior efetividade foto-bacteriana e teve maior habilidade para formar dímeros do que MB.

Chan & Lai (2003), numa tentativa de esclarecer se a exposição de culturas bacterianas a luz laser na presença de azul de metileno como fotossensibilizante é dependente do comprimento de onda ou da dose, expuseram várias bactérias periodontopatogênicas a três aparelhos de laser dotados de

diferentes comprimentos de onda (He-Ne, 632.8nm; diodo, 665nm e diodo, 830nm) e diferentes potências (30mW; 100mW e 100mW respectivamente). Os resultados deste estudo mostraram que comprimento de onda e densidade de energia são fatores importantes e que a melhor resposta em terapia fotodinâmica foi conseguida com o tempo de 60 segundos, densidade de energia de $21,2\text{J}/\text{cm}^2$, com o laser diodo de 665nm de comprimento de onda, em presença do corante. Nestas condições, aproximadamente 95% do *A. actinomycetemcomitans* e *F. nucleatum* e 99-100% das bactérias pigmentadas de preto (*P.gingivalis* e *P. intermedia*) e *S. sanguis* foram eliminadas.

Brito Júnior (2004) avaliou, *in vitro*, o efeito do laser em baixa intensidade (AsGaAl) na fotossensibilização letal da bactéria *Enterococcus faecalis* geralmente associada ao insucesso endodôntico. Concluiu que a associação laser/azuleno foi significativamente superior ao laser/azul de toluidina na eliminação bacteriana.

Wilson (2004) estudou em situações clínicas o uso da terapia fotodinâmica em bactérias da cavidade oral, com capacidade de gerar lesões cáries, doenças periodontais e infecções endodônticas. Demonstrou como vantagem da terapia fotodinâmica, que as bactérias poderiam ser erradicadas num período de tempo muito curto (segundos ou minutos), improvável desenvolvimento de resistência bacteriana e poderia ser evitado dano ao tecido adjacente do hospedeiro e transtorno a microflora normal. Sugeriu que pode ser uma alternativa aos antibióticos e anti-sépticos usados para eliminar bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas e para a desinfecção dos canais radiculares.

Yamada Júnior et al. (2004) apresentaram dois casos clínicos onde empregaram a terapia fotodinâmica na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. Em ambos os casos, utilizaram como corante o azuleno e irradiação

com laser de AsGaAl, de 660nm, e potência de 30mW. Obtiveram alto índice de sucesso, como regressão total da supuração em periimplantite em dois dias e regressão total tanto da bolsa como da supuração depois da segunda sessão no caso de lesão endo-pério.

Soukos et al. (2006) investigaram os efeitos da terapia fotodinâmica em bactérias endodônticas tanto quanto em *Enterococcus faecalis* em biofilme em canais radiculares infectados em dentes humanos extraídos. O corante azul de metileno (25µg/ml) aplicado por cinco minutos, seguido de exposição à luz vermelha de 665nm com fluência de 30J/cm², eliminou todas as bactérias com exceção de *E. faecalis* (53% de morte). A mesma concentração do MB em combinação com luz com fluência de 222J/cm² foi capaz de eliminar 97% do *E. faecalis* em biofilme em canais radiculares usando uma fibra óptica. Os resultados sugerem que a PDT tem potencial para ser usada como coadjuvante antimicrobiana em terapia endodôntica.

Souza et al. (2006) avaliaram os efeitos da radiação com laser de baixa intensidade (685nm) associada com fotossensibilizador na viabilidade de diferentes espécies de *Candida*. O tratamento das infecções por *Candida* é difícil porque os efeitos das drogas antifúngicas são usualmente espécies dependentes. Concluíram que a fotoativação do corante azul de metileno pela luz vermelha (685nm) apresentou efeito fungicida para todas as espécies estudadas. Entretanto, quando apenas o fotossensibilizador foi usado sem a luz, nenhuma redução no número de unidades formadoras de colônias, para todas as espécies, foi observada, sugerindo que o azul de metileno na concentração de 0,1mg/ml, não apresenta efeito citotóxico em fungos. Em relação ao efeito do laser na ausência do fotossensibilizador, *Candida tropicalis* foi a única espécie a apresentar redução significativa.

Amorim (2007) comparou a ação fototóxica do laser em baixa intensidade (660nm, 100mW de potência, tempo de 3 minutos, intensidade de 0,2 W/cm², diâmetro do spot de 8 mm e dose de 450J/cm²) e do LED (630nm, 100mW de potência, tempo de 3 minutos, intensidade de 0,05 W/cm², dose de 36J/cm², diâmetro do spot de 15,6 mm) no fungo *Trichophyton rubrum*. O *T. rubrum* corado pelo TBO foi letalmente sensibilizado pela terapia fotodinâmica, nos parâmetros do experimento, reduzindo em 68,1% e 56% o número de colônias utilizando-se respectivamente LED e laser. O LED por apresentar um espalhamento maior que a luz laser, abrangeu um volume e uma área maior de suspensão do inóculo mostrando-se mais eficiente na sua ação fototóxica em PDT “in vitro”.

Sousa (2007) comparou a sensibilização letal das bactérias periodontopatogênicas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* com a utilização de lasers e LED no processo de redução bacteriana *in vitro*, tendo como fotossensibilizador o corante azul de toluidina (TBO) a 0,01%. Verificou que o corante TBO associado aos lasers e ao LED apresenta adequado potencial para a utilização em PDT na sensibilização letal destas bactérias nos parâmetros utilizados no experimento (t =3min).

Garcez et al. (2007) compararam a efetividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica com o tratamento endodôntico convencional e a combinação deste tratamento para eliminar o biofilme bacteriano presente em canais radiculares infectados e o subsequente crescimento 24 horas após o tratamento. Foram avaliados dois tipos de bactérias gram-negativas *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* através da bioluminescência. Os resultados demonstraram que a combinação PDT e tratamento endodôntico tradicional reduziram a bioluminescência em mais de 98% e o crescimento bacteriano, observado 24 horas após o tratamento,

foi muito menor para a combinação do que para ambos os tratamentos analisados individualmente.

Prates et al. (2007) investigaram o efeito bactericida do verde malaquita (0,01%) e um laser vermelho de baixa intensidade (660nm) em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e também a fotodegradação do corante após a PDT através de espectroscopia de absorção óptica. Os resultados mostraram que a combinação laser vermelho e o verde malaquita reduziram o *A. actinomycetemcomitans* em mais de 99% das unidades formadoras de colônias. O corante sozinho não apresentou nenhum efeito tóxico contra a bactéria estudada e o corante é fotodegradado após irradiação.

3 PROPOSIÇÃO

Constituiu proposta experimental comparar, in vitro, a absorção dos agentes fotossensibilizantes azul de metileno, azul de orto toluidina e verde malaquita, todos na concentração de 0,01%, após a aplicação do laser em baixa intensidade (40mw) com comprimento de onda de 660nm, fluência de 9J/cm², tendo em vista a terapia fotodinâmica intracanal.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionados sessenta dentes pré-molares humanos, inferiores, unirradiculares, do banco de dentes do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic (Anexo A). Os dentes da amostra tinham as seguintes características: hígidos, rizogênese completa, sem anomalias, tamanhos equivalentes e ao exame radiográfico apresentavam canal único e sem alterações significativas. Após a doação, o projeto de pesquisa foi submetido à avaliação e aprovado pelo COEP - Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - Parecer n° ETIC 0485/06 (Anexo B).

Os dentes foram lavados em água corrente e submetidos ao processo de limpeza e remoção de sujidades. Em seguida foram esterilizados em calor úmido, em autoclave (Tuttnauer® - modelo 2340 M - Israel) a 121°C por 15 minutos e logo após, colocados em água destilada à temperatura de 37°C para se manterem hidratados.

Para realizar a instrumentação, os dentes foram fixados em um manequim endodôntico (Sem Limites-BR). O acesso à câmara pulpar foi executado inicialmente em alta rotação com broca esférica diamantada através do esmalte até, aproximadamente, a metade da espessura da dentina, prosseguindo-se com boca cilíndrica tronco-cônica diamantada (KG Sorensen Ind. e Com., São Paulo).

Após o acesso à câmara pulpar, a remoção do teto foi realizada com broca esférica em aço carbide (KG Sorensen), e o preparo das paredes da cavidade pulpar com broca Endo Z (Maillefer/Dentsply - USA).

Os dentes foram instrumentados pela técnica *ProTaper*, acorde Ruddle (2005) modificada, a qual promove o alargamento do sistema de canais radiculares da coroa do dente em direção ao ápice. No lugar da lima de modelagem S1 e S2 (*ProTaper*, Maillefer/ Dentsply - USA), iniciou-se o preparo com brocas Gates Glidden (Maillefer/ Dentsply - USA), adaptadas em motor de baixa-rotação (Kavo - BR), nº 2 e recuando com a broca 3 e 4 nos terços médio e coronário, utilizando-se o hipoclorito de sódio a 5,25% (Farmácia Formas e Fórmulas - BR) como substância irrigadora.

O comprimento de trabalho foi determinado subtraindo-se dois milímetros do comprimento obtido pela introdução de uma lima tipo Kerr número 10 pelo canal radicular até sua observação pelo forame apical.

O preparo de terço apical do canal e o contínuo alargamento dos terços médio e coronal foram realizados com instrumentos rotatórios de níquel-titânio S2 (de modelagem), e F1 a F4 (de acabamento) da marca *ProTaper* (Maillefer/ Dentsply-USA) devido ao diâmetro dos canais. Entre uma lima e outra foi realizada a irrigação com hipoclorito de sódio a 5,25%, para a dissolução de matéria orgânica e remoção da lama dentinária, com o auxílio de seringa descartável de 10ml e agulha hipodérmica (30 x 5). Todos os canais foram instrumentados até que a lima manual k 35 atingisse o comprimento de trabalho, o qual foi estabelecido a dois milímetros aquém do ápice radiográfico, para se evitar que a fibra óptica (MM Optics - BR) ultrapassasse o forame.

Finalizada a instrumentação, o canal foi irrigado lentamente com uma solução de 10ml de EDTA a 17% (Farmácia Formas e Fórmulas - Brasil) para remoção da smear-layer, e logo após, com 10ml de água destilada como irrigação final. Os canais foram secados com cones de papel absorvente (Tanari - Brasil).

A parte experimental do trabalho foi realizada no LABBIO - Laboratório de Bioengenharia do Departamento de Engenharia Mecânica da UFMG.

Os espécimes foram divididos, aleatoriamente, em três grupos experimentais de vinte dentes: grupo A, azul de metileno; grupo B, azul de orto toluidina; grupo C, verde malaquita.

Os dentes foram fixados numa estativa para se conseguir uma altura padronizada que permitisse o contato do ápice radicular com o aparelho Power Meter (medidor de potência) (figura 4 e 5), para se obter a leitura da transmissividade. Como existe uma relação direta entre absorção e transmissividade, por meio desta medida obtivemos os valores de absorção do líquido colocado no interior dos dentes.



Figura 4 - Dente fixado a estativa e com o ápice em contato com o sensor do Power Meter



Figura 5 - Medidor de Potência- Power Meter® - Nova - Ophir Optronics
Jerusalém - Israel

Em seguida, os canais foram irrigados com água destilada, e irradiados com laser em baixa intensidade de AsGaAl (Twin Laser, MM Optics, São Paulo), comprimento de onda de 660nm (vermelho visível), potência média de 40mw, utilizando-se de sistema de entrega por fibra óptica de diâmetro de 300 μ m acoplado à ponta da peça de mão do equipamento, até que alcançasse o comprimento de trabalho (figura 6).



Figura 6 - Laser em baixa intensidade (Twin Laser - MM Optics- SP)

A primeira leitura da transmissividade realizada pelo aparelho Power Meter foi feita com todos os dentes irrigados com água destilada e foi registrada no visor do equipamento em mW (figura 7).

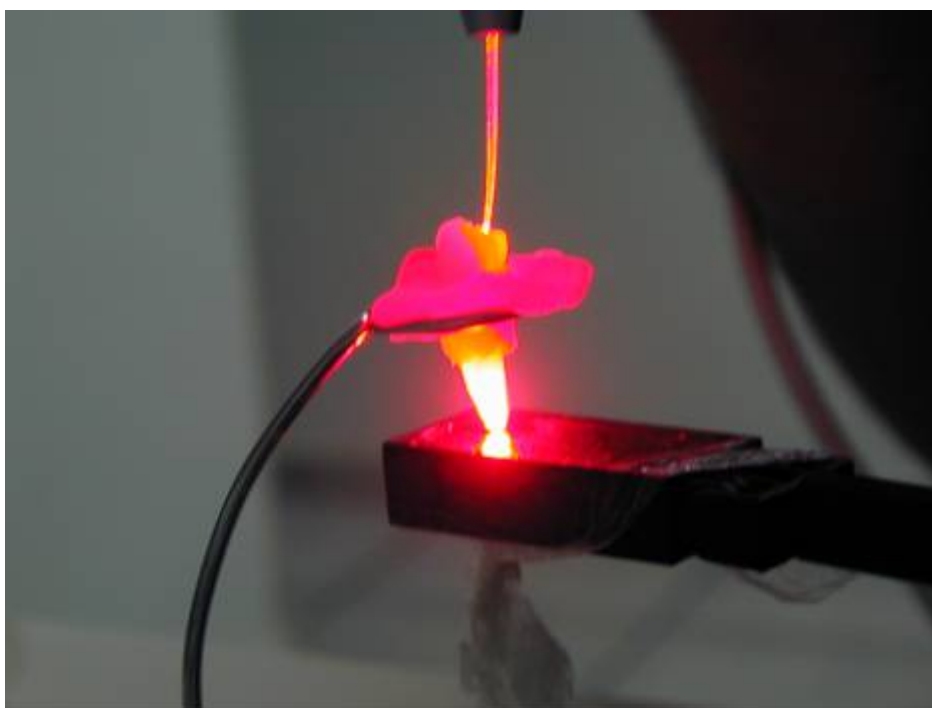


Figura 7 - Dente irrigado com água e irradiado através da fibra óptica

Em seguida, fez-se a aspiração da água e secagem com cones de papel (figura 8).

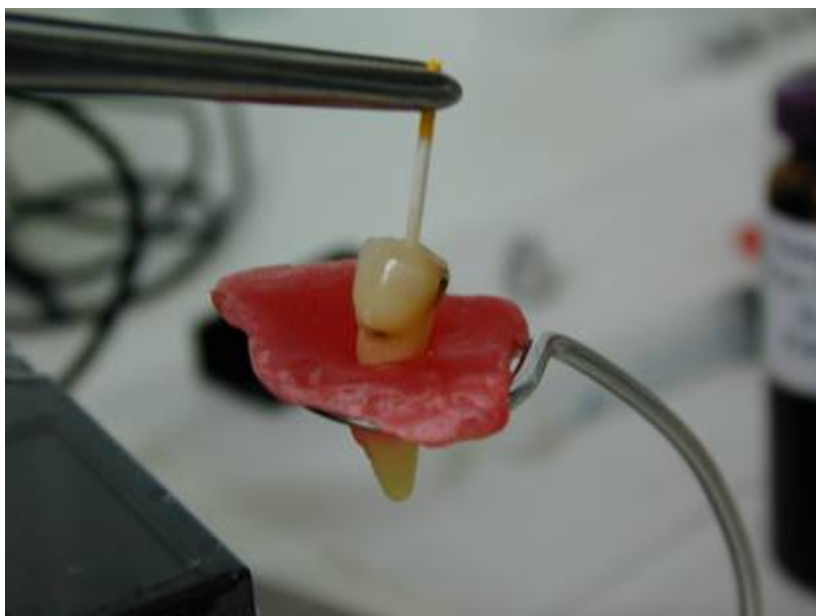


Figura 8 - Dente sendo secado com ponta de papel absorvente

O interior dos canais devidamente instrumentados e secos foi preenchido com uma solução de azul de metileno (grupo A) (figura 9), azul de orto toluidina (grupo B) e verde malaquita (grupo C) sendo todos os corantes usados na concentração de 0,01% (Hypofarma - BR). A solução foi irradiada com laser de baixa intensidade através de uma fibra óptica de 300 μ m. Em seguida, foi feita a medição pelo aparelho Power Meter da quantidade de luz transmitida em mW (figura 10 e 11). Foi obtida assim uma medida da transmissividade de cada um dos corantes quando irradiados pelo laser.



Figura 9 - Dente sendo irrigado com o corante azul de metileno



Figura 10 - Dente irrigado com um dos corantes sendo irradiado e a leitura da transmissividade sendo feita pelo Power Meter



Figura 11- Leitura no visor do medidor de potência

Quando a luz incide num material, os principais processos que ocorrem são: reflexão, absorção, espalhamento e transmissão. Essas interações com a matéria representam perdas na intensidade da luz incidente. A absorbância é uma propriedade que determina a fração da irradiação absorvida por uma superfície e que esta superfície pode exibir absorção seletiva em relação ao comprimento de onda e à direção da radiação incidente. Somente os fótons não-refletidos e não-absorvidos ou os fótons espalhados na direção de propagação contribuem para a intensidade da luz detectada depois do material, ou seja, a luz transmitida. A razão entre a intensidade da luz transmitida e a incidente é chamada transmitância e seu valor depende do tipo de material e do comprimento de onda incidente (Incropera, Dewitt, 1996).

Optamos por medir a transmissividade devido à arquitetura do experimento e por uma questão técnica de medida, pois fisicamente é mais fácil

medir o que foi transmitido. Para se obter os valores da absorção, comparou-se a transmissividade (quantidade de luz que ultrapassou a solução no interior do canal e incidiu sobre o sensor do *Power Meter*) tendo a água como baseline e as médias obtidas usando os corantes TBO, MG e MB, todos a 0,01%, quando irradiados com o equipamento laser 660nm e 40mW de potência. Como as amostras eram pareadas por tamanho, a ferramenta estatística aplicada foi o teste de *Friedman*, que é um teste não paramétrico que compara n grupos pareados. Cada teste foi realizado ao nível de 5% de significância, ou seja, os grupos foram considerados diferentes se $p \leq 0,05$.

Foi utilizado também o teste de comparações múltiplas adequado, ou teste das 'Diferenças Mínimas Significativas' (DMS), compatível com o teste de Friedman. Tal teste consiste em comparar os grupos 2 a 2, identificando o causador da significância obtida com o teste de Friedman.

Para análise estatística foi usado o software MINITAB 14.

5 RESULTADOS

O gráfico 1 apresenta os valores médios da leitura da transmissividade da água e dos corante em cada grupo.

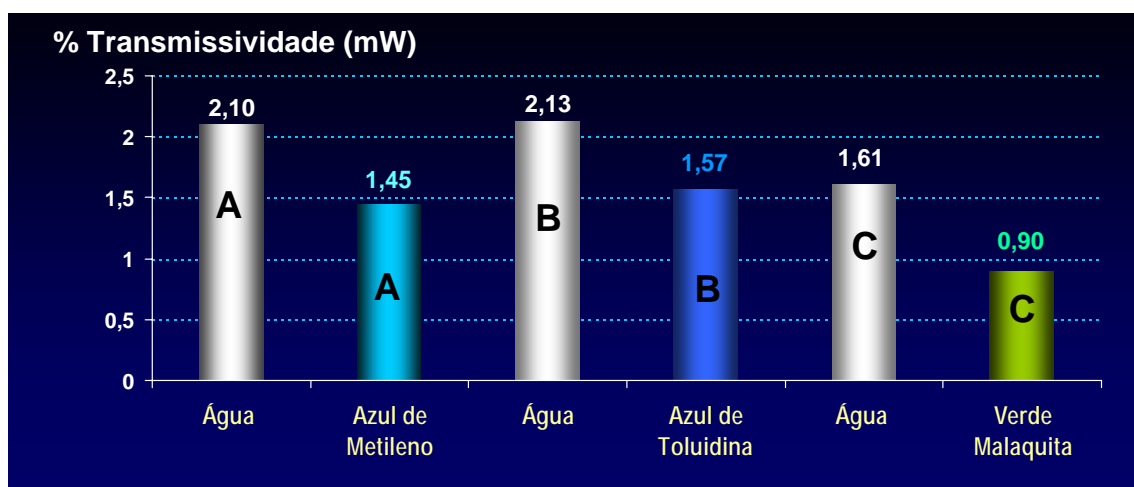


Gráfico 1 - Média da transmissividade por corante e pela água utilizados em cada grupo

Podemos ver que os grupos A e B apresentaram transmissividades similares, mas superiores à obtida no grupo C. O gráfico 1 sugere que a transmissividade pela água se mostrou superior àquelas apresentadas pelos corantes, evidenciando uma absorbância por parte dos corantes.

O teste de Friedman para a comparação entre os grupos A, B e C em termos da transmissividade em água, apresentou um valor $p=0,124$, mostrando que os três grupos não apresentam diferenças estatísticas. O grupo dos corantes, ao contrário, ao teste de Friedman, ao nível de 5%, mostrou diferença significativa entre os grupos ($p=0,003$). Para identificar o causador da significância encontrada com o

teste de Friedman, se faz necessário o uso do teste das Diferenças Mínimas Significativas (DMS).

O DMS indicou que, ao nível de 5%, o corante azul de orto toluidina gerou valores estatisticamente maiores que o corante verde malaquita em termos de transmissividade, porém, não foi identificada diferença em relação ao corante azul de metileno.

Na tabela 2 estão os resultados médios das medidas da transmissividade (em mW) apresentadas por cada grupo. Esta tabela contém também os valores-p associados aos testes que comparam, dentro de cada grupo, a transmissividade por água e por corante.

Tabela 2 - Valores de potência luminosa transmitida através das amostras

Grupo		Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor-p*
A	Água	2,10	0,86	2,00	0,80	4,50	0,000
	Azul de Metileno	1,45	0,66	1,35	0,50	3,10	
	Diferença (água - corante)	0,66	0,45	0,50	0,10	1,50	
B	Água	2,13	0,71	2,05	0,90	3,80	0,000
	Azul de Toluidina	1,57	0,56	1,55	0,70	3,00	
	Diferença (água - corante)	0,57	0,41	0,50	0,10	2,10	
C	Água	1,61	0,59	1,40	0,90	2,70	0,000
	Verde Malaquita	0,90	0,39	0,80	0,30	1,80	
	Diferença (água - corante)	0,72	0,44	0,65	0,00	1,60	

*Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

Ao nível de 5% pode-se dizer que para os três grupos a solução água apresentou valores estatisticamente maiores que os corantes em termos de transmissividade.

A comparação de transmissividade entre os corantes deve ser feita retirando-se o efeito do tipo de material dentário apresentado em cada grupo, e uma

forma de fazer isso é comparar as diferenças em relação aos valores apresentados com a água para cada grupo.

No gráfico 2 estão os resultados médios das medidas de transmissividade apresentadas por cada diferença (água-corante) em cada grupo.

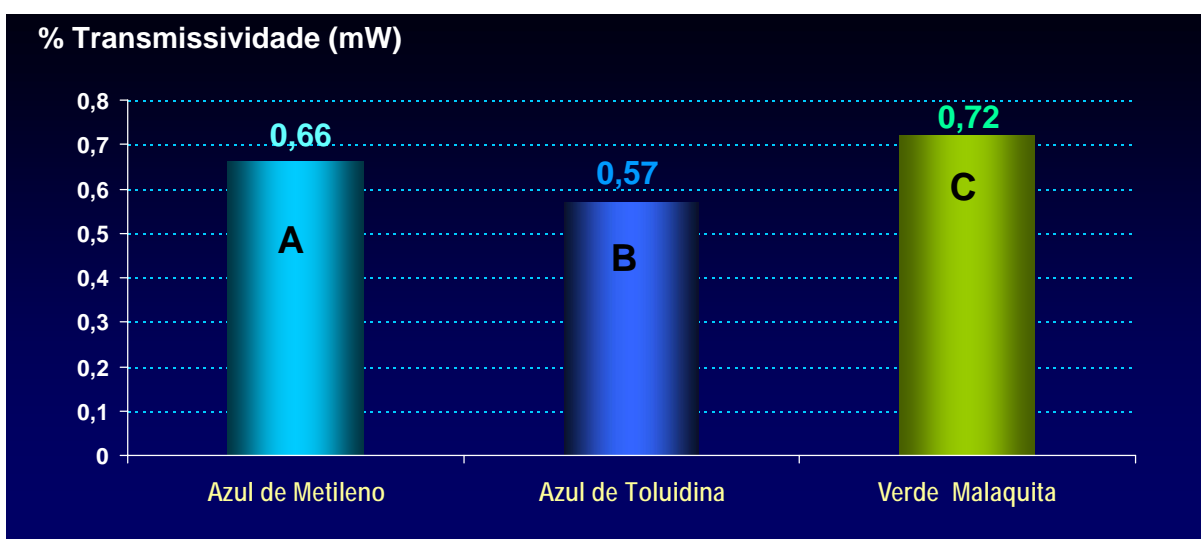


Gráfico 2 - Média das diferenças entre as transmissividades apresentadas pela água em relação aos corantes nos grupos A, B e C.

Como revelado pelo gráfico 2 a média da diferença da transmissividade água - corante foi maior no grupo C. Isso sugere que a absorção deste grupo, em média, se apresentou ligeiramente maior que a dos outros dois grupos.

Para comparar as três “diferenças” (água-corante), usou-se o teste de *Friedman*, que é o teste que compara n grupos pareados. Ao se aplicar este teste obteve-se um valor $p=0,529$. Verificou-se que, ao nível de 5%, não existe diferença estatística entre os grupos.

Outra forma de explorar a comparação da absorção relativa de cada corante em relação à água é avaliar a redução percentual média da transmissividade de cada corante em relação à água (gráfico 3).

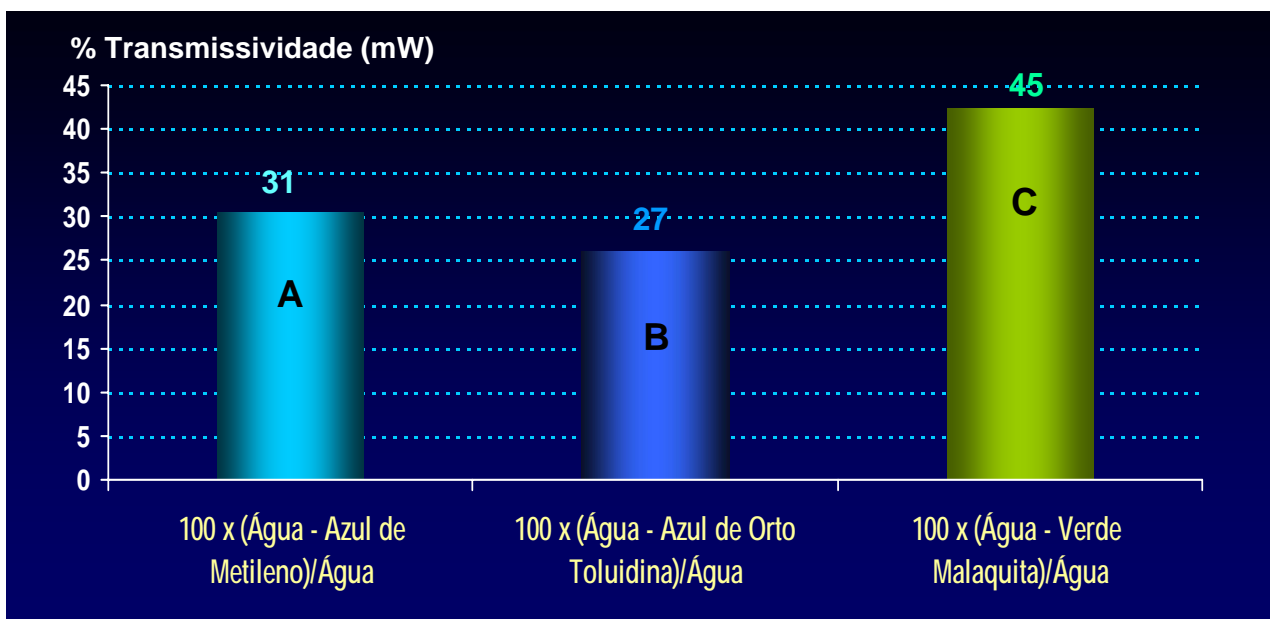


Gráfico 3 - Redução percentual média da transmissividade dos corantes em relação à água

O gráfico 3 mostra que a transmissividade do grupo C foi em média 45% inferior a da água (100%), uma taxa superior a obtida pelos grupo A e B. Pode-se interpretar desta maneira, que o grupo C apresentou uma taxa de absorção que correspondeu, em média, a 45% do que se transmitiu pela água. O grupo A vem em segundo lugar, com uma taxa de absorção que correspondeu, em média, a 31% do valor transmitido pela água.

6 DISCUSSÃO

A principal causa de falha do tratamento endodôntico é a presença de microrganismos persistentes e o maior impedimento ao sucesso é a complexa anatomia do espaço do sistema de canais radiculares segundo Schirrmeister et al., 2007 e Chávez de Paz, 2007. Como o canal pode ser facilmente acessado pelo fotossensibilizador e pela luz através de uma fibra óptica, a terapia fotodinâmica pode ser uma alternativa ao hipoclorito de sódio e outros agentes químicos para a desinfecção ou esterilização do canal como demonstrado por Wainwright, 1998; Wilson, 2004 e Garcez et al., 2007.

A relação entre comprimento de onda emitido pelo laser e o espectro de absorção do corante é essencial na utilização da terapia fotodinâmica, pois a ação citotóxica só ocorre quando a banda de absorção do fotossensibilizador é ressonante com a radiação emitida (Bonnett, 1995; Oleinick, Evans, 1998; Wainwright, 1998; Acroyd et al., 2001; Chan, Lai, 2003).

Os resultados obtidos neste estudo, quando se comparou o corante azul de metileno e azul de orto toluidina, freqüentemente citados na literatura (Wilson, Dobson, 1993; Soukos et al., 1996; Usacheva et al., 2001; Chan, Lai, 2003; Kömerik et al., 2003; Wilson, 2004; Sousa, 2007) com o corante verde malaquita, um evidenciador de placa bacteriana para orientação de higiene oral em pacientes portadores da doença periodontal, mostraram que o corante verde malaquita apresentou valores de absorção estatisticamente maiores que os corantes azul de orto toluidina e azul de metileno, após exposição ao laser vermelho.

Estes resultados, quando analisadas as bandas de absorção dos corantes, confirmam que a banda de absorção do verde malaquita (625nm) é ressonante com o comprimento de onda emitido pelo laser de diodo de AsGaAl (660nm) utilizado neste estudo e possui uma maior absorção quando comparado aos outros corantes na mesma concentração (0,01%), o que contraria os achados de Sousa (2007), que obteve melhores resultados com o corante azul de orto toluidina. Podendo ser o motivo desta diferença o fato de Sousa (2007) ter aplicado externamente a ponta do laser com diâmetro de saída de $0,04\text{cm}^2$ em contato direto com a cubeta de acrílico que continha os corantes, enquanto no nosso trabalho, os corantes foram colocados no interior dos canais radiculares e irradiados por uma fibra óptica de $300\mu\text{m}$ e a leitura foi realizada através das paredes radiculares que tem diferente espessura e coeficiente óptico do acrílico. Além da espessura do corante na cubeta ser diferente da espessura do corante no interior do canal radicular, ao utilizarmos a fibra óptica neste estudo, reduzimos a secção transversal da área de saída da luz, aumentando assim a potência.

A utilização do laser de baixa intensidade na Endodontia surge como alternativa de tratamento devido a sua capacidade de redução microbiana, quando associado a um fotossensibilizador, atuando principalmente frente a cepas microbianas resistentes à terapia convencional com resultados animadores como mostrado nos trabalhos de Wilson & Pratten, 1995; Gutknecht et al., 1996, Soukos et al., 2000, 2006; Wilson, 2004 e Garcez, 2007.

A aplicação tópica de agentes antimicrobianos é amplamente utilizada na prevenção e/ou tratamento de cáries, doença periodontal e desinfecção dos canais radiculares. É difícil manter a concentração terapêutica do agente na cavidade oral, devido à saliva e ao fluido gengival. Os microrganismos podem desenvolver

resistência aos agentes e a microbiota pode ser alterada, resultando em infecções oportunistas (Wilson, Pratten, 1995; Garcez et al., 2003; Wilson, 2004).

Alguns autores como Wilson, 2004; Soukos, 2006; e Garcez et al., 2007 têm mostrado que grande número de bactérias das infecções da cavidade oral é susceptível a fotossensibilização letal pela terapia fotodinâmica em trabalhos *in vitro* e *in vivo*. Enumeram dentre as vantagens da PDT sobre outros agentes antimicrobianos: a morte dos microrganismos é muito rápida, segundos ou minutos, dependendo da densidade de energia e da potência de saída; o desenvolvimento de resistência pelos microrganismos é muito pouco provável porque o fotossensibilizador age rápido, é usado em baixa concentração e não precisa ser mantido por horas ou dias, além disso, a liberação de produtos químicos, como o oxigênio singlete e radicais livres, agem em alvos celulares variáveis e são os responsáveis pela morte bacteriana; e por último, dano ao tecido adjacente e alteração da microbiota normal pode ser evitado. Diante do exposto, o uso da PDT em Odontologia é bastante promissor.

Como demonstrado por Malik (1990), Wilson et al. (1993), Wilson (2004) a maioria das bactérias orais não absorve a luz visível de alguns tipos de lasers que operam em baixa potência. Portanto, utiliza-se de um agente de absorção óptica não tóxico que se fixe à parede bacteriana, atraindo para si a luz laser no momento da irradiação, tornando-as sensíveis aos efeitos do laser.

De acordo com Bonnett (1995) a absorção e espalhamento de luz pelo tecido aumentam à medida que o comprimento de onda diminui, portanto, a substância fotossensibilizadora mais eficiente quando excitada é aquela que tem forte banda de absorção no fim do vermelho do espectro visível. Os três corantes selecionados neste trabalho preenchem este requisito.

O sucesso da terapia fotodinâmica inclui a otimização de um grande número de parâmetros, tais como, tipo e dose do fotossensibilizador, a densidade de energia do laser, o comprimento de onda e a dinâmica das fotorreações precisam ser melhores esclarecidas (Usacheva, 2001; Chan, Lai, 2003; Zanim, 2003).

A seleção dos corantes recaiu sobre o azul de metileno, azul de orto toluidina e verde malaquita em virtude da larga aplicação na área da saúde, seu baixo custo, facilidades de aquisição, alto índice de absorção da luz, são efetivos em produzir efeito bactericida e por terem comprimento de onda ressonante com o do aparelho laser utilizado (Okamoto et al., 1992; Garcez, 2003; Prates et al., 2007; Sousa, 2007).

O corante azul de metileno e azul de orto toluidina faz parte dos corantes fenotiazínicos, são compostos básicos e heterocíclicos, com comprimento de onda máximo de 620 a 660nm. São potentes fotossensibilizadores para vários microrganismos e preenchem a maioria dos pré-requisitos de um fotossensibilizador ideal, tais como, não ser citotóxico no seu estado fundamental, ter grande eficiência de excitação e longa vida relativa do estado tripleto, ser fotoestável e fotoativo, ou seja, ter a capacidade de induzir fotorreações. São corantes bastante utilizados na Odontologia e são também, os mais utilizados pelos autores de acordo com a literatura pesquisada (Okamoto et al., 1992; Wainwright, 1998; Usacheva et al., 2003; Wilson, 2004).

Verde malaquita é um corante catiônico, pertence à família dos triarilmetano, que também inclui violeta cristal e azul vitória, apresenta forte absorção no fim do espectro vermelho visível, e apresenta um trânsito fácil através da membrana celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua eficiência

na inativação de *A. actinomycetemcomitans* e de *Staphylococcus aureus* foi demonstrada por Prates (2005) e Golding et al. (1998), respectivamente.

Com relação à concentração da substância sensibilizante muitas são as variações encontradas na literatura, portanto, para o presente trabalho optou-se pela maior concentração relatada sem que esta apresente ação citotóxica e a dose necessária para a morte bacteriana é menor que a dose necessária para provocar danos às células do hospedeiro (Okamoto et al., 1992; Soukos et al., 1996; Wainwright, 1998; George, Kishen, 2007; Prates, 2007). Com base no exposto, foi escolhida a concentração de 0,01% para todos os três corantes.

Quando se refere à potência, tipo de emissor e densidade de energia utilizada na terapia fotodinâmica, a grande maioria dos trabalhos utiliza-se de lasers vermelhos de He-Ne (632,8nm) (Dobson, Wilson, 1992; Soukos et al., 1996; Seal et al., 2002; Chan, Lai, 2003). Sousa (2007) observou que a potência dos equipamentos (mW) tem uma importância muito grande na absorção pelos corantes e que valores baixos de potência resultariam em um tempo maior de exposição da luz, o que poderia contra-indicar a técnica ao uso clínico.

Diante do exposto, optou-se pela utilização de um laser de diodo de AsGaAl com comprimentos de onda e potência semelhantes aos do laser de He-Ne mas têm menor custo, disponível ao mercado odontológico, maior eficiência e versatilidade, ou seja, atingem doses de energia superiores com menor tempo de irradiação e por suas características de comprimento de onda serem compatíveis às dos corantes utilizados como demonstrado por vários autores (Nicolau et al., 2003; Pugliese et al., 2003; Zampieri et al., 2003; Amorim, 2007; Garcez et al., 2007).

A despeito da grande dificuldade de eliminação do *E. faecalis*, bactéria comumente associada ao insucesso endodôntico, estudos “*in vitro*” têm relatado

sucesso da terapia fotodinâmica em combatê-lo. Efeito letal de 40% a 100% dos casos tem sido observado (Gutknecht et al., 1996; Garcez, 2002; George, Kishen, 2007).

Brito Júnior (2004) não conseguiu efeito bactericida expressivo na presença do corante azul de toluidina independente do comprimento de onda ou modo de emissão da luz (contínua ou pulsada), demonstrando que os parâmetros comumente utilizados na clínica não foram eficazes na eliminação de uma infecção endodôntica por *E. faecalis*. Uso de parâmetros diferentes de irradiação torna difícil a tarefa de comparação dos efeitos relatados nos estudos anteriores com os resultados obtidos por Brito Júnior. Entretanto, considerando que o efeito letal de 100% foi conquistado com uma densidade de energia de $1720\text{J}/\text{cm}^2$ por Garcez (2002) e que no estudo de Brito Júnior a densidade energética ficou em torno de $100\text{J}/\text{cm}^2$, teoricamente, para o protocolo de irradiação utilizado (DP = 0,03 ou 0,05W, área de *spot* = 2mm^2), seria necessário mais de duas horas para obtenção de eventual efeito bactericida o que tornaria esta terapia inviável clinicamente.

Pela análise da literatura sobre a terapia fotodinâmica, observamos diferentes resultados devido a variações nos protocolos das pesquisas, quanto ao tipo de laser, a densidade de energia, a densidade de potência, o tipo e concentração da substância fotossensibilizadora e o tempo de exposição ao laser.

Nestes termos, a proposta metodológica da avaliação da absorbância dos corantes nos espécimes submetidos à irradiação a laser de baixa intensidade foi apropriada, ou seja, os três corantes utilizados têm absorção em relação à água e possuem características adequadas para aplicação como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica em canais radiculares, sendo o verde malaquita, corante barato

e acessível aos consultórios odontológicos, o que apresentou os melhores resultados, *in vitro*.

Por este motivo é importante dar continuidade a este estudo em sistemas mais complexos e em modelo animal, para melhor entendimento de seus mecanismos físicos, para que possa ser aprimorado um protocolo de aplicação clínica com vista ao controle da redução bacteriana intracanal de modo a tornar este método realmente efetivo.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o corante verde malaquita apresentou valores de absorção estatisticamente maiores que o corante azul de metileno e azul de orto toluidina, porém, não foi identificada diferença de absorção entre os dois últimos corantes.

REFERÊNCIAS²

- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2001;74(5):656-69.
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Gidugli- Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):179-84.
- Almeida-Lopes L. Laserterapia na odontologia. *Biodonto*. 2004 mar-abril;1(1):7-80.
- Amorim JCF. Ação fototóxica do laser em baixa intensidade e diodo de emissão de luz(LED) no fungo *Trichophyton rubrum*: estudo “*in vitro*” [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
- Barberini AF, Aun CE, Camargo SCC, Kfoury LS, Simionato MRL. Effects of intracanal irradiation with Nd:YAG laser. *Rev Odontol UNICID*. 2001;13(3):183-8.
- Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S. Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Jan;5(1):31-8.
- Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J*. 1989 July;261(1):277-80.
- Briseno BM, Wirth R, Hamm G, Standhartinger W. Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solutions on bacteria in the root canal. *Endod Dent Traumatol*. 1992 Feb;8(1):6-11.
- Brito Junior M. Efeito “*in vitro*” do laser em baixa intensidade na foto - sensibilização letal de bactéria associada ao insucesso endodôntico [dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.
- Brugnera Júnior A, Pinheiro ALB. Lasers na odontologia moderna. São Paulo: Pancast; 1998.
- Bystrom A, Happonen RP, Sjogren U, Sundqvist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol*. 1987 Apr;3(2):58-63.
- Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2003;18(1):51-5.
- Chávez de Paz L, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003;36(7):500-8.

² De acordo com o Manual de Normatização para Dissertações e Teses do Centro de Pós-Graduação CPO São Leopoldo Mandic, baseado no modelo Vancouver de 2007, e abreviaturas dos títulos de periódicos em conformidade com o Index Medicus.

Chávez de Paz L. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod.* 2007 June;33(6):652-62.

Cheung GS, HO MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2001;16(6):332-337.

Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular and culture- based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2007 June;33(6):690-2.

Cordeiro L. A endodontia contemporânea. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2004;58(4):247-56.

Costa Junior ED, Souza-Filho FJ, Barbosa SV. Tissue reactions to a component of root canal system bacteria: lipoteichoic acid. *Braz Dental J.* 2003;14(2):95-8.

Davis JM, Maki J, Bahcall K. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2007 May;33(5):567-9.

De Deus QD. *Endodontia.* Rio de Janeiro: Medsi; 1992.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002 Oct;28(10):689-93.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* 1992 Nov;37(11):883-7.

Dortbudak O, Hass R, Bernhart T, Mailath-Pokorny G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2001 Apr;12(2):104-8.

Dougherty TM. Yearly review photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1993;58(6):895-900.

Estrela C. *Ciência Endodôntica.* São Paulo: Artes Médicas; 2004.

Fava LRG, Conde MC, Siqueira Júnior JF. Emprego endodôntico da clorexidina: perspectivas atuais e futuras. *JBO J Bras Clin Odontol Int.* 2001;5(30):478-85.

Fava LRG. Pastas de hidróxido de cálcio. Considerações sobre seu emprego clínico em Endodontia. *Rev Paul Endod.* 1991 set-out;13(5):36-43.

Fegan SE, Steiman HR. Comparative evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation: an in vitro study. *J Endod.* 1995 Aug;21(8):415-7.

Felber TD, Smith EB, Knox JM. Photodynamic inactivation of herpes simplex. *J Am Med Assoc.* 1973 Jan;223(3):289-92.

Fingar VH, Wieman TJ, Doak KW. Role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy - induced tumor destruction. *Cancer Res.* 1990 May;50(9):599-603.

Fisher AMR, Murphree AL, Gomer CJ. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 1995;17(1):2-31.

Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nuñez SC, Jorge AOC, 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.

Garcez AS, Souza FR, Nuñez SC, Kather JM, Ribeiro MS. Terapia fotodinâmica em odontologia - Laser de baixa potência para redução microbiana. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2003;57(3):223-6.

Garcez AS. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2002.

George S, Kishen A. Advanced noninvasive light- activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2007 May;33(5):599-602.

Golding PS, King TA, Maddocks L, Drucker DB, Blinkhorn AS. Photosensitization of *Staphylococcus aureus* with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. *J Photochem Photobiol B*. 1998 Dec;47(2-3):202-10.

Gomer CJ, Ferrario A. Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl clorin e 6 in a mouse tumor model. *Cancer Res*. 1990;50(13):3985-90.

Gonçalves L. Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo; 2005.

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;14(2):77-80.

Gutknecht N, Gogswaardt DV, 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.

Gutmann JL, Lovdahl PE. Problemas na avaliação do sucesso e fracasso. Garantia de qualidade e sua integração no plano de tratamento endodôntico. In: Gutmann JL. Solução de problemas em endodontia- prevenção, identificação e tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. cap. 1. p. 1-19.

Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME et al. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2002 June;49(6):941-51.

Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 May;91(5):579-86.

Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*. 1992;55(1):145-57.

Hizatugu R, Kado E, Miyasaki E, Okino K, Meneghini GP, Matayoshi A. Endodontia em sessão única- mito ou realidade? São Paulo: Atheneu; 2002.

Incropera FP, Dewitt DP. Fundamentos de transferência de calor e de massa. Rio de Janeiro: LTC; 1996. p.494-613.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ- free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20(3):340-349.

Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. J Endodon. 1999 May;25(5):364-8.

Kömerik N, Nakanishi H, Mac Robert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. *In vivo* killing of Porphyromonas gingivalis by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(3):932-40.

König K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eicks S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. Cell Mol Biol. 2000;46(7):1297-303.

Kratchman S. Obturation of the root canal system. Dent Clin North Am. 2004 Jan;48(1):203-15.

Kutsch VK. Lasers in dentistry: comparing wavelengths. J Am Dent Assoc. 1993 Feb;124(2):49-54.

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod. 2002 Dec;28(12):815-8.

Lizarelli RFZ. Protocolos clínicos odontológicos. Uso do laser de baixa intensidade. São Carlos, São Paulo: Bons Negócios; 2005. 89 p.

Lopes HP, Siqueira Júnior JF. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: Medsi; 2004. cap. 10: Microbiologia endodôntica. p. 223-79.

Love RM. Enterococcus faecalis - a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001 July;34(5):399-405.

Malik Z, Ladan H, Nitzan Y. Photodynamic inactivation of gram-negative bacteria: problems and possible solutions. J Photochem Photobiol B. 1992;14(3):262-266.

Marques JLL, Eduardo CP. O emprego do laser na endodontia. In: Berger CR. Endodontia. São Paulo: Pancast; 1998. p. 400-14.

Matuda FS, Vasquez VZC, Valera MC, Pagani C, Araujo MAM. Reparação periapical e pulpar com o uso de laser: uma revisão da literatura. JBE J Bras Endod. 2004 abr-jun;5(17):166-170.

Mellish KJ, Cox RD, Vernon DI, Griffiths J, Brown SB. *In vitro* photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. Photochem Photobiol. 2002;75(4):392-7.

Mello JB, Mello GPS. Laser em Odontologia. São Paulo: Santos; 2001.

Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of Streptococcus mutans biofilms by light fractionation. J Antimicrob Chemother. 2006;58:190-2.

Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MTT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power Ga Al As laser (660nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Laser Med Sci.* 2003;18(2):89-94.

Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endodon.* 2002 Oct;28(10):679-683.

Norskov-Lauritsen N, Kilian M. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006 Sept;56(Pt 9):2135-46.

Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg Med.* 1992;12:450-8.

Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiation Res.* 1998;150:S146-S56.

Pandey RK, Bellnier DA, Smith KM, Dougherty TJ. Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1991;53(1):65-72.

Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol.* 2004;75(10):1343-9.

Prates RA, Yamada AM Jr, Suzuki LC, Eiko Hashimoto MC, Cai S, Gouw-Soares S et al. Bactericidal effect of malachite green and red laser on *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Jan 3;86(1):70-6.

Prates RA. Verde malaquita como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica: ação bactericida sobre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* - um estudo in-vitro [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2005.

Pugliese IS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. A influência da terapia a laser de baixa densidade de energia na biomodulação das fibras colágenas e elásticas. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):307-13.

Ruddle CJ. The ProTaper technique. Shaping the future of endodontics. In: Castellucci A, Il Tridente. *Endodontics.* Florence: [s.n.]; 2005. cap. 19, p. 548-63.

Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am.* 1967 Nov;11:723-44.

Schirrmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *J Endod.* 2007 May;33(5):536-40.

Seal GJ, Ng Y-L, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J.* 2002;35(3):268-74.

Siqueira Júnior JF, Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/ camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endodon.* 2007 June;33(6):667-72.

Siqueira Júnior JF, Paiva SSM, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine- based antimicrobial protocol. J Endodon. 2007 May;33(5):541-7.

Siqueira Júnior JF, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. J Endod. 2002 Nov;28(11):770-3.

Soukos NS, Chen PS-Y, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. J Endodon. 2006;32(10):979-84.

Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. Lasers Surg Med. 2003;33(3):161-8.

Soukos NS, Socransky SS, Mulholland SE, Lee S, Doukas AG. Photomechanical drug delivery into bacterial biofilms. Pharm Res. 2000;17(4):405-9.

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.

Sousa GR. Análise comparativa da emissão de luz por LED e Lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas. Estudo "in vitro" [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.

Sousa GR. Avaliação radiográfica da reparação óssea em lesões perirradiculares de elementos dentários submetidos à radiação com laser de baixa intensidade de $\lambda = 904$ nm (estudo in animala nobile) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2001.

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. 2006 Apr 3;83(1):34-8.

Stabholz A, Sahar-Helft S, Moshonov J. Lasers in endodontics. Dent Clin North Am. 2004 Oct;48(4):809-32.

Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endodontic Topics 2004;9: 27-36.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. Lasers Surg Med. 2001;29(2):165-73.

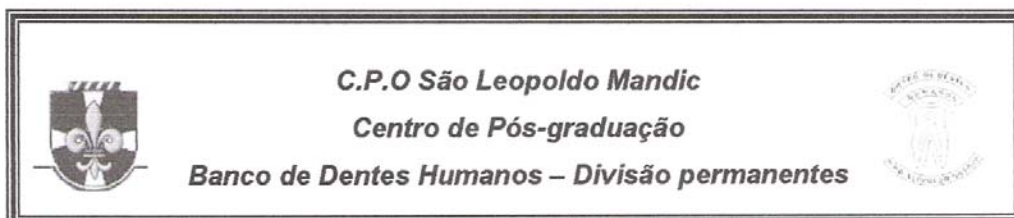
Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. Lasers Surg Med. 2003;33(5):311-9.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. J Photochem Photobiol B. 2003;71(1-3):87-98.

Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DRA, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin- resistant strains of staphylococcus aureus. FEMS Microbiol Lett. 1998;160(2):177-81.

- Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DRA, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *Immunol Med Microbiol.* 1997;19:75-80.
- Wainwright M, Phoenix DA, Rice L, Burrow SM, Waring J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *J Photochem Photobiol B.* 1997;40(3):233-9.
- Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998 July;42(1):13-28.
- Wilson M, Dobson J. Lethal photosensitization of oral anaerobic bacteria. *Clin Inf Dis.* 1993;16(suppl 4):414-5.
- Wilson M. Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:412-8.
- Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(4):680-4.
- Yamada Júnior AM, Hayek RRA, Ribeiro MS. O emprego da terapia fotodinâmica(PDT) na redução bacteriana em periodontia e implantodontia. *RGO.* 2004;52(3):207-10.
- Zampiere MJP, Cogo JC, Genovese WJ, Barbosa AD. Ação bactericida da terapia fotodinâmica(As Al Ga) sobre bactérias *St mitis*, *St sanguis*. "In vitro". *Rev Bras Implant.* 2003;9(2):16-7.
- Zanin ICJ, Brugnera Júnior A, Gonçalves RB. Aplicação da terapia fotodinâmica na descontaminação bacteriana. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2002;56(supl):7-11.
- Zanin ICJ, Brugnera Júnior A, Zanin F, Gonçalves RB. Terapia fotodinâmica na odontologia (TFD). *RGO.* 2003;51(3):179-82.
- Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):64-9.
- Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(1):64-9.

ANEXO A - Carta de doação do banco de dentes da SLMandic



DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA


Para fins de avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) dessa instituição, o Banco de Dentes Humanos da C.P.O. São Leopoldo Mandic (divisão de dentes permanentes) compromete-se a auxiliar pesquisadores na realização de seus projetos.

Sendo assim, após aprovação do CEP, nossa contribuição consistirá no oferecimento de 60 pré-molares inferiores unirradiculares, para execução do trabalho de pesquisa intitulado “COMPARAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO ÓPTICA DO LASER VERMELHO ATRAVÉS DAS PAREDES DENTINÁRIAS DO CANAL RADICULAR PREENCHIDO COM OS CORANTES AZUL DE METILENO, AZUL DE ORTO TOLUIDINA E VERDE DE MALAQUITA. ESTUDO *IN VITRO*” a ser realizado pela pesquisadora Regina Célia Lopes Valadares, orientada pelo **Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior**, pelo curso de Mestrado em Endodontia do C.P.O. São Leopoldo Mandic.

Campinas, 30 de maio de 2006.

Gabriel Politano / José Carlos P. Imparato
Coordenadores do BDH São Leopoldo Mandic

ANEXO B - Aprovação do COEP

	Universidade Federal de Minas Gerais <i>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</i>
---	--


Parecer nº. ETIC 0485/06

Interessado(a): Prof. Marcos Pinotti Barbosa
Departamento de Engenharia Mecânica
Escola de Engenharia-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 25 de abril de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do coeficiente de absorção óptica e transmissividade do laser vermelho (660 nm) através das paredes dentinárias do canal radicular preenchidas com os corantes azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita. Estudo *in vitro***" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP-UFMG