



BR0645275



INIS-BR--3996

**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO**

**LASER EM BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO A  
FOTOSENSIBILIZADOR PARA REDUÇÃO BACTERIANA  
INTRACANAL COMPARADO AO CONTROLE QUÍMICO**

**AGUINALDO SILVA GARCEZ SEGUNDO**

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau  
de Mestre Profissional na área de  
Lasers em Odontologia.

Orientadora:  
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-orientador:  
Prof. Dr. José Luis Lage-Marques

**São Paulo  
2002**



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia

**LASER EM BAIXA INTENSIDADE ASSOCIADO A  
FOTOSENSIBILIZADOR PARA REDUÇÃO  
BACTERIANA INTRACANAL COMPARADO AO  
CONTROLE QUÍMICO**

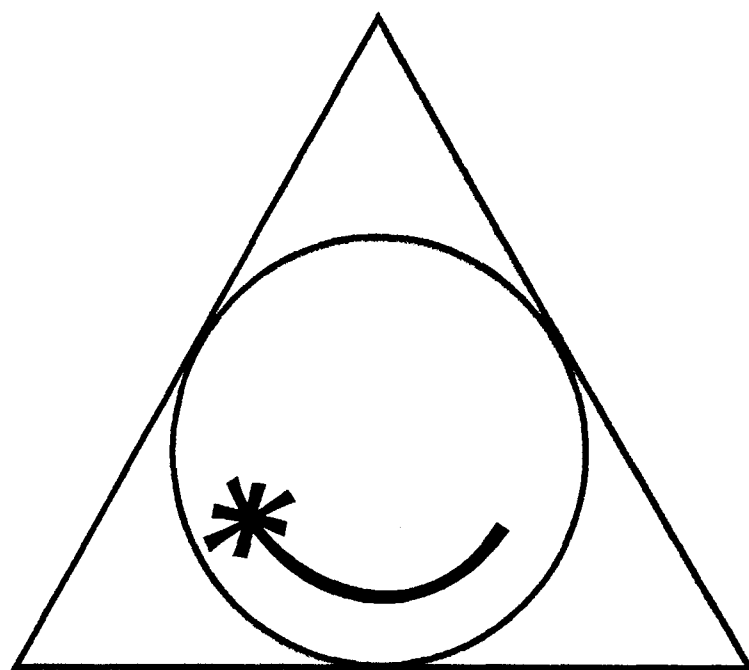
Aguinaldo Silva Garcez Segundo



Dissertação apresentada  
como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de  
Mestre Profissional em  
Lasers em Odontologia

Orientadora: Prof. Dra Martha Simões Ribeiro  
Co-orientador: Prof. Dr. José Luis Lage-Marques

São Paulo  
2002



**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE LASER EM  
ODONTOLOGIA**

---

Aos meus queridos pais, Aguinaldo e Edna,  
pela dedicação, amizade, carinho, apoio,...

---

À Sayuri por dar sentido a tudo isso,  
por ser meu apoio, por seu incentivo e  
paciência nas horas difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer nesta oportunidade a todos aqueles que com sua colaboração, direta ou indireta, tornaram possível a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Martha Simões Ribeiro, pela orientação, incentivo, e acima de tudo por acreditar em mim, por sua amizade, apoio, ensinamentos e conselhos que jamais serão esquecidos.

Ao Prof. José Luiz Lage-Marques por sua co-orientação e valiosos conselhos.

Ao Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pelas diretrizes na elaboração deste trabalho e por disponibilizar o laboratório de microbiologia da Universidade de Taubaté.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Zezell, pela oportunidade de compartilhar idéias, ideais e sugestões.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Sheila Gouw-Soares pelas valiosas informações endodônticas, por sua disponibilidade e ajuda na correção deste trabalho.

Ao Dr. Marcos Antônio Pereira Jr., pela amizade, colaboração e principalmente pela paciência em entender minhas ausências.

À Carmem, da Farmácia Biophitus, por sua ajuda e contribuição na pesquisa do corante e na formulação da pasta.

Ao Sandro, pelo auxílio e principalmente pela paciência na obtenção dos espectros de absorção dos diversos corantes.

Ao Luciano, por sua ajuda na confecção das medidas e gráficos do aumento de temperatura.

Ao Ivan e à Jane, do laboratório de microbiologia da Universidade de Taubaté, pois sem a sua ajuda não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado, que sempre acreditaram e torceram pelos bons resultados desta proposta.

À empresa Dentoflex, em especial ao Sr. Gilberto, pela confiança em ceder o equipamento laser, que foi o suporte desta pesquisa.

Às famílias Garcez e Suzuki por estarem ao meu lado e compartilharem todos os momentos vividos durante o mestrado.

Finalmente, a todos os meus amigos, e pensando bem, aos que não são tão amigos assim, pois cada um à sua maneira, me incentivaram e continuam incentivando cada vez mais.

A todos vocês, meu muito obrigado!

## Lista de abreviaturas e símbolos

$\lambda$	comprimento de onda
$\mu\text{m}$	micrômetro
$\mu\text{g}$	microgramas
nm	nanômetro
ml	mililitro
A	área
P	potência
T	tempo
W	watts
mW	miliwatts
mJ	milijoule
pps	pulsos por segundo
Hz	Hertz
°C	graus celsius
ufc	unidades formadoras de colônias
Er:YAG	Granada de ítrio-alumínio dopada com érbio
Er,Cr:YSGG	Granada de ítrio-escândio-gálio dopada com érbio e cromo



---

Nd:YAG	Granada de ítrio-alumínio dopada com neodímio
Ho:YAG	Granada de ítrio-alumínio dopada com hólmio
AsGaAl	Arseneto de gálio-alumínio
He-Ne	Hélio-neônio
EDTA	Ácido diamino-tetra acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

# **Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico**

**Aguinaldo Silva Garcez Segundo**

## **Resumo**

A terapia fotodinâmica consiste no uso de um corante que, ao absorver a luz em comprimento de onda ressonante, é levado a um estado excitado. O fotossensibilizador excitado reage então com um substrato, por exemplo o oxigênio, para produzir oxigênio singleto altamente reativo, provocando assim morte microbiana ou celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar a redução bacteriana intracanal em canais contaminados com *Enterococcus faecalis*. Trinta dentes com seus canais radiculares preparados foram contaminados com *E. faecalis*. Dez dentes receberam a substância química hipoclorito de sódio a 0,5% por 30 minutos; dez dentes receberam uma pasta a base do corante azuleno por 5 minutos e irradiação com um laser de diodo, potência de 10 mW,  $\lambda = 685$  nm; dez dentes não receberam tratamento. A redução bacteriana foi significativamente mais alta no grupo laser quando comparada ao grupo tratado com o hipoclorito de sódio a 0,5. Estes resultados indicam que a terapia fotodinâmica foi um método efetivo de redução bacteriana.

# **Low-intensity laser coupled with photosensitizer to reduce bacteria in root canals compared to chemical control**

**Aguinaldo Silva Garcez Segundo**

## **Abstract:**

The photodynamic therapy is a process in which a dye is associate with an appropriate wavelength of light and this dye goes to an excited state. The excited reacts with oxygen to form the highly reactive compound singlet oxygen, and this compound can kill bacteria and tumor cells. The purpose of this study was to evaluate the bactericidal reduction in root canal contaminated with *E. Faecalis*. Thirty teeth with their root canals prepared were contaminated with *E. faecalis*. The teeth have received the chemical substance sodium hypochlorite for 30 minutes; ten teeth have received the azulene dye paste for 5 minutes and have been irradiated with a diode laser, output power 10mW and  $\lambda = 685\text{nm}$  for 3 minutes. Ten teeth have not received treatment (control group). The bacterial reduction was significantly higher for laser group when compared to chemical and control groups. These results indicate photodynamic therapy as an effective method to kill bacteria.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	i
<b>Resumo</b> .....	iii
<b>Abstract</b> .....	iv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
3.1. Tratamento Endodôntico Convencional.....	12
3.2. Terapia Fotodinâmica .....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
4.1. Espectroscopia .....	46
4.2. O Equipamento laser.....	47
4.3. O corante.....	48
4.4. Estudo piloto.....	49
4.4.1. Redução bacteriana em tubos de ensaio .....	49
4.5. As amostras.....	52
4.5.1. Preparo das amostras .....	53
4.6. Os grupos.....	54
4.6.1. Recontaminação .....	56
4.7. Aumento de temperatura .....	58
<b>5. RESULTADOS</b> .....	59
5.1. Efeito bactericida do corante .....	60

	<b>Página</b>
5.1.1. Análise Inferencial.....	62
5.2. Comparação entre laser, líquido de Dakin e controle.....	63
5.2.1. Análise descritiva .....	63
5.2.2. Análise Inferencial.....	65
5.2. Estudo da recontaminação após uma semana.....	68
5.3.1. Análise descritiva .....	68
5.3.2. Análise Inferencial.....	70
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
APÊNDICE A: Resultados do Estudo Piloto .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

## 1. Introdução

O tratamento endodôntico tem como objetivo obter a reparação tecidual, permitindo ao dente seu retorno às atividades que lhe são específicas, tanto estética quanto funcionalmente, o que chamamos de processo de cura.

Sob este ponto de vista, o processo de cura depende fundamentalmente de dois fatores: as condições próprias de reparação do tecido e a presença ou ausência de infecção. Sabe-se que na presença de bactérias, haverá um impedimento para o processo de cura. Nos casos de tratamento endodôntico de polpas mortificadas, o objetivo do profissional reside em limpar, modelar e desinfetar o canal radicular para obter-se condições favoráveis à sua obturação. Sabe-se, ainda, que quando o canal está desinfetado, nada impede que se instale o processo de cura.

Paiva & Antoniazzi, em 1993, mostrara que em uma simples incursão na história da endodontia, revela que desde seus primórdios a eliminação do agente causal presente no interior do canal, tem sido o objetivo fundamental da prática endodôntica.

Atualmente, o tratamento endodôntico se faz através do preparo químico-cirúrgico, que consiste no uso concomitante de instrumentos manuais ou rotatórios e substâncias químicas. Sua eficiência está diretamente relacionada ao acesso e instrumentação de todas as paredes do canal radicular. Infelizmente é difícil eliminar todos os microorganismos e detritos orgânicos do canal radicular, utilizando-se os métodos de preparo químico-cirúrgico. A própria anatomia dos canais radiculares dificulta o acesso e o íntimo contato do instrumento endodôntico a todas as paredes do canal.

O tratamento endodôntico pode apresentar falhas quando todos os passos de acesso, limpeza, desinfecção e obturação do canal, atualmente preconizados, não são seguidos criteriosamente. A principal razão para que um dente não responda ao tratamento endodôntico é por causa de erros durante os procedimentos de controle e prevenção da infecção microbiana intracanal. Sem dúvida, o maior fator de falha em tratamentos endodônticos é a infecção microbiana do canal radicular e/ou do sistema perirradicular. As falhas no controle da infecção podem ocorrer por fratura de instrumentos, perfurações, sobreobturação, entre outros motivos. Entretanto, em alguns casos, mesmo que todos os procedimentos técnicos, tais como acesso aos canais, remoção do tecido cariado,

desinfecção, modelagem e obturação do sistema de canais, sejam seguidos com o máximo de rigor possível, alguns tratamentos ainda falham. Evidências científicas indicam que isto pode ser associado a fatores microbianos, tais como infecções intra e/ou extra-radiculares. (Siqueira Jr. 2001)

Quando falhas ocorrem no tratamento endodôntico, normalmente se refaz o tratamento endodôntico desobturando-se o canal e usando-se substâncias químicas diversas no intuito de eliminar ou reduzir as bactérias presentes no interior do canal. A literatura nos mostra que a longo prazo, e dependendo dos fatores envolvidos, como a presença de lesão periapical e do tamanho desta lesão, o índice de sucesso do retratamento não passa de 74% (Sundqvist *et al* 1998).

Com o objetivo de evitar a disseminação da infecção e o risco de uma infecção sistêmica, diversos antibióticos têm sido administrados aos pacientes e isso tem levado ao aumento da resistência microbiana aos antibióticos. Bactérias como o *Enterococcus faecalis*, descritas como sendo originalmente resistentes e de difícil eliminação, vêm se tornando resistente a diversos antibióticos como eritromicina, ampicilina, benzilpenicilina, clindamicina, metronidazol, tetraciclina (Dahen *et al* 2000, Noda *et al* 2000, Zouain e Araj 2001) assim como resistente, também



a diversos antimicrobianos como o hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado, clorexidina e hipoclorito de sódio (Siqueira Jr. e Uzeda 1996, Ayhan *et al* 1999, Buck *et al* 2001).

A tecnologia *laser* apresenta-se, atualmente, como uma alternativa para o diagnóstico e tratamento tanto na Medicina como na Odontologia. Muitos experimentos vêm buscando inserir esta tecnologia no dia a dia da prática clínica, com o objetivo, não de substituir, mas de aprimorar as técnicas convencionais. As propriedades dos lasers que permitem o seu uso na endodontia incluem a capacidade da energia do *laser* em vaporizar o tecido pulpar ou os restos pulpares, favorecer maior limpeza das paredes dentinárias, alterar a permeabilidade da dentina e promover a desinfecção do canal radicular. Estudos *in vitro* e *in vivo*, mostram que a irradiação com o laser é um excelente método de redução microbiana. Pode-se encontrar na literatura estudos em que a redução bacteriana, maioria dos casos, ultrapassa os 99% ( Gutknecht 1999 e Gutknecht 2000).

Os *lasers* comumente utilizados (Er:YAG, Er,Cr:YSGG, Nd:YAG, Ho:YAG e diodo) são *laser* de alta potência e por isso o risco de aumento de temperatura intracanal ou na superfície radicular não pode ser negligenciado (Gutknecht 1996, Moritz 1997, Gouw-Soares 2000). Além disso, os *lasers* de alta potência, ainda tem um custo relativamente

alto, o que os torna, atualmente, inviável para a grande maioria dos clínicos.

Na área médica os *lasers* em baixa intensidade tem sido utilizados associados a fotossensibilizantes, na terapia fotodinâmica, para o tratamento do câncer, por sua capacidade de destruição seletiva de tumores.

Na verdade, a luz tem sido utilizada no tratamento de doenças desde a antiguidade; os indianos, egípcios e chineses já tratavam doenças da pele como psoríase, vitiligo e câncer com a exposição do paciente ao sol, o que o filósofo grego Heródoto chamava de *Helioterapia*.

As primeiras experiências com a terapia fotodinâmica, datam de 100 anos atrás, relatadas por Raab e Von Tappeiner. Eles estudavam a ação da acridina vermelha sobre culturas de paramécios, o protozoário causador da malária. Durante uma tempestade de raios, os pesquisadores verificaram uma reação não usual dos paramécios à acridina o que os levou a suspeitar que as condições de luz no ambiente durante os experimentos poderiam alterar o resultado das pesquisas. Eles postularam que este efeito era causado pela transferência da energia da luz para a substância química, similar ao que ocorre nas plantas pela absorção da luz pela clorofila.

Durante o tratamento de epilepsia, em 1900, os neurologistas Jouve e Boyer, administraram eosina por via oral aos pacientes e verificaram que os pacientes apresentavam dermatite nas áreas expostas ao sol. Este trabalho motivou o doutor Von tappeiner e o dermatologista Jesionek a utilizar uma combinação de eosina, aplicada topicamente, com exposição à luz branca para o tratamento de tumores na pele. Em 1907, Von tappeiner cunhou o termo *Ação fotodinâmica* para descrever este fenômeno.

As pesquisas, tomaram então um rumo diferente, o que levou a concentração de estudos, na área de diagnóstico e combate ao câncer, e ao desenvolvimento de novos fotossensibilizantes e novas fontes de luz. Em 1972, Lancet e Diamond tentaram destruir células tumorais com a associação de hematoporfirina, atualmente um dos mais aceitos fotossensibilizantes e raios-X. Com exposição a raios-X, os autores não tiveram sucesso, demonstrando que a fonte de luz (ou radiação eletromagnética) devem ser ressonante com a absorção do corante.

As primeiras fontes de luz, utilizavam lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática, com um forte componente térmico associado. Com o desenvolvimento dos *lasers*, esta fonte de luz se mostrou muito mais eficiente que lâmpadas comuns para uso em

terapia fotodinâmica. Os *lasers* produzem luz monocromática, com um comprimento de luz bem conhecido o que os torna altamente seletivo aos corantes. A dose de radiação é facilmente calculada, a área de radiação pode ser bem controlada, focalizando o tratamento, a radiação pode ser transmitida por fibra óptica e estas fibras podem receber adaptações para melhor acessar a lesão alvo, como microlentes e difusores. (Ackroyd *et al* 2001)

Diversas fontes *laser* foram utilizadas ao longo dos anos, tais como *lasers* de argônio, helio-neônio, de corantes, de vapores de metais e os *lasers* de diodo, normalmente utilizando-se comprimentos de onda próximos ao vermelho visível.

No campo dos corantes, as pesquisas se concentraram nas porfirinas, corantes endógenos com estrutura química heterocíclica, similar à clorofila e à hemoglobina. Este corante absorve a luz na forma de fótons, 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 (Arakane *et al* 1996, Ochsnera 1997, Szeimiesa e Landthaler 1997, Ackroyd *et al* 2001).

Na década de 80 e 90, diversos autores se voltaram para o primeiro estudo de Raab e Von Tappeiner, estudando a eliminação de microorganismos pela terapia fotodinâmica e para isso, diversos corantes foram testados, como corantes azuis, roxos, marrons, verdes, entre outras cores complementares aos comprimentos de onda apresentados pelos *lasers*. A literatura demonstra que o uso de corantes deve ocorrer de forma que a banda de absorção dos fotoiniciadores esteja em ressonância com o comprimento de onda emitido pela fonte de luz (Okamoto *et al* 1992, Dobson e Wilson 1992, Wilson e Dobson 1993, Wilson *et al* 1995, Ochsnera 1997, Sailer *et al* 1997, König *et al* 2000 e Ovchinnikov e Tuchin 2001). Os estudos têm demonstrado que a utilização de corantes azuis, principalmente o azul de toluidina (TBO) e azul de metileno (MB), associado ao *laser* de He-Ne com comprimento de onda de 632,8 nm, apresentam os melhores resultados na redução microbiana de diversas culturas de bactérias e fungos. (Dobson e Wilson 1992, Wilson *et al* 1992, Wilson e Dobson 1993, Burns *et al* 1993, Sarkar e Wilson 1993)

O *laser* de He-Ne apresenta diversas vantagens quando comparado aos *lasers* de corante, argônio ou vapor de metais, mas este *laser* ainda está longe de ser o ideal. Comparando o *laser* de He-Ne aos *laser* de diodo de ArGaAl, que geram emissões de comprimento de onda

muito próximos, os *lasers* de diodo são mais compactos, mais potentes, de menor custo e mais versáteis.(Walsh, 1997)

Como principal desvantagem aos *lasers* de diodo em comparação com o laser de He-Ne, temos que os corantes existentes apresentam absorção em uma banda mais próxima à emissão do He-Ne ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) do que à emissão dos *lasers* de diodo ( $\lambda = 680 \text{ a } 900 \text{ nm}$ ), o que diminui sua eficiência na redução microbiana.

No entanto, a toxicidade dos corantes mais utilizados em PDT ainda é elevada, tornando seu uso viável apenas em concentrações pequenas, o que diminui sua absorção de luz e, conseqüentemente, sua eficácia.

A busca por novos agentes fotossensibilizantes tem sido uma constante no campo da terapia fotodinâmica, tanto no tratamento de tumores, como na eliminação de microorganismos. Corantes menos tóxicos, de maior absorção, mais ressonante com o comprimento de onda emitida pelos lasers de diodo e mais eficiente têm sido a busca de diversos pesquisadores. E quanto mais próximos deste ideal novos agentes fotossensibilizante se mostrarem, mais a terapia fotodinâmica realizará seu potencial na redução microbiana.

A terapia fotodinâmica já provou ser uma eficiente alternativa à

substâncias químicas e antibióticos no combate à infecções causadas por microorganismos. Principalmente na cavidade oral, sua eficiência, baixo custo, ausência de efeitos sistêmicos e de aumento da resistência microbiana à drogas, indica esta terapia como importante auxiliar às terapias convencionais.

## 2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- avaliar a redução bacteriana, por terapia fotodinâmica, *in vitro*, após contaminação de canais radiculares com cultura de *Enterococcus faecalis*,
- comparar a redução bacteriana alcançada pela terapia fotodinâmica ao método de controle químico com o hipoclorito de sódio a 0,5% (líquido de Dakin),
- demonstrar a viabilidade do uso intracanal do corante azuleno a 25% associado a pasta endo PTC.



### **3. Revisão bibliográfica**

#### **3.1. Tratamento endodôntico convencional (Método químico).**

Nair *et al* (1990), estudaram *in vivo*, a presença de bactéria e fungos em lesões apicais refratárias. Os autores analisaram nove lesões periapicais assintomáticas e refratárias que foram removidas para biópsia, durante tratamento cirúrgico de dentes que apresentavam falha no tratamento endodôntico. As biópsias foram analisadas em microscópio de luz e em microscópio eletrônico. Seis dos nove dentes apresentavam a presença de bactérias na área da lesão e nos três dentes restantes havia fungos. Estes achados sugerem que na maioria dos casos, em dentes tratados endodonticamente e com lesão periapical resistente, microorganismos podem resistir viáveis e desempenhar um papel primordial na ocorrência de falhas em tratamentos endodônticos.

Sundqvist (1992), estudou o relacionamento entre bactérias no interior do canal radicular. O autor verificou a existência de relacionamento tipo comensalismo e antagonismo entre determinadas espécies de bactérias coletadas entre 65 indivíduos que apresentavam seus

canais radiculares com infecção, o que dificulta sua eliminação do canal radicular.

Siqueira Jr. e Uzeda (1996), estudaram, *in vitro*, a desinfecção por pasta de hidróxido de cálcio de túbulos dentinários infectados com *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, ou *Enterococcus faecalis*, microorganismos frequentemente achados em infecções endodônticas. As amostras de dentina infectadas foram expostas a pasta de hidróxido de cálcio, associado à solução salina ou a paramonoclorofenol canforado, por 1 hora, 1 dia e 1 semana. A pasta de hidróxido de cálcio associada ao paramonoclorofenol canforado foi efetiva em eliminar bactérias após o período de 1 hora, com exceção para as amostras de *Enterococcus faecalis*, que só foram eliminados após um dia de exposição ao medicamento. A pasta de hidróxido de cálcio associada a solução salina foi inefetiva contra *E. faecalis* e *F. nucleatum*, mesmo após uma semana de exposição ao medicamento.

Siqueira Jr. *et al* (1997) avaliaram, *in vitro*, a efetividade de uma solução a 4% de hipoclorito de sódio usado em três métodos de irrigação para eliminação da bactéria *Enterococcus faecalis* do interior do

canal radicular. Foi avaliada a ação da solução de hipoclorito de sódio quando associada a agitação manual com limas endodônticas, agitação mecânica com ultra-som e uso intercalado da solução de hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. Os autores não encontraram diferenças significantes entre os três grupos, mas a solução de hipoclorito de sódio foi estatisticamente mais efetiva que a solução salina usada no grupo controle.

Tanriverdi *et al* (1997) compararam, *in vitro*, utilizando-se de dentes humanos, os efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio, do paramonoclorofenol e paramonoclorofenol canforado em canais radiculares contaminados com a bactéria *E. faecalis*. Os autores preconizara um modelo de estudo em dentina humana. Os espécimes após inoculação da bactéria, eram medicados com hidróxido de

Abou-Rass e Bogen (1998) investigaram, *in vivo*, os microorganismos presentes nas lesões periapicais fechadas. Um total de 13 lesões foram selecionadas entre 70 pacientes com indicação de tratamento cirúrgico. O principal critério para a seleção das lesões era que a lesão deveria apresentar-se isolada do contato com o meio oral, mesmo por via periodontal. As amostras foram colhidas de três diferentes locais da área cirúrgica. Os resultados mostraram que 63,6% dos microorganismos encontrados eram anaeróbios restritos e 36,4% eram anaeróbios facultativos. A prevalência das espécies mostra que 31,8% eram *Actinomices sp.*, 22,7% *Propionibacterium sp.*, 18,2% eram *Streptococcus sp.*, 13,6% eram *Staphylococcus sp.*, 4,6% eram *Porphyromonas gengivalis.*, 4,6% eram *Peptostreptococcus micros* e 4,6% eram *Enterococcus* gram positivos.

Sundqvist *et al* (1998) determinaram, *in vivo*, qual microflora estava presente em dentes que apresentavam insucesso no tratamento endodôntico e qual a taxa de sucesso dos retratamentos endodônticos. Cinquenta e quatro dentes com o canal tratado e que apresentavam lesão periapical persistente foram selecionados para este estudo. Os dentes tiveram seus canais desobturados e amostras foram coletadas de

todos os canais. A bactéria mais comumente isolada dos canais foi a espécie *Enterococcus faecalis*. A taxa de sucesso de retratamento foi de 74% após cinco anos de acompanhamento. Presença de infecção no momento da obturação do canal e tamanho da lesão periapical foram fatores que tiveram uma influência negativa no prognóstico do retratamento.

Ayhan *et al* (1999), em um estudo *in vitro*, verificaram os efeitos antimicrobianos de soluções para irrigação intracanal sobre seis microorganismos. Os autores analisaram o efeito antimicrobiano das seguintes substâncias irrigadoras: hipoclorito de sódio (5,25% - soda clorada e 0,5% - líquido de Dakin), dicloconato de clorexidina 0,2%, álcool (21%), solução salina e uma solução composta de paramonoclorofenol (30%), timol (5%) e dexametazona (0,1%). As culturas bacterianas utilizadas neste estudo foram: *S. piogenes*, *C. albicans*, *S. salivarius*, *S. aureus*, *E. coli* e *E. faecalis*. O hipoclorito de sódio, se mostrou efetivo contra todos os microorganismos testados, sendo que a concentração de 5,25% foi mais efetiva. Segundo os autores, diminuindo-se a concentração diminuiu-se o efeito antimicrobiano. A solução de paramonoclorofenol, timol e dexametazona apresentaram as maiores zonas de inibição quando

comparadas às outras soluções. O álcool apresentou uma pequena zona de inibição, a mesma apresentada pelo digluconato de clorexidina e a solução salina se mostrou ineficiente contra os microorganismos testados.

Leonardo *et al* (1999) testaram, *in vivo*, uma solução de gluconato de clorexidina a 2% na irrigação de canais radiculares em pacientes que apresentavam polpa necrosada e lesão periapical evidente na radiografia. Vinte e dois dentes, entre incisivos e molares foram utilizados. Após acesso aos canais radiculares, amostras foram colhidas dos canais com cones de papel e transferidas para cultura microbiológica. Os canais foram então instrumentados com a solução de clorexidina e fechados com curativo de óxido e zinco e eugenol por 48 horas. Após este período de tempo, novas amostras foram coletadas e submetidas ao teste microbiológico. Os autores verificaram que houve redução de *S. mutans* em 100% das amostras e redução de 77% das bactérias anaeróbias, sugerindo que a solução de gluconato de clorexidina a 2% deve ser utilizada para prevenir atividade bacteriana residual em canais tratados endodonticamente.

Reit *et al* (1999) testaram, *in vivo*, uma solução de iodeto de potássio a 5% como medicação de espera entre sessões no tratamento de canal. Cinqüenta dentes que apresentavam lesão periapical, foram instrumentados e receberam a solução de iodeto de potássio a 5% por uma semana. Comparado com estudos que usaram hidróxido de cálcio como medicação de espera, o uso do iodeto de potássio mostrou-se mais eficiente em sua ação antimicrobiana.

Siqueira Jr *et al* (1999), avaliaram a redução bacteriana intracanal através da instrumentação mecânica e irrigação com solução salina. Os canais radiculares foram inoculados com uma suspensão de *Enterococcus faecalis* e instrumentados manualmente com limas *Nitiflex*, e por instrumentos rotatório *Greater* e *Profile 0.06 série 29*. Amostras foram colhidas antes e após a instrumentação. O resultado do estudo mostrou que a redução bacteriana com instrumentação mecânica e irrigação pode remover pouco mais que 90% das bactérias presentes no canal radicular.

D'arcangelo *et al* (1999) estudaram, *in vitro*, o efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5, 1, 3 e 5%) e diferentes

concentrações de clorexidina e cetrimida associadas, em cultura de bactérias anaeróbias facultativas (*C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*), anaeróbias estritas (*A. odontoliticus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. melanogenica*) e bactérias microaeróbias (*A. actinomycetemcomitans*). Cada um dos antimicrobianos ficou em contato com as espécies bacterianas por tempos que variaram de 10, 20 e 30 minutos. Os resultados mostraram ser eficientes contra as espécies bacterianas em todas as concentrações e tempos do experimento.

Dahlen *et al* (2000) avaliaram a suscetibilidade da bactéria *Enterococcus* a diversos antibióticos. Amostras da bactéria *Enterococcus* foram isoladas em 29 dentes com infecção endodôntica persistente, previamente tratados com solução de hidróxido de cálcio. Destes dentes vinte e seis estavam contaminados pela bactéria *E. faecalis* e três dentes estavam contaminados pela bactéria *E. faecium*. O teste de suscetibilidade antimicrobiana revelou que as bactérias isoladas eram resistentes à ampicilina, benzilpenicilina, clindamicina, metronidazone e tetraciclina, mas não resistentes à eritromicina e à vancomicina. Os autores concluíram que devido a sua baixa sensibilidade aos agentes antimicrobianos, o



*Enterococcus* pode estar presente em canais radiculares infectados, mesmo após tratamento endodôntico, e que sua presença pode ser um dos fatores que levariam a falhas nos tratamentos endodônticos.

Siqueira Jr. *et al* (2000) avaliaram , *in vitro*, a redução bacteriana produzida por instrumentação mecânica e irrigação com solução de hipoclorito de sódio a 1; 2,5; 5.25% e solução salina. Os canais radiculares foram inoculados com cultura de *Enterococcus faecalis* e submetidos à instrumentação e irrigação com as substâncias testadas. Foram feitas amostras antes e após a preparação do canal. As amostras eram cultivadas em *Agar Mitis salivarius* e realizada contagem de colônia de bactérias. Também avaliou-se a redução bacteriana através do teste de difusão de agar. As três diferentes concentrações de hipoclorito de sódio mostraram eficiente redução bacteriana, sem haver diferença estatística significativa entre elas. As soluções de hipoclorito de sódio foram significativamente mais efetivas na redução bacteriana intra-canal quando comparadas à solução salina.

Peciulene *et al* (2000) verificaram, *in vivo*, a presença da bactéria *Enterococcus faecalis* em dentes previamente tratados

endodonticamente e que apresentavam periodontite apical, requerendo retratamento em população da Lituânia. De vinte e cinco dentes assintomáticos, vinte continham bactérias; deste vinte dentes, catorze dentes apresentavam cultura positiva para *E. faecalis* em cultura pura ou como maior componente da flora local. Os autores coletaram uma segunda amostra após reparo dos canais, utilizando como substância química auxiliar o hipoclorito de sódio (2.5%) e EDTA. Os resultados mostram que em sete dos vinte dentes houve crescimento bacteriano e que destes sete espécimes, cinco apresentavam cultura positiva de *E. faecalis*.

Noda *et al* (2000) estudaram, *in vivo*, a suscetibilidade a antibióticos de bactérias obtidas em canais com persistente exudato apical por periodontite apical. Doze espécies bacterianas foram identificadas em 15 dentes com exudato. As espécies mais comuns foram o *Streptococcus* e o *Enterococcus*. O resultado do teste de suscetibilidade ao antibiótico mostrou que o *Enterococcus* foi a espécie bacteriana mais resistente aos antibióticos, especialmente à cefalosporina.

Buck *et al* (2001) compararam, *in vitro*, três soluções para irrigação do canal radicular e sua eficiência em matar bactérias no canal radicular e no interior dos túbulos dentinários. Doze dentes recém-extraídos foram preparados, esterilizados e contaminados com a bactéria *E. faecalis*. Os canais foram expostos aos seguintes agentes irrigantes: hipoclorito de sódio 0,525%, EDTA 0,2% e clorexidina 0,12%; solução salina foi usada como controle. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio foi o mais eficiente. O EDTA e a clorexidina foram mais eficientes que a solução salina. Verificou-se também que quanto mais distante do canal radicular, isto é, mais profundo na dentina, maior o número de bactérias viáveis.

Dicuonzoa *et al* (2001), Isolaram, *in vitro*, cinquenta e quatro culturas de *E. faecalis* e 20 culturas de *E. faecium* de fontes clínicas e não humanas (unidade de terapia intensiva em três hospitais em Roma), caracterizados pela resistência antibiótica à vancomicina, teicoplanina, ampicilina e ciprofloxacina. Ambas as espécies mostraram nível intermediário e alto de resistência antibiótica, sendo que o *E. faecium* mostrou-se mais resistente aos antibióticos que o *E. faecalis*.

Hancock *et al* (2001) estudaram a composição da microflora bacteriana encontrada em dentes com insucesso endodôntico na população norte-americana. Cinquenta e quatro dentes com tratamento endodôntico e persistente radiolucidez óssea periapical foram selecionados para retratamento. Após a remoção da obturação do canal, foram colhidas amostras com cone de papel e raspagem da dentina periapical. Ambas as amostras foram cultivadas em meios de aerobiose e anaerobiose restrita. Os autores encontraram nas amostras um ou dois tipos predominantes de bactérias gram-positivas. *Enterococcus faecalis* foi a espécie de bactéria mais comum encontrada.

Lima *et al* (2001) estudaram, *in vitro*, a suscetibilidade da bactéria *Enterococcus faecalis* quando em biofilme, a diversos medicamentos antimicrobianos. Os autores utilizaram as seguintes soluções antimicrobianas, associadas: gloconato de clorexidina (2%), natrozole (2%), clindamicina (2%), metronidazol (10%), lauril-dietileno-glicol eter sulfatado de sódio (1,25%), óxido de zinco (15%) e água destilada. As soluções contendo clorexidina foram as mais eficientes em combater o biofilme após um e três dias. Todas as soluções mostraram se capazes de reduzir o número de bactérias no biofilme.

Love (2001) identificou, em um estudo *in vitro*, os possíveis mecanismos que explicam como o *E. faecalis* pode sobreviver e crescer dentro dos túbulos dentinários e reinfetar um canal radicular obturado. Culturas de *S. gordonii*, *S. mutans* e *E. faecalis* foram inoculadas em meio de cultura, contendo diferentes concentrações de soro humano por 56 dias. Após os 56 dias, todas as espécimes bacterianas permaneceram viáveis, mesmo crescendo em soro humano. O soro humano se mostrou capaz de inibir a invasão dentinária do *S. gordonii* e do *S. mutans*, mas somente reduziu, não se mostrando capaz de inibir a invasão do *E. faecalis* e aumentando a capacidade desta bactéria de se aderir ao colágeno. O autor conclui que o fator de virulência do *E. faecalis* pode ser relacionado à habilidade desta bactéria de manter sua capacidade de invasão nos túbulos dentinário e adesão ao colágeno na presença de soro humano.

Peters *et al* (2001) analisaram a presença de bactéria viáveis em três diferentes profundidades de dentina, em raízes de pacientes que apresentavam lesões periapicais. As amostras foram colhidas de porções de dentina localizadas entre as paredes do canal e a superfície do

cimento. Utilizando-se de técnicas de cultura microbiológicas, foram encontradas bactérias em 77% das amostras de dentina das paredes do canal, em 87,5% das amostras intermediárias de dentina e em 62% das amostras de dentina próximas ao cimento.

Siqueira Jr. (2001) revisou a literatura pesquisando sobre as causas de falhas em tratamentos endodônticos. Segundo o autor, na maioria das vezes, falhas em tratamento endodôntico ocorrem quando os procedimentos são executados inadequadamente. Entretanto, em certos casos, mesmo que todo o rigor da técnica tenha sido seguido, falhas ainda podem ocorrer. Nestes casos, estas falhas resultam em re-infecção ou infecção persistente no canal radicular, provavelmente porque ainda existem microorganismos resistentes na porção apical do canal radicular, pois alguns estudos mostram que esta porção do canal pode permanecer inatingida durante o preparo químico-mecânico do canal. Bactérias presentes no interior dos túbulos dentinários, em canais acessórios ou istmos, podem sobreviver por longos períodos; se estas bactérias crescerem a um certo nível, elas podem ganhar acesso ao periápice, provocando o aparecimento de lesões ósseas. As bactérias associadas a falhas nos tratamentos endodônticos normalmente são, em 51% dos

casos, anaeróbias, sendo que de 29% a 38% deles aparecem a bactéria *Enterococcus faecalis*.

Valera *et al* (2001) avaliaram, *in vitro*, o efeito do hipoclorito de sódio a 1% associado a cinco diferentes medicamentos (hidróxido de cálcio em pasta de polietileno glicol, paramonoclorofenol canforado, solução de iodo 2%, tricresol formalina e pasta de hidróxido de cálcio mais polietileno glicol e paramonoclorofenol canforado em canais radiculares contaminados com culturas de *C. albicans*. Os resultados mostraram que o paramonoclorofenol canforado foi efetivo em 100% das amostras seguido por hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol canforado (70% de efetividade), hipoclorito de sódio 1% (70% de efetividade), tricresol formalina (60%), solução de iodo 2% (50%) e pasta de hidróxido de cálcio (30%). Segundo os autores, os resultados reforçam a importância do tratamento endodôntico em sessões e com o uso de medicação intracanal entre as sessões o que pode eliminar os microorganismos presentes no canal radicular.

Zouain e Araj (2001) estudaram a resistência a 11 diferentes antibióticos de bactérias da espécie *Enterococcus*, no Líbano. Os

autores isolaram culturas de *Enterococcus* em 153 lesões entre 1998 e 1999. As bactérias isoladas foram classificadas como: 72,5% *E. faecalis*, 22,9% *E. faecium*, 3,2% *E. avium* e 1,3% *E. gallinarum*. O teste de resistência aos antibióticos mostrou que o *E. faecalis* foi resistente à ampicilina em 0,9% das amostras, à eritromicina em 59%, à tetraciclina em 72%, ao cloranfenicol em 32%, rifamicina em 36%, à ciprofloxacina em 23% e a aminoglicosídeos em 19%. Nenhuma das culturas apresentou resistência à vancomicina ou à teicoplanina. Estes resultados, segundo os autores, sugerem a criação de um programa nacional de controle de resistência a antibióticos, que ajudará no controle de infecções, na diminuição da administração empírica de antibióticos e implementação de uma política no uso de antibióticos.

### **3.2. Terapia fotodinâmica**

Okamoto *et al* (1992) investigaram, *in vitro*, o efeito antimicrobiano do *laser* de He-Ne associado a diversos corantes sobre microrganismos cariogênicos. Os autores testaram o efeito antimicrobiano do *laser* de He-Ne quando combinado com dez tipos de corantes (azuis, roxos e verdes) em espectroscopia de absorção atômica, espectroscopia ultravioleta



e zona de inibição de crescimento em placas de cultura. Verificou-se neste estudo que os efeitos letais sobre os microrganismos eram efetivos, apenas quando corantes específicos foram utilizados.

Dobson e Wilson (1992), em um estudo *in vitro*, analisaram a redução bacteriana por fotossensibilização de biofilme formado pelas espécies *S. sanguis*, *P. gengivalis*, *F. nucleatum* e *A. actinomicetemicomitans* por um *laser* em baixa intensidade. Utilizando sobre amostras de biofilme bacteriano em placas de Petri, uma associação de diversos corantes e um *laser* de He-Ne de 7,3 mW de potência, os autores concluíram que os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram eficazes em eliminar as quatro espécies de bactérias e os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio, hematoporfirina HCl e hematoporfirina éster somente foram efetivos em sensibilizar alguns do microrganismos. Os autores sugerem que, baseados em seus resultados, que a técnica de terapia fotodinâmica pode ser efetiva em eliminar bactérias periodontopatogênicas da placa bacteriana.

Wilson *et al* (1992) testaram *in vitro*, vinte e sete compostos associados a um *laser* de He-Ne de 7,5 mW de potência na capacidade de sensibilizar e eliminar as bactérias *Actinobacillus*

*actinomycetemcomitans*, *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Os corantes azul de toluidina, azul de metileno e cloreto azul B nas concentrações de 0,005% foram efetivos contra as quatro espécies de bactérias, quando associados a um tempo de exposição de apenas 30 segundos.

Wilson e Dobson (1993) verificaram, *in vitro*, a fotossensibilização de bactérias orais anaeróbias (*P. gingivalis* e *F. nucleatum*) por uma associação de um *laser* de He-Ne e três corantes (azul de toluidina, diematoporfirina éster e ftalocianina dissulfonada de alumínio). Os autores recomendaram mais estudos sobre a técnica de terapia fotodinâmica como alternativa ao uso de antibióticos em tratamento de periodontites crônicas.

Wilson *et al* (1993) estudaram a redução bacteriana, *in vitro*, em culturas de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* expostas a um *laser* de He-Ne de potência de 7,5 mW, por 80 segundos, associado aos corantes azul de toluidina (25 µg/ml) e azul de metileno (25 µg/ml). A associação de corante mais *laser* se mostrou letal para as três culturas de bactérias e na

ausência do fotossensibilizante, a exposição ao *laser* não se mostrou eficaz.

Burns *et al* (1993) expuseram, *in vitro*, uma suspensão de bactérias cariogênicas (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* e *A. viscosus*) a um *laser* de He-Ne de 7,3 mW de potência na presença do corante azul de toluidina na concentração de 50 µg/ml e verificaram uma substancial redução bacteriana para todas as espécies. Os autores verificaram também que na ausência do corante não havia significativa redução da viabilidade bacteriana. Este estudo sugere que esta técnica pode ser útil para a desinfecção de lesões cariogênicas em dentística restauradora.

Wilson *et al* (1993) testaram, *in vitro*, diversos corantes na fotossensibilização da bactéria *S. sanguis*. Culturas da bactéria foram expostas a um *laser* de He-Ne em diferentes tempos de irradiação e associado a diferentes corantes. Os resultados obtidos pela contagem de ufc viáveis mostraram que o azul de toluidina, hematoporfirina éster, tionina e o azul de metileno, foram eficazes em matar o microrganismo. Entretanto, verificou-se que os corantes hematoporfirina éster e azul de metileno eram tóxicos ao microrganismo na ausência do *laser* e que

os corantes ftalocianina dissulfonada de alumínio e cristal violeta (violeta de genciana) foram ineficazes nas condições utilizadas no estudo. Os autores sugerem a possibilidade de um novo meio de controle de bactérias da placa dental.

Sarkar e Wilson (1993) estudaram a fotossensibilização de bactérias da placa subgingival de pacientes com periodontite crônica. Amostras da placa subgingival foram expostas a um *laser* de He-Ne de 7,3 mW de potência, na presença e na ausência do corante azul de toluidina na concentração de 50 µg/ml. Os autores concluíram que a combinação *laser* corante alcançou uma significativa redução bacteriana, sendo que a média de redução foi de 91,1% na bactérias aeróbias, 96,9% nas anaeróbias, 100% nas pigmentadas anaeróbias e 94,4% para os *streptococcus* . Entretanto, a redução bacteriana não foi significativa na presença apenas do corante. Isto sugere que *lasers* em baixa intensidade associados a um corante apropriado podem ser efetivos como tratamento coadjuvante ao debridamento mecânico em inflamações periodontais.

Burns *et al* (1995) estudaram, *in vitro*, os efeitos da terapia fotodinâmica em *Streptococcus mutans* na dentina e no colágeno. Os

autores analisaram os efeitos da combinação *laser* He-Ne e azul de toluidina ou *laser* de ArGaAl e ftalocianina dissulfonada de alumínio sobre a bactéria embebida em uma matriz de colágeno, quando entre esta e o *laser* era interposta uma fatia de dentina desmineralizada. Os autores concluíram, que aparentemente, o grau de desmineralização da dentina não interferia na extensão da morte bacteriana e que prolongando-se a exposição ao *laser*, aumentava a morte bacteriana. O estudo sugere que terapia fotodinâmica pode ser efetiva na eliminação do *S. mutans* de lesões cariosas, mesmo quando a bactéria estiver dentro de uma matriz de dentina desmineralizada.

Wilson e Pratten (1995) estudaram a fotossensibilização do *Streptococcus aureus*, *in vitro* em relação à fase de crescimento, presença de fluidos inflamatórios e tempo de pré-irradiação. Avaliou-se a morte bacteriana em uma suspensão de *S. aureus* em soro sanguíneo de cavalos com células na fase estacionária de crescimento e a combinação de *laser* de ArGaAl e corante ftalocianina dissulfonada de alumínio. Os resultados mostraram que a morte bacteriana não está diretamente ligada a fase de crescimento bacteriano e pode ser efetiva, mesmo na presença de soro sanguíneo.

Henry *et al* (1995) estudaram a ação do laser de argônio em baixa intensidade sobre biofilme de bactérias das espécies *Porphyromonas* e *Prevotella*. Os autores concluíram que os efeitos fototóxicos sobre estas espécies foram causados pelo *laser* sozinho, não foram modificados pela idade do biofilme, foram dependentes da presença de oxigênio atmosférico, sofreram influência da presença de heminas, hemoglobina e sangue, foi maior do que quando comparado com outras espécies bacterianas, foi efetiva sem o uso de fotossensibilizadores.

Wilson *et al* (1995) determinaram, em um estudo *in vivo*, se as bactérias da placa supragengival poderiam ser eliminadas por um laser em baixa intensidade associado a um fotossensibilizante. As amostras de placa bacteriana obtidas de dez voluntários, foram tratadas com corante azul de toluidina e ftalocianina dissulfonada de alumínio e então expostos a um *laser* de He-Ne ou ArGaAl respectivamente. Após a irradiação, houve redução substancial das bactéria anaeróbias assim como dos *Streptococcus* e *Actinomices* viáveis. Segundo os autores, a combinação de He-Ne e TBO se mostrou mais eficiente que a combinação de ArGaAl e AlPcS<sub>2</sub> na redução de bactérias quando usadas energias de 1,31 J.

Arakane *et al* (1996) mediram, *in vitro*, a emissão espectral de radiação infravermelha do oxigênio singlete formado por excitação laser em porfirinas endógenas da bactéria cutânea *Propionibacterium acnes*. Os resultados sugerem que o oxigênio singlete pode ser formado sobre a superfície da pele e produzir sérios danos a mesma.

Soukos *et al* (1996) avaliaram os efeitos fotodinâmicos, *in vitro*, da radiação laser vermelha e do corante azul de toluidina sobre queratinócitos orais humanos, fibroblastos e *S. sanguis*. O objetivo do trabalho era avaliar se a terapia fotodinâmica poderia ser usada no tratamento da doença periodontal, eliminando as bactérias causadoras da mesma, sem provocar danos aos tecidos adjacentes. Os autores concluíram que o uso de baixas concentrações de corante e do laser provocava a morte bacteriana e não reduzia a viabilidade celular.

Ochsnera (1997), revisando a literatura, descreveu os processos fotofísicos e fotobiológicos da terapia fotodinâmica em tumores e o desenvolvimento de novos fotossensibilizantes. De acordo com Ochsnera, a terapia fotodinâmica é uma nova e atrativa modalidade de

tratamento de tumores pequenos e superficiais. A PDT é um procedimento que requer um fotossensibilizador seletivo e uma fonte de luz potente que coincide com o espectro de absorção do fotossensibilizador utilizado. *Photofrin*® é um derivado da hematoporfirina purificada e o único sensibilizador aprovado pela FDA para os testes clínico. As principais desvantagens desta medicação são: a falta de estabilidade química, fototoxicidade na pele, propriedades físico-químicas desfavoráveis e baixa seletividade com relação à absorção e retenção pelo tumor, em relação às células normais. Uma nova geração de fotossensibilizadores que inclui diversos corantes como a ftalocianina, mostrou um aumento na eficiência fotodinâmica no tratamento de tumores em animais e redução dos efeitos colaterais fototóxicos. A maioria dos estudos sugere um mecanismo de ação comum entre os diversos fotossensibilizantes que pode ser explicado por uma excitação do fotossensibilizante, pela fonte de luz, para um estado singleto ou tripleto e a destruição do tumor pela geração de espécies reativas de oxigênio singleto ou radicais livres, gerados por uma reação de transferência de energia. Os principais alvos biológico dos radicais livre e do oxigênio singleto são bem conhecidos atualmente, e são: os ácidos nucléicos, enzimas e membranas celulares. Eles são rapidamente atacados e



causam a liberação de uma ampla variedade de produtos reativos de alta patogenicidade, como as prostaglandinas, tromboxanes e leucotrienos. Ativação do sistema complemento e infiltração das células sanguíneas imunológicas na região tumoral aumentando o efeito destrutivo destes agentes agressivos e iniciam a necrose tumoral.

Sailer *et al* (1997) correlacionaram a inativação fotodinâmica da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* com a biossíntese de porfirina após incubação com ácido 5-aminolevulônico. Os autores verificaram a formação de porfirina endógena por espectroscopia de fluorescência e técnica de cromatográfica de performance líquida e sugerem que a incubação com o ácido 5-aminolevulônico aumenta o acúmulo de protoporfirinas.

Szeimies e Landthaler (1997), revisando a literatura demonstram os mecanismos envolvidos na terapia fotodinâmica, assim como suas indicações até o presente momento. A terapia fotodinâmica, segundo os autores, é uma reação de excitação de um fotossensibilizante por luz visível emitida por um laser, na presença de oxigênio que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente oxigênio

singleto citotóxico. Este oxigênio reativo produzem efeitos destrutivos em células e em tecidos vasculares. Estes efeitos tem sido utilizados para tratamento de lesões de câncer e lesões pré-cancerosas; entretanto, estudos têm demonstrado que este tratamento também pode ser efetivo em lesões vasculares e em infecções virais e bacterianas.

Walsh (1997) revisando a literatura sobre o uso dos lasers em baixa intensidade em tecidos duros, descreveu a fotossensibilização de bactérias com o uso associado de lasers em baixa intensidade e corantes apropriados para absorção ressonante do comprimento de onda específico do laser. O autor sugere que esta técnica pode ter aplicação potencial para redução bacteriana no interior de canais radiculares e bolsas periodontais como coadjuvante ao tratamento convencional.

Bhatti *et al* (1998), estudaram os possíveis mecanismos envolvidos na fotossensibilização letal de bactérias com o uso do corante azul de toluidina. Os efeitos da fotossensibilização foram avaliados pela mensuração da fluorescência de triptofano e eletroforese de proteínas. Os autores também avaliaram a influência dos radicais livres na eliminação das bactérias por fotossensibilização. Os resultados sugerem que a

fotossensibilização de *Porphyromonas gingivalis* pode envolver mudanças em proteínas e defeitos no DNA mediados por radicais livres.

Fuch e Thiele (1998), revisando a literatura analisaram o papel do oxigênio na terapia fotodinâmica em tumores na pele. Segundo os autores o oxigênio tem um papel fundamental na inativação de células, pois em áreas tumorais com hipóxia, a terapia fotodinâmica, assim como a quimio e a radioterapia não são tão eficientes como em áreas com tensão normal de oxigênio. Portanto eles concluíram que a modulação da tensão de oxigênio na área do tumor pode aumentar a efetividade da terapia fotodinâmica.

Wainwright (1998) revisando a literatura, apresentou os mecanismos de ação da terapia fotodinâmica sobre microorganismos, os diversos corantes em uso, perspectivas futuras da técnica e propôs o termo *photodynamic antimicrobial chemotherapy* (PACT) ou terapia fotodinâmica e quimioterápica antimicrobiana.

Jackson *et al* (1999) investigaram, *in vitro*, a morte microbiana da *C. Albicans* nas suas formas de levedura e hifa . Os autores utilizaram

um laser de Hélio-Neônio (comprimento de onda de 632.8 nm) de 35 mW associado ao corante azul de toluidina. Avaliou-se neste trabalho, a concentração do corante, a dose de aplicação do laser e o tempo em que o corante leva para ser absorvido pelas bactérias (tempo de pré-irradiação). Os autores concluíram que a associação entre o laser e o corante resultou em substancial morte microbiana tanto na forma de hifa quanto na de levedura. Que a morte microbiana é dose dependente, sendo, neste experimento, 42 J a dose mais efetiva e que o tempo ótimo de pré-irradiação é o de 5 minutos para a forma de levedura, pois a forma de hifa não é influenciada pelo tempo de pré-irradiação.

Kirill *et al* (2000), estudaram *in vitro*, a terapia fotodinâmica contra microorganismos oportunistas da microflora oral, associando a radiação laser ao corante azul de metileno. Os autores avaliaram concentrações de 1%, 0.1%, 0.01% e 0.001% do corante e um laser de Hélio-Neônio com intensidade de 100 mW/cm<sup>2</sup> em cultura bacteriana de *Staphilococcus sp*. Avaliou-se ainda os tempos de pré-irradiação e de irradiação. Durante a avaliação dos tempos de pré-irradiação, verificou-se que o corante a 1% foi tóxico para as amostras bacterianas, por isso esta concentração foi desprezada. Os autores concluíram que concentrações de 0.1% e

0.01% com tempo de pré-irradiação de 180 segundos e tempo de irradiação de 60 à 120 segundos apresentaram efeitos antimicrobiano nas bactérias testadas; e que o corante azul de metileno é um efetivo sensibilizante, podendo o mesmo ser associado ao laser no combate a bactérias oportunistas que causam patologias na cavidade oral.

Kawamoto *et al* (2000), estudaram, *in vivo*, o efeito antibacteriano do laser de Hélio-Neônio amarelo associado ao corante violeta cristal em abscessos subcutâneos em rato, provocados pela bactéria *Porphiromonas gingivalis*. Os autores separaram os ratos em 4 grupos. Grupo laser: cones de papel foram contaminados com a bactéria, foi adicionado 0,8 ml de corante, sofreram irradiação laser por 60 segundos e os cones foram inoculados subcutaneamente nas costas dos ratos. Grupo corante: cones de papel foram contaminados com a bactéria, foi adicionado 0,8 ml do corante e os cones foram inoculados subcutaneamente nas costas dos ratos. Grupo *Porphiromonas*: cones de papel foram contaminados com a bactéria e os cones foram inoculados subcutaneamente nas costas dos ratos e Grupo controle: Cones de papel foram molhados com solução salina estéril e também inoculados nas costas de ratos. Após uma semana, amostras dos locais onde foram inoculados os cones de

papel foram analisados histologicamente. Os resultados mostram que o grupo controle foi o que apresentou o menor grau de inflamação, seguido pelo grupo laser. O número de células inflamatórias foi grande nos grupos corante e *Porphiromonas*, foi menor no grupo laser e menor ainda no grupo controle.

Silbert *et al* (2000), avaliaram, *in vitro*, o potencial da terapia fotodinâmica em reduzir contaminação bacteriana em canais radiculares. Uma série de raízes foram preparadas por instrumentação mecânica. As raízes após serem esterilizadas foram divididas em dois grupos e contaminadas; um dos grupos recebeu intrarradicularmente uma solução de cultura da bactéria *S. mutans* e o outro grupo uma solução de cultura da bactéria *E. faecalis*. Utilizando-se um laser de diodo de InGaAsP ( $\lambda = 670$  nm e de 3.5 mW de potência) com sistema de entrega por fibra óptica de 600  $\mu$ m, associado ao corante azul de metileno; as raízes foram irradiadas por períodos de tempo que variaram de 30 a 240 segundos. Os resultados mostraram que o corante sozinho conseguiu redução bacteriana e 20%, somente a irradiação laser não alterou a população bacteriana. A irradiação laser provocou um aumento de temperatura que não foi superior

a 0,5 ° C. O corante associado a irradiação laser por 240 segundo eliminou todas as bactérias do grupo de raízes contaminados com o *S. mutans*, entretanto, o mesmo tempo de irradiação somente conseguiu eliminar 40% das bactérias dos canais contaminados com o *E. faecalis*. Os autores concluíram que a PDT pode ser um efetivo método de redução bacteriana intracanal, porém os parâmetro devem ser ajustados para que e consiga a eliminação de bactérias como o *E. faecalis*

Köning *et al* (2000), analisaram a terapia fotodinâmica com laser vermelho, sem o uso externo de corantes, contra determinadas bactérias capazes de produzir porfirinas endógenas. Os autores preconizam um novo método de redução bacteriana, baseado na fotossensibilização das porfirinas endógenas por um laser de Helio-neonio de 60 mW. As bactérias utilizadas neste estudo foram: *Propionibacterium acnes*, *Actinomices odontolyticus*, *Porphyromonas gengivalis*, *Prevotella intermédia* (uma bactéria pigmentada) e *Streptococcus mutans* (como controle). Os resultados mostram redução bacteriana de até 50% em algumas espécimes produtoras de endoporfirinas, pronunciado efeito sobre a bactéria pigmentada e nenhum efeito sobre o *Streptococcus mutans*, que não é capaz de produzir porfirinas endógenas e nem apresenta

pigmentação. Os autores, baseando-se nos resultados, preconizaram esta técnica como método terapêutico contra bactérias produtoras de endoporfirinas. Os autores nos lembram ainda que o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos torna cada vez mais importante a busca de novas formas de tratamento de infecções bacterianas e que a terapia fotodinâmica tem se mostrado uma interessante alternativa.

Dörtbudak *et al* (2001), avaliaram a descontaminação da superfície de implantes no tratamento da periimplantite. A periimplantite é considerada como sendo um processo multifatorial que envolve a contaminação bacteriana na superfícies de implantes. Os autores estudaram , *in vivo*, em 15 pacientes o uso do laser de diodo (690 nm) associado ao corante azul de toluidina (0.1%) em implantes que apresentavam sinais clínicos e radiográficos de periimplantite, através da avaliação microbiológica das culturas coletadas antes , após o uso do corante e após a aplicação do laser, das bactérias *P. gingivalis*, *P. intermédia* e *A. actinomycetemcomitans*. Os autores concluíram que a associação do corante e do laser resultou em significativa redução bacteriana nas 3 espécies pesquisadas, sendo que em nenhuma das



espécies houve total eliminação da cultura bacteriana.

Ovchinnikov e Tuchin (2001), estudaram em situações clínicas e pré-clínicas o uso da terapia fotodinâmica em microorganismos da cavidade oral, com capacidade de gerar lesões infecciosas. Os autores testaram diferentes concentrações do corante azul de metileno associado a um laser de Hélio-Neônio de 32 mW em culturas da bactéria *Staphylococcus*. Os autores concluíram que nos parâmetros utilizados neste estudo, a concentração de 0.1% do corante azul de metileno foi a concentração que apresentou os melhores resultados sem que esta concentração fosse tóxica para as bactérias ou para as células gengivais dos pacientes. Os autores preconizam, também o tempo de pré-irradiação de 3 minutos, pois, segundo eles, este tempo é clinicamente aceitável para o paciente e para o clínico e que tempo superiores a este poderiam levar a uma penetração do corante por tecidos saudáveis o que resultaria em danos aos tecidos sadios do paciente.

Ackoyd *et al* (2001) revisando a literatura, descreveram a história da fotodeteção e da terapia fotodinâmica desde a antiguidade até os dias de hoje. Mostrando a evolução dos agentes fotossensibilizantes e das

fontes de luz e apresentando o estado atual e as tendências futuras da terapia fotodinâmica.

## **4. Materiais e métodos**

Previamente à execução deste trabalho foi elaborado um projeto de pesquisa, o qual foi submetido ao Comitê de Ética do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté (ANEXO A) , tendo sido aprovado sob o parecer CEP/UNITAU nº 0175/01.

### **4.1. Espectroscopia**

Para avaliarmos qual o melhor corante para ser utilizado neste trabalho, com banda de absorção no comprimento de onda de 685 nm, amostras de alguns fotossensibilizadores (azuleno, azul de toluidina (TBO) e azul de metileno (MB), endo PTC e azuleno + endo PTC) foram analisadas por espectroscopia e suas bandas de absorção determinadas entre os comprimentos de onda de 400 a 900 nm.

## 4.2. O equipamento *laser*

O equipamento *laser* utilizado neste estudo foi um *laser* de Arseneto de Gálio Alumínio (modelo KC 611 Dentoflex, São Paulo, Brasil), comprimento de onda de 685 nm (vermelho visível), potência de 50 mW, sistema de entrega de feixe por fibra óptica de 365  $\mu\text{m}$  acoplado à ponta da peça de mão do equipamento, desenvolvida pela empresa fabricante do equipamento especificamente para este estudo.

A potência do equipamento com o uso do sistema de fibra óptica, foi reduzida para 10 mW, aferido por um detector LM -1 (Coherent, EUA), devidamente calibrado.

Os parâmetros utilizados neste estudo foram os seguintes:

Potência - 10 mW.

Intensidade aproximada – 9,6 W/  $\text{cm}^2$

Dose - 1720 J/  $\text{cm}^2$

### 4.3. O corante

O corante azuleno, é um corante natural, extraído da camomila (*Chamomilla recutita*), utilizado em xampus e loções em cosmética. O azuleno, ou camazuleno, é formado por anéis aromáticos heterocíclicos sendo sua fórmula química 7-etil - 1,4 dimetilazuleno. Sua estrutura química lhe confere a propriedade de absorção próxima ao comprimento de onda do laser de diodo utilizado neste estudo ( $\lambda = 685 \text{ nm}$ ).

Devido a alta concentração utilizada neste estudo, solução aquosa de azuleno a 25%, seu uso intracanal provoca manchamento da dentina, sendo difícil sua remoção após os cinco minutos de tempo de pré-irradiação. Foi utilizado o azuleno associado à substância química Endo PTC, um pasta composta segundo Paiva e Antoniazzi (1993) de: peróxido de uréia (10%), *tween* 80 (15%) e *carbowax* (75%). O endo PTC é uma associação de fármacos utilizada em endodontia como auxiliar ao preparo químico-cirúrgico dos canais. O peróxido de uréia é um agente oxidante e um potente antimicrobiano, quando associado aos hipocloritos alcalinos. Durante esta associação ocorre uma neutralização com a formação e liberação de oxigênio nascente. O *tween* 80 é um detergente molecular formado pela mistura de um ácido graxo ou oléico com um poliálcool

(sorbitol), resultando em um éster de oleato de sorbitol. Este éster é veiculado em polietilenoglicol. O *carb Wax* é o veículo, formando junto com o *tween* 80 um creme atóxico, que favorece a instrumentação do canal por ser um lubrificante durante o atrito da lima com a dentina.

A associação do azuleno 25% ao endo PTC é facilmente removida do canal por irrigação com solução salina ou água (remoção mecânica) ou por hipoclorito de sódio a 0,5%, favorecendo a liberação de oxigênio (remoção mecânica e química - por efervescência).

Conforme verificado na espectroscopia (ITEM 4.1), o Endo PTC não possui banda de absorção no comprimento de onda do laser utilizado neste estudo.

#### **4.4. Estudo piloto**

##### **4.4.1. Redução bacteriana em tubos de ensaio**

Dezoito tubos de ensaio contendo 1 ml do meio de cultura BHI (*brain heart infusion* – *Difco*, EUA), foram inoculados com 1 ml de suspensão de cultura da bactéria *Enterococcus faecalis* (ATCC 2992/2) e incubados por 24 horas em estufa a 37° C. Após este período, amostras foram

coletadas para que se confirmasse a contaminação dos meios de culturas. Em todas as amostras houve crescimento bacteriano.

Os meios de cultura contaminados foram irradiados por 3 minutos por um laser de ArGaAl ( $\lambda = 685\text{nm}$ ) de 50 mW. Amostras foram tomadas imediatamente após a irradiação, para avaliar-se o efeito antimicrobiano do laser em baixa intensidade. Os resultados mostraram crescimento bacteriano em todas as amostras, não evidenciando qualquer efeito antibacteriano da irradiação laser.

Os tubos de ensaio foram então divididos em 6 grupos com 3 tubos de ensaio cada, contendo 2 ml de suspensão da bactéria.

Grupo 1 - os três tubos de ensaio receberam 1 ml do corante Azuleno a 0,1% por cinco minutos. Amostras foram colhidas e em todas elas houve crescimento bacteriano. Os tubos de ensaio foram irradiados, do fundo para a abertura do tubo, com o laser de diodo de 685 nm de comprimento de onda, por um período de três minutos .

Grupo 2 - os três tubos de ensaio receberam 1 ml do corante Azuleno a 25% associado ao Endo PTC por cinco minutos. Amostras foram colhidas e em todas elas houve crescimento bacteriano. Os tubos de ensaio foram irradiados, do mesmo modo que no grupo 1, com o laser de

diodo de 685 nm de comprimento de onda, pelo mesmo período de tempo.

Grupo 3 - os três tubos de ensaio receberam 1 ml do corante azul de metileno a 0,1% por cinco minutos. Amostras foram colhidas e em todas elas houve crescimento bacteriano. Os tubos de ensaio foram irradiados, do mesmo modo que no grupo 1, com o laser de diodo de 685 nm de comprimento de onda, por três minutos.

Grupo 4 - os três tubos de ensaio receberam 1 ml do corante azul de toluidina a 0,1% por cinco minutos. Amostras foram colhidas e em todas elas houve crescimento bacteriano. Os tubos de ensaio foram irradiados, do mesmo modo que no grupo 1, com o laser de diodo de 685 nm de comprimento de onda, por três minutos .

Grupo 5 - os três tubos de ensaio receberam 1 ml da substância química Hipoclorito de Sódio a 0.5% - líquido de Dakin por oito minutos.

Grupo 6 - os três tubos de ensaio receberam 1 ml de solução salina a 0.9% por oito minutos.

Após o período de tempo de irradiação, em todos os tubos com corantes e após os oito minutos nos grupos de substâncias químicas, novas amostras foram colhidas, foram feitas as diluições e então semeadas em placas de Petri com o meio de cultura (Agar BHI –



Difco, EUA) para crescimento bacteriano por 24 horas em estufa a 37° C e posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônias (u.f.c.).

Os resultados mostraram que o corante azuleno a 25% associado ao endo PTC + irradiação *laser* foi o mais eficiente em produzir redução bacteriana, seguido pelo corante azuleno a 0,1% + irradiação *laser*, azul de metileno a 0,1% + irradiação *laser*, azul de toluidina a 0,1% + irradiação *laser* e o hipoclorito de sódio a 0,5% - líquido de Dakin. A solução salina, usada como controle, se mostrou a menos eficiente em reduzir o número de bactérias nos tubos de ensaio. (APENDICE A)

De acordo com o resultado obtido neste estudo piloto, escolheu-se o corante azuleno a 25% associado ao Endo PTC como o corante utilizado neste estudo.

#### **4.5. As amostras**

Para realização deste trabalho de pesquisa, foram utilizados 48 dentes humanos, unirradiculares, com canais retos, completa formação radicular, extraídos e armazenados em soro fisiológico para se manterem hidratados, obtidos junto ao banco de dentes da disciplina de endodontia da Universidade de Taubaté.

#### **4.5.1 Preparo das amostras**

As superfícies externas foram limpas e as coroas seccionadas com disco de carborundum, procurando padronizar o comprimento médio de trabalho das raízes. O acesso cervical foi realizado com brocas do tipo Batt em baixa rotação, o preparo dos terços cervical e médio foi realizado com brocas Gates-Glidden (Malleifer-Dentsplay, EUA) nº 2 e 3 e a instrumentação dos condutos realizada com limas tipo Kerr (Malleifer-Dentsplay, EUA).

O comprimento de trabalho foi determinado subtraindo-se um milímetro do comprimento obtido pela introdução de uma lima Kerr #10 pelo canal radicular até sua observação pelo forâmen apical.

A instrumentação para o alargamento e acesso total ao canal radicular foi realizada com limas tipo Kerr até o número 35, conforme preconizado pela técnica de Paiva & Antoniazzi (1993).

A superfície externa das raízes foram impermeabilizada com duas camadas de esmalte para unhas, para evitar a contaminação externa durante os procedimentos. Os ápices radiculares foram selados com resina composta fotoativada, Z250 (3M), cor A2.

Os dentes foram esterilizados em calor úmido - autoclave a 121<sup>o</sup> C por 15 minutos. Os demais passos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

#### 4.6. Os grupos

Trinta espécimes foram divididos, aleatoriamente, em três grupos experimentais, colocados cada um dos espécimes em uma placa de Petri estéril, forrada com gaze, embebido em solução salina para servir de leito para cada uma das raízes. Os grupos foram avaliados como segue:

- Grupo 1 - Dez raízes contaminadas com 10 µl de suspensão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 2992/2) com uma concentração de 1x10<sup>9</sup> bactérias/ml foram incubados por 24 horas. Após este período de tempo, os canais receberam 10 µl de Solução de hipoclorito de sódio a 0,5% - líquido de Dakin por 30 minutos. Amostras foram colhidas antes do uso do líquido de Dakin, para confirmar se os canais estavam contaminados e imediatamente após para se avaliar a redução bacteriana.
- Grupo 2 - Dez raízes contaminadas com 10 µl de suspensão de

*Enterococcus faecalis* (ATCC 2992/2) com uma concentração de  $1 \times 10^9$  bactérias/ml foram incubadas por 24 horas. Após este período de tempo, os dentes tiveram seus canais radiculares corados com 10  $\mu$ l do corante azuleno a 25% associado ao Endo PTC por um período de 5 minutos e irradiados com laser em baixa intensidade de ArGaAl (Dentoflex, modelo Kc 611 São Paulo – Brasil), comprimento de onda 685 nm (visível no vermelho), por 3 minutos, utilizando-se sistema de entrega por fibra óptica de diâmetro de 365  $\mu$ m. As raízes foram irradiadas pela técnica helicoidal, semelhante à utilizada para a irradiação utilizando-se os lasers em alta intensidade, sugerida por Gutknecht, isto é por movimentos helicoidais de apical para cervical, para que a ponta da fibra óptica entrasse em contato, possibilitando a irradiação de todas as paredes do canal radicular. Amostras foram colhidas antes do uso do corante, para confirmar que os canais estavam contaminados, e após o uso do corante, para avaliar se o corante se mostrou tóxico para o microorganismo, e imediatamente após a irradiação com o laser para se avaliar a redução bacteriana.

- Grupo 3 (controle) - Dez raízes contaminadas com 10  $\mu$ l de

suspensão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 2992/2) com uma concentração de  $1 \times 10^9$  bactérias/ml foram incubados por 24 horas.

Após este período de tempo amostras foram tomadas para se confirmar que os canais estavam contaminados e após 48 horas, repetiu-se o procedimento, coletando-se novas amostras.

As coletas microbiológica no interior dos canais radiculares foram realizadas com auxílio de pinça clínica e cones de papel número 30, estéreis, os quais foram mantidos no interior do canal por um período de um minuto. Cada cone de papel foi colocado em tubos de ensaio contendo solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) foram realizadas diluições seriais e as alíquotas foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura *Agar brain hert infusion* (BHI Agar). A coleta de dados foi feita por contagem de ufc após o período de 24 horas de incubação das placas de Petri em estufa à 37° C.

#### **4.6.1 Recontaminação**

Dezoito dentes preparados como descrito no item 4.6.1, foram divididos em dois grupos como segue:

- Grupo 1 – Nove dentes foram tratados como descrito no grupo 2 (grupo *laser*) do estudo anterior. Após o tratamento, os canais foram lavados com líquido de Dakin para que fosse retirada a pasta corante do interior do canal, e fechados com algodão estéril e cimento obturador do tipo *cavit*. Os dentes foram mantidos em estufa a 37° C por uma semana.
- Grupo 2 – Nove dentes foram tratados como descrito no grupo 2 (grupo *laser*) do estudo anterior, mas sem que fosse feita a irradiação com o *laser*. Após o 5 minutos com o corante no interior dos canais, estes foram lavados com líquido de Dakin para que fosse retirada a pasta corante do interior do canal, e fechados com algodão estéril e cimento obturador do tipo *cavit*. Os dentes foram mantidos em estufa a 37° C por uma semana.

Após uma semana, os dentes foram abertos, removendo-se o cimento obturador e o algodão com um explorador clínico nº 5. Novas amostras foram colhidas para se avaliar a recontaminação do canal pelas bactérias não eliminadas do interior dos túbulos dentinários.

Após coleta de todos os dados, os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância e por comparações múltiplas

pelo método de Tukey, para comparação entre os grupos avaliados. Os resultados foram considerados significantes com  $p < 0,05$ .

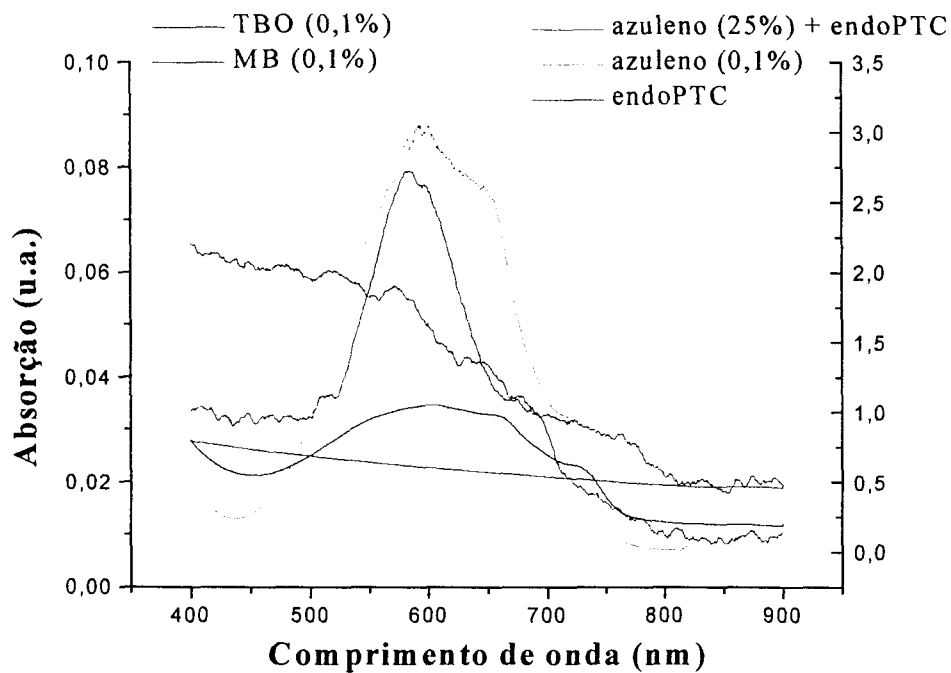
#### **4.7. Aumento de temperatura**

Com o uso destes parâmetros, foi realizada a monitoração da temperatura, com medições através de um termopar tipo K (cobre - constantan) com diâmetro de 130  $\mu\text{m}$ , no ápice radicular e no interior do canal. Nas medições no ápice dental, o termopar foi posicionado sobre uma pasta térmica (Omega) para o controle das medições de temperatura. Após este procedimento, os dentes foram corados (tempo de pré-irradiação de 5 minutos) e irradiados pela técnica helicoidal por 3 minutos. A temperatura foi monitorada em função do tempo por um amplificador (*lock in*), que recebe o sinal através de um amplificador de voltagem conectado ao termopar.

Os dados do *lock in* foram enviados a um computador, por uma interface (Lock-in SR510 - USA) em tempo real e analisados mediante interpolação gráfica realizada com o *software* Origin.

## 5. Resultados

Os resultados mostraram (Figura 1) que o corante azuleno, tanto em solução aquosa a 0,1% como a 25% associado ao endo PTC, foi o corante que melhor absorveu o comprimento de onda de 685 nm, sendo inclusive superior aos corantes encontrados na literatura (azul de toluidina 0,1% e azul de metileno 0,1%).



**Figura 1: Espectro de absorção para algumas amostras. O eixo Y da esquerda refere-se ao azul de toluidina (TBO) e azul de metileno (MB). O da direita refere-se ao azuleno + endo PTC, azuleno e endo PTC.**



Com relação à temperatura, os resultados não indicaram aumento de temperatura em nenhuma das amostras e em nenhum dos sítios de medição.

Neste estudo, analisou-se os dados referentes ao experimento feito comparando o *laser* (utilizado com o corante azuleno+endo PTC) com o líquido de Dakin. Além destes dois grupos, fez-se também um grupo controle.

Em cada grupo utilizou-se dez amostras. Estas amostras foram medidas em dois momentos diferentes: controle positivo (início) e após tratamento. O grupo *laser* também foi medido após a aplicação do corante para verificar se o uso deste sozinho provocava diminuição nas ufc.

Primeiramente comparou-se o após corante com o controle positivo do grupo *laser* e, depois disto, comparou-se os três grupos nos dois momentos analisados.

### **5.1 Efeito bactericida do corante**

Comparou-se descritivamente através de gráficos e tabelas o grupo *laser* no controle positivo com o após corante.

Na **Tabela 1** tem-se as medidas descritivas para as ufc de cada grupo e também a diferença entre os valores obtidos no após corante

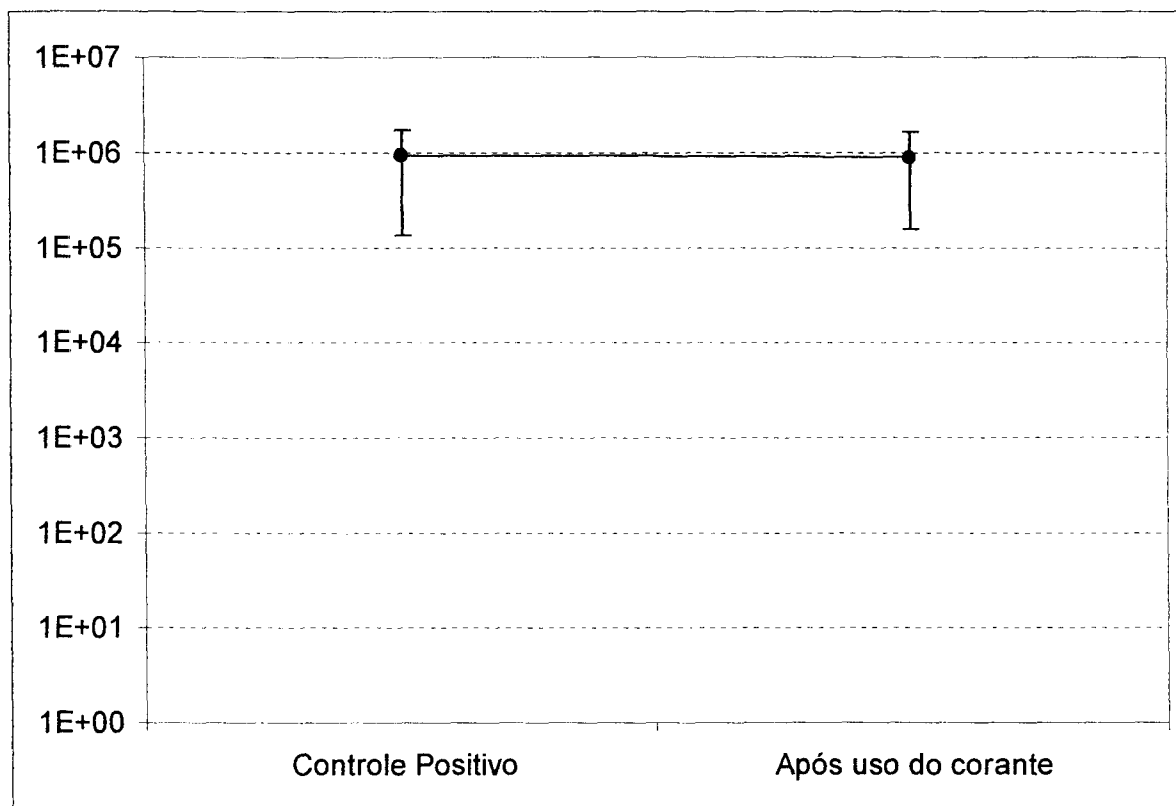
menos o controle positivo.

Na **Figura 2** tem-se as médias  $\pm$  desvios padrão dos dois momentos. Através deles pode-se observar que a diferença entre as médias dos dois grupos é pequena (44.800) e a variabilidade dentro do grupo é grande.

**Tabela 1 – Medida descritivas para a ufc/ml do grupo *laser* - Corante**

	Controle	Após uso do corante	Diferença
Média	966.000	921.200	44.800
Mediana	713.000	690.000	20.000
Desvio Padrão	828.862	759.717	266.437
Mínimo	100.000	120.000	-448.000
Máximo	2.640.000	2.260.000	660.000

**Figura 2 – Médias  $\pm$  1 desvio padrão para as ufc/ml do grupo *laser* e somente corante.**



### 5.1.1 Análise Inferencial

A análise inferencial mostrou que não existiu diferença estatística significativa entre os momentos, isto é, apenas a aplicação do corante por cinco minutos não provocou efeito bactericida.

## 5.2 Comparação entre *laser* X líquido de Dakin X controle

Comparou-se os grupos *laser* e líquido de Dakin (e também o controle), observando os valores obtidos no controle positivo e após o tratamento.

### 5.2.1 Análise Descritiva

Na tabela **Tabela 2** tem-se as medidas descritivas para as ufc/ml, na **Figura 3** tem-se as médias  $\pm$  desvios padrão dos grupos na escala logarítmica. Através deles pode-se observar que:

- No controle positivo os valores são bem próximos;
- O grupo controle ficou no mesmo patamar após o tratamento;
- O grupo *laser* foi o que apresentou a maior queda após o tratamento, com todas as amostras apresentando nenhuma ufc.

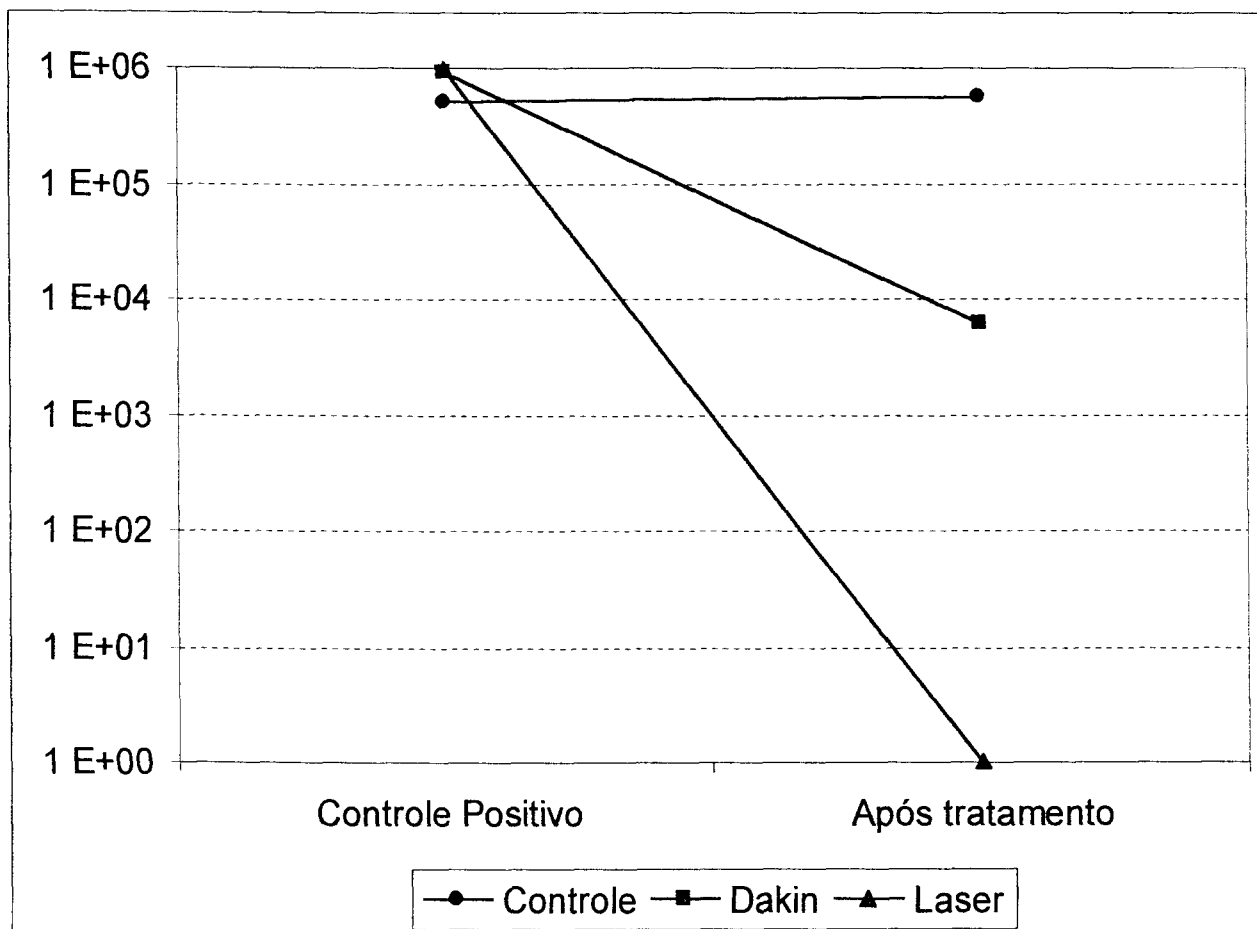
**Tabela 2 – Medidas descritivas para as ufc/ml – laser x líquido de Dakin x**

**controle**

<b>Grupos</b>	<b>Momento</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Controle</b>	<b>Controle</b>					
	<b>Positivo</b>	<b>504.300</b>	<b>470.000</b>	<b>546.952</b>	<b>4.000</b>	<b>1.640.000</b>
	<b>Após tratamento</b>	<b>538.950</b>	<b>444.000</b>	<b>455.743</b>	<b>5.000</b>	<b>1.564.000</b>
<b>Dakin</b>	<b>Controle</b>					
	<b>Positivo</b>	<b>898.000</b>	<b>789.000</b>	<b>429.679</b>	<b>240.000</b>	<b>1.720.000</b>
	<b>Após tratamento</b>	<b>6.060</b>	<b>0</b>	<b>10.466</b>	<b>0</b>	<b>33.000</b>
<b>Laser</b>	<b>Controle</b>					
	<b>Positivo</b>	<b>966.000</b>	<b>713.000</b>	<b>828.862</b>	<b>100.000</b>	<b>2.640.000</b>
	<b>Após tratamento</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Figura 3 – Médias para as ufc/ml – laser x Dakin x controle

(escala logarítmica)



### 5.2.2 Análise Inferencial

Para verificar se os grupos são diferentes ou não, utilizou-se a técnica de *Análise de Variância para medidas repetidas* com o logaritmo das ufc. Como o logaritmo de 0 não existe (na verdade ele tende a menos infinito), utiliza-se nestas amostra o valor 0, o que significa a amostra ter

apresentado 1 ufc/ml.

Para verificar quais das médias são diferentes, fizemos *Comparações Múltiplas pelo método de Tukey*, pela qual pode-se testar quais médias são diferentes. Na **Tabela 3** tem-se os níveis descritivos pelos quais pode-se ver que:

- No momento controle positivo os três grupos são iguais. Além disto o após tratamento do grupo controle, também é igual aos controles positivos;
- O após tratamento do grupo líquido de Dakin é significativamente diferente de todos os demais;
- O após tratamento do grupo *laser* é significativamente diferente de todos os demais.

**Tabela 3 – Comparações múltiplas pelo método de Tukey para o logaritmo da ufc/ml – laser x líquido de Dakin. As diferenças significativas estão hachuradas**

Grupo	Momento	Controle		Dakin		Laser	
		Controle Positivo	Após tratamento	Controle Positivo	Após tratamento	Controle Positivo	Após tratamento
Controle	Controle Positivo		0,9706	0,2887	0,0001	0,4250	0,0001
	Após tratamento	0,9706		0,7180	0,0001	0,8639	0,0001
Dakin	Controle Positivo	0,2887	0,7180		0,0001	0,9996	0,0001
	Após tratamento	0,0001	0,0001	0,0001		0,0001	0,0171
Laser	Controle Positivo	0,4250	0,8639	0,9996	0,0001		0,0001
	Após tratamento	0,0001	0,0001	0,0001	0,0171	0,0001	



### 5.3 Estudo da recontaminação após uma semana

Analisou-se os dados referentes ao experimento feito comparando o *laser* (utilizado com o corante azuleno+endo PTC) com o controle para estudo da recontaminação. Para isto, nove amostras para cada grupo foram analisadas em três momentos diferentes: controle positivo (início), tratamento e após uma semana.

#### 5.3.1 Análise Descritiva

Nas tabelas Tabela 4 tem-se as medidas descritivas para as ufc/ml, na Erro! A origem da referência não foi encontrada. 4 tem-se as médias dos grupos na escala normal e na logarítmica. Através deles pode-se observar que:

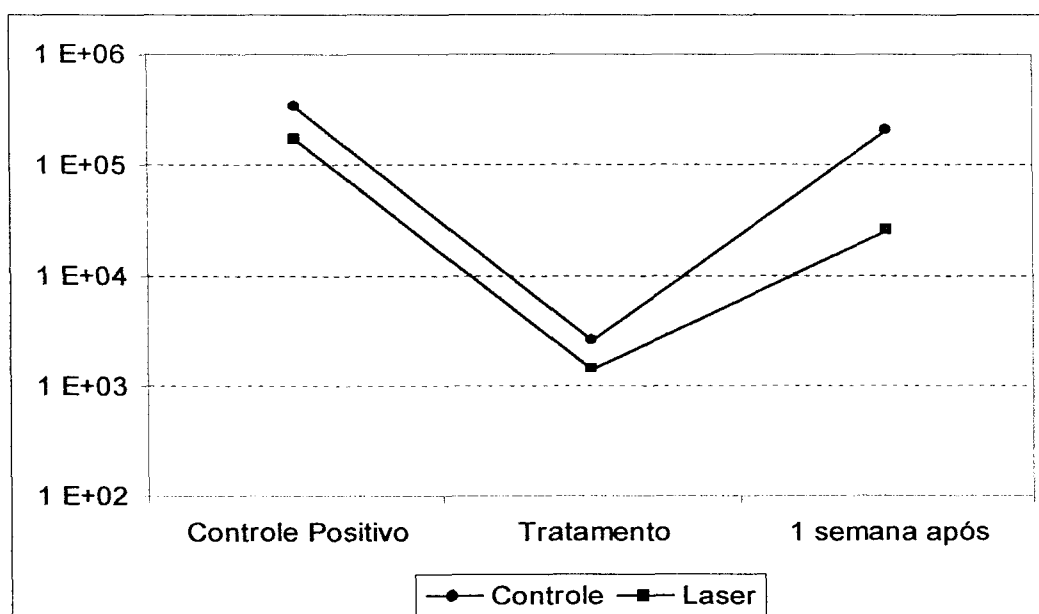
- Após tratamento, os valores foram mais baixos e uma semana após os valores subiram;
- No momento inicial aparentemente existe uma diferença entre os dois grupos (*laser* e controle);
- Observa-se pelo gráfico logarítmico que no momento inicial e após tratamento, a diferença entre os dois grupos se mantém, ou

seja, as curvas laser e controle são paralelas, e esta aumenta um pouco uma semana depois.

**Tabela 4 – Medida descritivas para as ufc/ml – Recontaminação**

Grupo	Momento	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle	Controle Positivo	345.000	130.000	438.178	5.000	1.230.000
	Tratamento	2.576	10	6.608	0	20.000
	1 semana após	205.222	50.000	387.578	0	1.200.000
Laser	Controle Positivo	174.678	60.000	347.413	905	1.090.000
	Tratamento	1.401	50	3.271	0	10.000
	1 semana após	25.851	50	53.090	0	162.000

**Figura 4 – Médias para as ufc/ml – Recontaminação**



### 5.3.2 Análise Inferencial

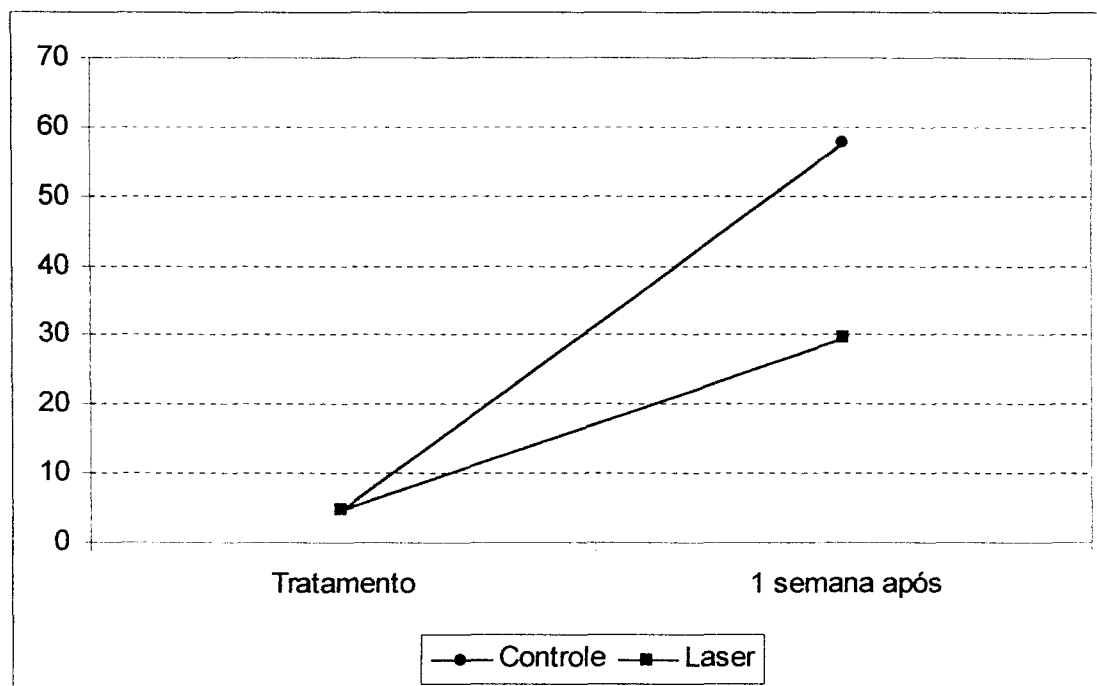
Para tentar compensar a diferença entre as médias no controle positivo (momento inicial) optou-se por analisar o percentual após tratamento e 1 semana depois em relação ao respectivo controle positivo.

Na Tabela 5 e na Figura 5 tem-se as médias dos percentuais a qual as ufc foram reduzidas e pode-se observar que no tratamento os dois percentuais são bem próximos, mas após uma semana, o controle é bem maior que o *laser*.

**Tabela 5 – Média para o Percentual de ufc/ml – Recontaminação**

Grupo	Tratamento 1 semana após	
Controle	4,59	57,76
Laser	4,62	29,66

**Figura 5 –Médias para o percentual de ufc/ml – Recontaminação**



Para verificar se os grupos são diferentes ou não, utilizou-se a técnica de *Análise de Variância para medidas repetidas* com o percentual de redução de ufc/ml. Os resultados mostraram que, apesar da diferença que observamos no gráfico acima, devido à variabilidade entre as amostras, não podemos afirmar que a diferença entre os dois grupos no momento uma semana após é significativamente maior que a diferença no tratamento.

## 6. Discussão

Os resultados obtidos no estudo piloto, quando comparou-se os corantes encontrados na literatura (azul de toluidina e azul de metileno), duas diferentes formulações do azuleno (solução aquosa de azuleno a 0,1% e solução aquosa de azuleno a 25% associado ao endo PTC), a substância química hipoclorito de sódio a 0,5% - líquido de Dakin e solução salina, mostraram que o laser associado ao azuleno foi significativamente superior em reduzir o número de colônias do *E. faecalis* quando comparado ao uso dos outros corantes associados ao laser e às substâncias químicas. Este achado, quando analisado sob o gráfico das bandas de absorção dos corantes, confirma que a banda de absorção do azuleno é ressonante com o comprimento de onda emitido pelo laser de diodo utilizado neste estudo (685 nm) e possui uma maior absorção em relação aos outros corantes, que foram utilizados na mesma concentração. Comparando-se as duas formulações do azuleno, quando o corante foi associado com o endo PTC, esta formulação apresentou maior eficiência em matar o *E. faecalis*, mostrando resultados 10 vezes superiores à solução aquosa de azuleno a 0,1%. Por esta razão, optou-se por utilizar o azuleno nesta investigação.

Os resultados encontrados quando comparou-se a terapia fotodinâmica com o controle químico (líquido de Dakin), mostrou que a irradiação laser associada ao corante azuleno em pasta, foi significativamente mais alta, apresentando redução bacteriana de 100% em todas as amostras. Os resultados do trabalho de Silbert e colaboradores com redução bacteriana utilizando o azul de metileno e o laser de He-Ne em canais radiculares contaminados com o *E.faecalis*, obteve apenas 40% de morte bacteriana com um tempo de irradiação de 240 segundos. O tempo de irradiação utilizado neste estudo foi de 180 segundos, menor do que os 240 segundos utilizados por Silbert e colaboradores, indicando maior conforto tanto para o paciente quanto para o cirurgião dentista.

A redução de 100% obtida em todas as amostras de canais radiculares contaminados com o *E.faecalis* mostra um resultados bastante favorável, visto que esta bactéria, segundo Ayhan *et al*(1999), Noda *et al* (2000), Zouain e Araj (2001)e Buck *et al* (2001), é resistente a diversos medicamentos e substâncias químicas antimicrobianas, de difícil eliminação, sendo freqüentemente encontrada no interior do canal radicular em dentes com histórico de falhas no tratamento endodôntico (Sundqvist *et al* 1998 e Peculiene 2000).

Alguns autores, como Okamoto (1992), Dobson e Wilson (1992), Silbert *et al* (2000), demonstraram que os corantes azul de metileno e azul de toluidina podem ser tóxicos para algumas culturas de bactérias, dependendo da concentração utilizada. O corante azuleno, provavelmente por ser um corante natural obtido a partir da camomila, quando em solução aquosa ou associado ao endo PTC não mostrou, nas condições deste estudo, ter efeito antibacteriano, indicando ser por terapia fotodinâmica a redução bacteriana conseguida.

A utilização da associação do corante com o endo PTC mostrou ser de fácil remoção do interior do canal, não provocando, por análise visual, manchamento na dentina, não havendo, portanto, nenhum risco de comprometimento estético para o paciente.

## 7. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que:

- A terapia fotodinâmica foi um método efetivo na redução bacteriana intracanal em canais radiculares contaminados com cultura do *Enterococcus faecalis*.
- O corante azuleno a 25% associado ao Endo PTC e ao laser de diodo ( $\lambda=685$  nm) irradiado por 3 minutos produziu redução bacteriana maior do que o conseguido pelo grupo controle e sendo estatisticamente significante em relação ao grupo Dakin.
- A associação do corante azuleno a 25% com o Endo PTC e o laser de diodo de 685 nm produziu redução bacteriana em um tempo clínico aceitável e sua remoção do canal foi efetiva, não produzindo, por análise visual, nenhum manchamento na dentina.



## APÊNDICE A

### **Resultado do estudo piloto - Redução bacteriana em tubos de ensaio.**

Neste estudo, comparou-se descritivamente através de gráficos e tabelas os grupos em análise.

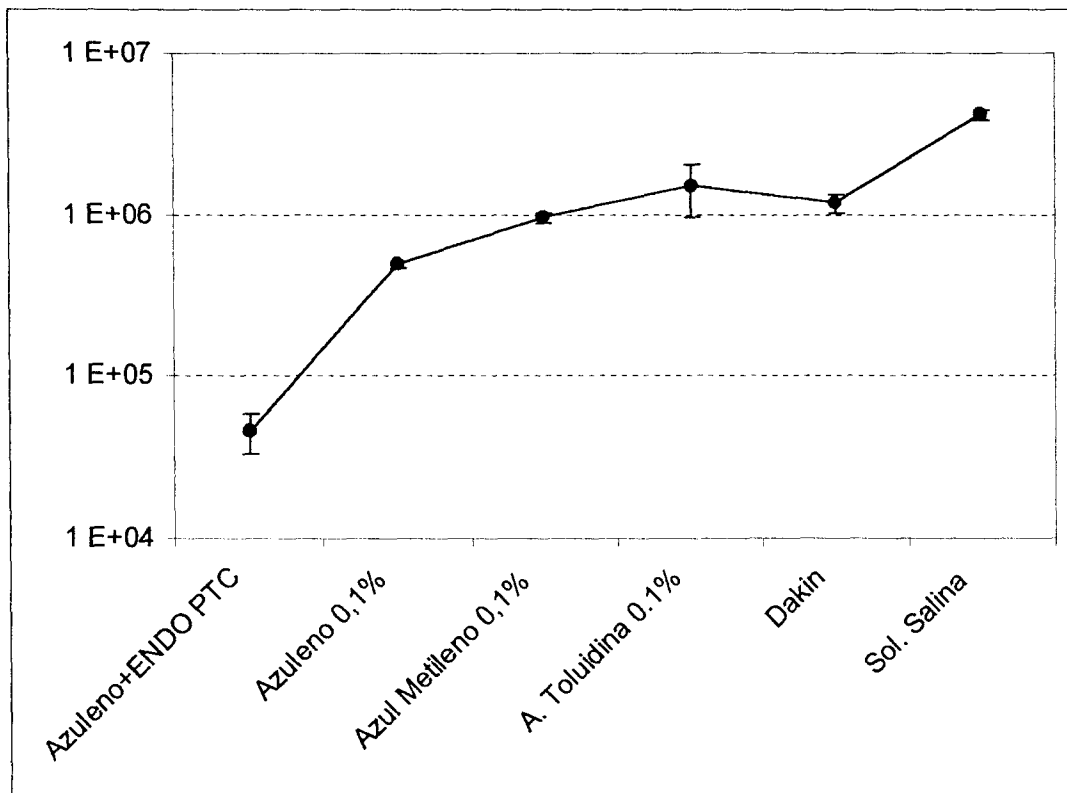
Na **Tabela A.1** tem-se as medidas descritivas para as ufc/ml. Na **Figura A.1** tem-se as médias  $\pm$  desvios padrão dos grupos na escala logarítmica. Através dele pode-se observar que:

- A solução salina foi a que apresentou menor redução, ficando com a ufc/ml muito acima dos demais;
- O melhor resultado ficou com azuleno+endo PTC que apresentou ufc/ml 10 vezes menor que a segunda maior redução;
- O grupo azul de toluidina 0,1% apresentou maior variação que os demais;
- Os grupos azul de metileno 0,1%, azul de toluidina 0,1% e líquido de Dakin não são muito diferentes entre si.

**Tabela A.1 –Medidas descritivas para as ufc/ml – Tubos de ensaio**

Grupos	Desvio				
	Média	Mediana	padrão	Mínimo	Máximo
Azuleno+endo PTC	45.667	42.000	12.897	35.000	60.000
Azuleno 0,1%	491.333	492.000	21.008	470.000	512.000
Azul Metileno 0,1%	946.667	960.000	61.101	880.000	1.000.000
A. Toluidina 0,1%	1.489.333	1.428.000	532.655	990.000	2.050.000
Dakin	1.176.000	1.208.000	162.382	1.000.000	1.320.000
Sol. Salina	4.140.000	4.000.000	260.000	3.980.000	4.440.000

**Figura A.1 – Médias  $\pm$  desvio padrão para as ufc/ml – Tubos de ensaio**



## **Análise Inferencial**

Na análise inferencial, comparou-se os grupos quanto à média das ufc/ml.

Para verificar se os grupos são diferentes ou não, utilizou-se a técnica de *Análise de Variância para um fator fixo*.

Para utilizar a técnica de forma mais adequada, fez-se uma transformação na variável em estudo (ufc). A transformação

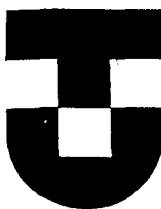
usualmente utilizada quando analisa-se bactérias é o logaritmo, pois o crescimento bacteriológico é exponencial.

Para verificar quais das médias são diferentes, fez-se *Comparações Múltiplas pelo método de Tukey*, pela qual pode-se testar quais médias são diferentes. Na **Tabela A.2** tem-se os níveis descritivos pelos quais pode-se ver que:

- o azuleno+endo PTC apresentou média significativamente diferente de todos os outros grupos, assim como o azuleno 0,1% e a solução salina;
- o azul metileno 0,1%, azul de toluidina 0,1% e líquido de Dakin não apresentaram diferença significativa entre suas médias.

**Tabela A.2 – Comparações múltiplas pelo método de Tukey para o logaritmo das ufc/ml – Tubos de ensaio. As diferenças significativas estão hachuradas.**

	<b>Azuleno+ endo PTC</b>	<b>Azuleno 1%</b>	<b>Azul de Metileno 0,1%</b>	<b>Azul de Toluidina 0.1%</b>	<b>Líquido de Dakin</b>	<b>Sol. Salina</b>
<b>Azuleno+endo PTC</b>		<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
<b>Azuleno 1%</b>	<b>0,0000</b>		<b>0,0161</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0019</b>	<b>0,0000</b>
<b>Azul de Metileno 0,1%</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0161</b>		<b>0,1901</b>	<b>0,7783</b>	<b>0,0000</b>
<b>A. Toluidina 0.1%</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,1901</b>		<b>0,8168</b>	<b>0,0003</b>
<b>Líquido de Dakin</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0019</b>	<b>0,7783</b>	<b>0,8168</b>		<b>0,0001</b>
<b>Solução Salina</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0001</b>	



UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

AUTARQUIA MUNICIPAL DE REGIME ESPECIAL

RECONHECIDA PELO DEC. FED. Nº 78.924/76

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

R. Visconde do Rio Branco, 210 - CEP 12020-040 - Taubaté - SP - Brasil

Telefones: Gabinete (012) 225-4217 - Telefax (012) 232-2947 - Secretaria (012) 225-4151 e 225-4218 - e-mail: prppg@prppg.unitau.br

---

## DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa, de responsabilidade do pesquisador Aginaldo Silva Garcez Segundo, **Redução bacteriana intracanal através da técnica *Lethal Laser Photosensitization* comparado com o método tradicional de preparo químico-mecânico dos canais radiculares (Registro CEP/UNITAU nº 0175/01)**, foi analisado por este Comitê de Ética em Pesquisa em reunião de 14 de setembro de 2001 e considerado **aprovado**.

Taubaté, 17 de setembro de 2001.

Profª Drª Maria Júlia Ferreira Xavier Ribeiro

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté

## Referências Bibliográficas

1. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):39-47.
2. Ackroyd, R., kelty, C., Brown, N., Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2001 Feb;74(5): 656-669.
3. Arakane, K., Ruy, A., Hayashi, C., Masunaga, T., Shinmoto, K., Mashiko, S., nagano, T., Hirobe, M. Singlet oxigen generation from coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on irradiation. *Biochemoical and Biophysical Research Communications* 1996; 223: 578-582
4. Ayhan, H., Sultan, N., Cirak, M. Ruhi, M.Z., Bodur, H. Antimicrobial effects of varius endodontic irrigants on selected microorganisms. *Intern. Endod. J*. 1999; 32(2) 99-102
5. Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by *Porphyromonas gingivalis* and the mechanism of lethal photosensitization. *Photochem Photobiol*. 1998 Sep;68(3):370-6.

6. Buck, R.A., Eleazer, P.D., Staat, R.H., Scheetz, J.P. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J. Endod.* 2001 mar; 27(3) 206-8
7. Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *J Med Microbiol.* 1993 Jun;38(6):401-5.
8. Dahlen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol.* 2000 Oct;15(5):309-12.
9. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *J Endod.* 1999 May;25(5):351-3.
10. Dicuonzo G., Gherardia G., Lorinob G., Angelettia S., Battistonia F., Bertuccinic L., Cretid R., Di Rosae R., Vendittie M., Baldassarric L. Antibiotic resistance and genotypic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of *Enterococci*. *FEMS Microb. Letters* 2001 July; 201(2); 205
11. 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.



12. Dortbudak O, Haas 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.
13. Fuchs J, Thiele J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med.* 1998 Mar 15;24(5):835-47.
14. Gow-Soares, S., Gutknecht, N., Conrads, G., Matson, E., Eduardo, C.P. The bactericidal effect of Ho:YAG laser irradiation within contaminated root dentinal samples. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 2000; Apr: 18(2) 81-7
15. Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in in vitro root canals. *J Clin Laser Med Surg.* 1996 Apr;14(2):77-80.
16. Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg.* 2000 Apr;18(2):57-60.
17. 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.

18. Henry CA, Judy M, Dyer B, Wagner M, Matthews JL. Sensitivity of Porphyromonas and Prevotella species in liquid media to argon laser. Photochem Photobiol. 1995 Apr;61(4):410-3.
19. Ivanov K.N., Titorenko V.A., Shoub G.M., Lepilin A.V., Ovchinnikov I.S., Mischenko O.S., Tuchin V.V. Photodynamic action of laser radiation and methylene blue on some opportunistic microorganisms of oral cavity. Lasers in Dentistry 2000 vol. 3910: 30-4
20. Jackson Z., Meghji S., MacRobert A., Henderson B., Wilson M. Killing of the yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light-activated antimicrobial agent. Lasers Med Sci. 1999 Spring; 14; 150-157.
21. Kawamoto K., Senda N., Shimada K., Ito K. Hirano Y., Murai S. Antibacterial effect of yellow He-Ne laser irradiation with crystal violet solution on *Porphyromonas gingivalis*: an evaluation using experimental rat model involving subcutaneous abscess. Lasers Med. Sci. 2000 Mar; 15; 257-62
22. Kimura Y, Yonaga K, Yokoyama K, Kinoshita J, Ogata Y, Matsumoto K. Root surface temperature increase during Er:YAG laser irradiation of root canals. J Endod. 2002 Feb;28(2):76-8.

23. Ivanov KN, Titorenko VA, Shoub GM, Lepilin AV, Ovchinnikov IS, Mischenko OS, Tuchin V. Photodynamic action of laser radiation and methylene blue on some opportunistic microorganisms of oral cavity. Lasers in Dentistry VI – Proceedings of SPIE 2000 vol. 3910: 30-34
24. Konig K, Teschke M, Sigusch B, Glockmann E, Eick S, Pfister W. Red light kills bacteria via photodynamic action. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2000
25. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. J Endod. 1999 Mar;25(3):167-71.
26. Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. J Endod. 2001 Oct;27(10): 616-9.
27. Love R. M. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. Int. Endod. J. 2001 Jan; 34(1): 399-405
28. Mehl A, Folwaczny M, Haffner C, Hickel R. Bactericidal effects of 2.94 microns Er:YAG-laser radiation in dental root canals. J Endod. 1999 Jul;25(7):490-3.

29. Moritz, A., Gutknecht, N., Goharkhay, K., Schoop, U., Wernisch, J., Speer, W. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int.* 1997 Mar;28(3):205-9.
30. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990 Dec;16(12):580-8.
31. Noda M, Komatsu H, Inoue S, Sano H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2000 Apr;26(4):221-4.
32. Ochsnera, M. Photophysical and photobiological process in the photodynamic therapy of tumors. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1997 May 39(1): 1-18
33. Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg Med.* 1992;12(4):450-8.

34. Ovchinnikov I.S., Tuchin V.V. Photodynamic action on some pathogenic microorganisms of oral cavity. ECBO 2001.
35. Paiva J.G e Antoniazzi J.H Endodontia. Bases para a prática clínica. Segunda edição. Artes Médicas - São Paulo 1993
36. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000 Oct;26(10):593-5.
37. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. J Endod. 2001 Feb;27(2):76-81.
38. Reit C, Molander A, Dahlen G. The diagnostic accuracy of microbiologic root canal sampling and the influence of antimicrobial dressings. Endod Dent Traumatol. 1999 Dec;15(6):278-83.
39. Sailer R., Strauss W.S.L., König K., Rück A., Steiner R. Correlation between porphyrin biosynthesis and photodynamic inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* after incubation with 5-aminolaevulinic acid. J. Photchem. Photobiol. B. 1997 Dec; 39; 236-42

40. Sarkar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 1993 May;28(3):204-10.
41. Silbert, T.; Bird P.S.; Milburn, G.J. ; Walsh, L.J. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization. *J. Dent. Res.* 2000 (IADR abstrats) 79 : 569
42. Siqueira Jr., J.F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International Endod. J.* 2001 34: 1-10
43. Siqueira JF Jr, Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod.* 1997 Aug;23(8):499-502.
44. Siqueira Junior JF, Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M; Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999 May;25(5):332-5
45. Siqueira Junior JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2000 Jun;26(6):331-4.

46. Siqueira Jr., J.F, Uzeda, M. Disinfection by calcium hydroxide paste of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J. Endod.* 1996 Dec; 22 (12) 674-6
47. Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996;18(3):253-9.
48. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jan;85(1):86-93.
49. Szeimies, M.R., Landthaler, M. Photodynamic therapy. *J. Europ. Academ. Dermatol. Venerol.* 1997; Sep 9(1): 73
50. Tanriverdi F, Esener T, Erganis O, Belli S. An in vitro test model for investigation of disinfection of dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 1997;8(2):67-72.
51. Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod.* 2001 Jun;27(6):401-3.

52. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998 Jul;42(1):13-28.
53. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J.* 1997 Oct;42(5):302-6.
54. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol.* 1993 Oct;75(4):299-306.
55. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995 May;78(5):569-74.
56. Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Curr Microbiol.* 1992 Aug;25(2):77-81
57. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol.* 1993 Jun;8(3):182-7. Nov;46(7):1297-303.



58. Wilson M, Pratten J. Lethal photosensitisation of *Staphylococcus aureus* in vitro: effect of growth phase, serum, and pre-irradiation time. *Lasers Surg Med.* 1995;16(3):272-6.

59. Zouain M. G., Araj G.F. Antimicrobial resistance of *Entrococci* in Lebanon. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2001 March; 17(3):209-13



M22587



***Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares***  
**Diretoria de Ensino & Informação Científica e Tecnológica**  
**Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 Cidade Universitária CEP: 05508-000**  
**Fone/Fax(0XX11) 3816 - 9148**  
**SÃO PAULO - São Paulo - Brasil**  
**[http: //www.ipen.br](http://www.ipen.br)**

O Ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, e associada à Universidade de São Paulo.