



Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO MICROBIANA EM CONDUTOS
RADICULARES CONTAMINADOS COMPARANDO TRÊS
TÉCNICAS DE IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA
POTÊNCIA ASSOCIADO A FOTOSSENSIBILIZADOR**

FLAVIA MISKEY CAVALHEIRO

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

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-orientadora:
Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares

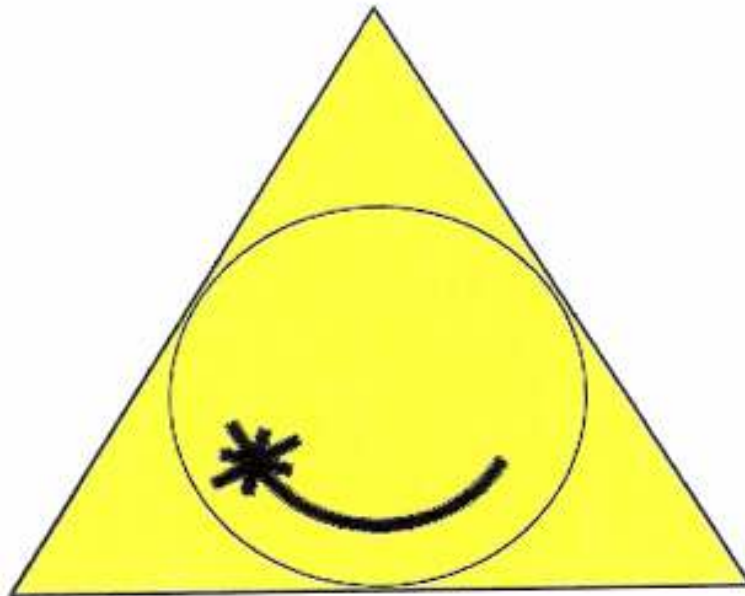
São Paulo
2007



Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

MESTRADO PROFISSIONALIZANTE

LASER EM ODONTOLOGIA



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO MICROBIANA EM CONDUTOS
RADICULARES CONTAMINADOS COMPARANDO TRÊS TÉCNICAS
DE IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO A
FOTOSSENSIBILIZADOR**

FLAVIA MISKEY CAVALHEIRO

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

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

Co-orientadora:
Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares

São Paulo
2007

DEDICATÓRIA

Dedico esta trabalho aos meus pais, pelo incentivo, apoio e Amor incondicional, sempre.

Ao meu querido irmão.

Às VTPanas. Pela amizade e carinho.

Às “meninas da especialização”, Carol, Fernanda, Milene e Luciana.

Aos colegas da APCD.

Ao meu amor, João.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro pela orientação, dedicação e disponibilidade. Agradeço a oportunidade e privilégio de ser sua orientada. Obrigada pela paciência, carinho e amizade.

Agradeço à Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares pela co-orientação.

Profa. Dra. Silvana Cai, obrigada pela orientação, disponibilidade e carinhosa receptividade em seu laboratório.

Obrigada aos professores do curso do IPEN , FOUSP e alunos.

Ao colega Renata Araújo Prates pela ajuda no decorrer deste trabalho

Ao colega Carmo Aun, pela disponibilidade e gentileza.

A amiga Priscila Cambria pela colaboração.

Andréa Malavazi do IPEN, Lili e Joelma do LELO, obrigada pela eficiência e carinho.

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO BACTERIANA EM CONDUTOS RADICULARES
CONTAMINADOS COMPARANDO TRÊS TÉCNICAS DE IRRADIAÇÃO COM
LASER DE BAIXA POTÊNCIA ASSOCIADO A FOTOSSENSIBILIZADOR**

FLÁVIA MISKEY CAVALHEIRO

RESUMO

O objetivo do tratamento endodôntico é sanificar e modelar o canal radicular. Um dos grandes obstáculos para o sucesso do tratamento é reduzir o biofilme intracanal. O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram positiva anaeróbia facultativa freqüentemente encontrada em retratamentos endodônticos. Este estudo, *in vitro*, compara três técnicas de irradiação intracanal para redução de *E. faecalis* utilizando a terapia fotodinâmica. Foram utilizados 51 dentes unirradiculares humanos, inoculados com *E. faecalis* e incubados durante 14 dias. Foram divididos randomicamente em 3 grupos de 16 dentes cada. Os canais foram preenchidos com azul de metileno a 0,005% e após 2 minutos de pré-irradiação foram irradiados durante 3 minutos utilizando um laser de emissão vermelha, modo contínuo, potência de 15 mW, $\lambda=660$ nm. No grupo helicoidal (GH) foi utilizada a irradiação com movimentos helicoidais ápico-cervicais utilizando-se fibra óptica; no grupo estacionário (GE) também foi utilizada a fibra óptica em 3 pontos de cada terço do canal, que foi irradiado por 1 minuto; no grupo onde não foi utilizada a fibra óptica (GSF), a ponteira do laser ficou durante 3 minutos na entrada do conduto na região coronária. Após irradiação, os espécimes tiveram suas raízes seccionadas em 3 partes, separando os terços apicais, médios e cervicais. Posteriormente, foi realizada a diluição e semeadura. Os resultados foram analisados estatisticamente segundo teste ANOVA. Todos os grupos comprovaram a eficácia da PDT em promover redução bacteriana. No terço cervical, GE apresentou uma redução significativamente maior comparado aos grupos GH e GSF. Estes resultados indicam que a PDT intracanal é eficiente em eliminar *E. faecalis* independente da técnica de irradiação utilizada.

**ASSESSMENT OF BACTERIAL REDUCTION IN CONTAMINATED ROOT
CANALS COMPARING THREE IRRADIATION TECHNIQUES WITH LOW POWER
LASER ASSOCIATED WITH A PHOTOSENSITIZER. AN *IN VITRO* STUDY**

FLÁVIA MISKEY CAVALHEIRO

ABSTRACT

The aim of endodontic treatment is to sanitize and to model the root canal. One of the great obstacles to successful treatment is to reduce intracanal biofilm. *Enterococcus faecalis* is a facultative anaerobic Gram positive bacterium frequently found in endodontic re-treatments. This in vitro study compares three intracanal irradiation techniques for reducing *E. faecalis* by using photodynamic therapy. Fifty-one human uniradicular teeth were used, inoculated with *E. faecalis* and incubated for 14 days. They were randomly divided into 3 groups of 15 teeth each. The canals were filled with methylene blue at 0.005% and after 2 minutes of pre-irradiation, they were irradiated for 3 minutes, using a red emission laser, in continuous mode, at power 15 mW, $\lambda=660$ nm. In the helicoidal group (GH) irradiation was performed with helicoidal movements apico-cervical direction using fiber optic; in the stationary group (GE) fiber optic was also used at 3 points in each third of the canal, which was irradiated for 1 minute; in the group in which fiber optic was not used (GSF), the laser tip remained at the canal inlet in the coronary region for 3 minutes. After irradiation, the specimen roots were sectioned into 3 parts, separating the apical, middle and cervical thirds. Afterwards dilution and seeding were performed. The results were statistically analyzed by the ANOVA test. All the groups proved the efficacy of PDT in producing bacterial reduction. In the cervical third, GE present a significantly greater reduction in comparison with groups GH and GSF. These results indicate that intracanal PDT is efficient for eliminating *E. faecalis*, irrespective of the irradiation technique used.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipos de Cultura)
CRT	Comprimento Real de Trabalho
E	energia
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA-T	ácido etileno diamino tetra acético e detergente tergentol
GaAlAs	arseneto de gálio e alumínio
GE	grupo da técnica helicoidal
GH	grupo da técnica estática
GSF	grupo da técnica sem fibra
He-Ne	Hélio-Neônio (laser com emissão em $\lambda=632,8$ nm)
J/cm ²	joules por centímetros quadrados
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LILT	Low Intensity Laser Therapy
LLLT	Low Level Laser Therapy
Maser	Microwave amplified by stimulated emission of radiation)
mm	milímetro
NaOCl	hipoclorito de sódio
PDT	Photodynamic Therapy (Terapia fotodinâmica)
PQC	Preparo Químico Cirúrgico
TAP	Técnica da Ampliação Progressiva
TPI	tempo de pré-irradiação
ufc/mL	unidades formadoras de colônia por mililitro

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. MICROBIOTA ENDODÔNTICA.....	13
3.2. TERAPIA FOTODINÂMICA EM ENDODONTIA.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. PREPARO DAS AMOSTRAS.....	22
4.2. PREPARO DO INÓCULO E INCUBAÇÃO.....	24
4.3. INOCULAÇÃO.....	25
4.4. IRRADIAÇÃO.....	25
5 RESULTADOS	29
5.1. TÉCNICA HELICOIDAL.....	29
5.2. TÉCNICA ESTACIONÁRIA.....	30
5.3. TÉCNICA SEM FIBRA.....	31
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÕES	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica tem por objetivo sanar as patologias pulpare e periapicais para o reestabelecimento do elemento dental nas funções do sistema estomatognático.

O sucesso do tratamento endodôntico depende de uma seqüencia de procedimentos e que estão intimamente relacionados. Uma criteriosa fase de acesso cirúrgico que possibilita o instrumento endodôntico alcançar todas as paredes do canal, passando pela fase de desinfecção e modelagem que preconiza modelar, limpar e desinfetar o canal radicular até a fase de obturação, promovendo o vedamento hermético do conduto (Paiva & antoniazzi, 1988).

O procedimento procura preencher todos os requisitos necessários para alcançar um prognóstico favorável: preparo cônico afunilado sem a modificação da posição do forame apical (Schilder, 1974), remoção de bactérias e restos teciduais, alisamento das paredes e aumento da permeabilidade dentinária com o auxílio de substâncias químicas irrigadoras que favorecem a descontaminação microbiana e o acesso do cimento obturador.

A falha na terapia endodôntica, entre outras causas, é a persistência de infecção no sistema de canais radiculares por bactérias que recolonizam os túbulos dentinários, já que não são acessíveis pelo preparo químico-cirúrgico, pela defesa do hospedeiro ou pela medicação via sistêmica de agentes antimicrobianos. A descontaminação e redução microbiana são favorecidas na luz do canal podendo permanecer cepas de bactérias capazes de sobreviver em ambientes de anaerobiose no sistema de canais radiculares, tais como canais acessórios, laterais e secundários.

O *Enterococcus faecalis* possui importante papel no insucesso da terapia endodôntica. É frequentemente encontrado em lesões periapicais crônicas de retratamentos endodônticos (Sundqvist *et al.*, 1998; Molander *et al.*, 1998; Love, 2001), no entanto, apesar de ser Gram-positivo facultativo, faz parte da flora inicial que será dominada por espécies Gram-negativas.

A virulência do *E.faecalis* foi relacionada à sua resistência à medicação intracanal (Byström & Sundqvist, 1985; Orstavik&Haapasalo, 1990; Chong & Pitt Ford, 1992; Peters, 1995) e à habilidade de sobrevivência em canais radiculares como um único organismo sem o suporte de outra bactéria (Fabricius *et al.*, 1982).

Com o propósito de limpar toda a extensão do canal radicular e promover sua desinfecção, os lasers têm papel coadjuvante à terapia convencional na redução microbiana.

O uso de diferentes tipos de lasers de alta potência em endodontia apresenta ação térmica e promove efeito bactericida com possível modificação da superfície dentinária do canal radicular, utilizando o laser de diodo, Nd:YAG e Er:YAG (Gutknecht *et al.*, 2000; Moritz *et al.*, 1999). Estas alterações dependem do protocolo utilizado segundo o efeito desejado pelo operador.

Existem riscos associados à utilização dos lasers de alta potência quando indevidamente utilizados. O fator térmico deve ser muito bem controlado para não causar injúrias aos tecidos dentais e vizinhos, tais como carbonização da dentina, promoção de anquilose, derretimento de cimento, reabsorção radicular e necrose perirradicular (Hardee, 1994).

Uma alternativa para o uso dos lasers de alta potência na redução microbiana é a terapia fotodinâmica, também conhecida como PDT (*Photodynamic Therapy*). Esta terapia propõe a associação de um agente fotossensibilizante, geralmente exógeno, e

uma fonte de luz com comprimento de onda ressonante à banda de absorção do fotossensibilizador, com a finalidade de promover redução microbiana sem a ação térmica. Neste caso, o microorganismo morre por dano oxidativo.

Qualquer fonte de luz pode ser utilizado para esta finalidade. Considerando a utilização do laser de baixa potência, como o He-Ne e GaAlAs, são utilizados para esta finalidade quando emitem luz em baixa intensidade, na ordem de W/cm^2 . Seu uso não produz efeito térmico, pois a variação de temperatura é aproximadamente $0,5^\circ C$ (Garcez, 2002). Estes lasers são utilizados como fonte de luz associados a corantes que possuem banda de absorção ressonante com seu comprimento de onda. O mecanismo de ação ocorre quando os fótons da fonte emissora são absorvidos pelo agente fotossensibilizante que muda a configuração eletrônica, passando para um estado excitado. Na presença de um substrato (principalmente o oxigênio), o corante quando retorna ao estado fundamental transfere energia para o substrato, produzindo espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, o oxigênio singleto. O oxigênio singleto pode causar morte celular por oxidação (Ribeiro, Zezell, 2004).

O efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica vem sendo estudado há alguns anos na endodontia e os estudos mostram bons resultados na redução de diferentes microorganismos (Dobson, Wilson, 1992), (Sibert *et al.*, 2000), (Walsh, 1997), (Garcez, 2006), (Seal *et al.*, 2002).

A literatura oferece procedimentos coadjuvantes para a terapêutica endodôntica (Kairalla, 2006), (Garcez, 2006), (Dobson *et al.*, 1992), (Bonsor *et al.*, 2005). A tecnologia laser é utilizada com fonte de luz na terapia fotodinâmica e apresenta destaque devido à eficiência na redução microbiana. Devemos aprimorar os protocolos para potencializar a sanificação dos canais radiculares. Como a literatura não apresenta um consenso para a irradiação intracanal, este trabalho visa avaliar

diferentes técnicas de irradiação buscando o melhor método para redução bacteriana em canais contaminados.

2. OBJETIVOS

- Avaliar, *in vitro*, a redução microbiana em canais radiculares contaminados com *E.faecalis*, utilizando laser em baixa intensidade de emissão vermelha em $\lambda = 660$ nm associado ao fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 0,005%, utilizando três técnicas de irradiação.
- Comparar três diferentes técnicas de irradiação intracanal: técnica helicoidal e técnica estacionária, utilizando fibra óptica para acesso do canal, e irradiação sem fibra na superfície da coroa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microbiota Endodôntica

O tratamento endodôntico possui limitações que prejudicam o sucesso da terapia. É comum depararmos com dificuldades durante o ato químico-cirúrgico, como variações anatômicas, calcificações e atresia dos canais. Estas dificuldades inviabilizam o adequado preparo químico-cirúrgico e possibilita a reinfecção bacteriana.

Eduardo e Gouw-Soares (2001) relatam a presença de microorganismos no canal radicular mesmo depois da terapia instituída frente às dificuldades encontradas em sua execução.

Sundqvist *et al* (1998) também associam o insucesso de tratamentos com fatores desfavoráveis ou falhas na execução da terapia endodôntica; relatam que em tratamentos de dentes desvitalizados com lesão periapical e em retratamentos o índice de sucesso não ultrapassa 74%.

A reinfecção endodôntica também é viável pela inadequada obturação dos canais radiculares, mesmo realizando satisfatória redução microbiana (Peters *et al*, 1995).

As bactérias Gram positivas facultativas anaeróbicas são destaque na infecção de lesões periapicais de tratamentos endodônticos. Microorganismos entéricos, especificamente os *E.faecalis* são os mais resistentes às terapias inclusive com o emprego de medicação intracanal, com por exemplo o hidróxido de cálcio, devido a resistência ao pH alcalino que este medicamento induz, Siqueira Jr, 1997.

Estudos de Haapasalo e Orstavik (1987) demonstram que *Enterococcus faecalis* recolonizaram o sistema de canais mesmo depois de uma adequada desinfecção.

Ferrari (2001) detectou espécies de enterococos, enterobactérias e leveduras nas diferentes fases da terapia endodôntica. Concluiu que os Enterococos foram os mais resistentes à terapia instituída.

Gomes *et al* (2004) averiguaram, em dentes não tratados endodonticamente mas com lesão periapical, a presença de microflora mista, composta por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, anaeróbia em sua maioria, e usualmente contendo mais de três espécies. Em contrapartida, a microflora encontrada em dentes com insucesso endodôntico apresenta predominância de bactérias facultivas anaeróbias e Gram-positivas, predominando 1 a 2 espécies por canal.

Sundqvist (1992), num estudo *in vivo* realizado em 65 dentes, caracterizou a microbiota intracanal como sendo 90% bactérias anaeróbias.

Love, em 2001, relatou a capacidade de sobrevivência dos *Enterococcus faecalis* em dentes desinfetados, logo após o PQC, devido ao poder de adaptação ao suplemento de reserva de nutrientes presentes nos túbulos dentinários, sendo encontrado posteriormente à obturação dos canais.

Sedgley *et al* (2005) inocularam em 150 dentes unirradiculres *Enterococcus faecalis* e após 12 meses, as bactérias “sepultadas” pelas obturações dos canais continuaram viáveis mesmo sem nutrição adicional.

Peciulienė *et al* (2000) num estudo *in vivo* verificaram a presença da bactéria *E.faecalis* em dentes tratados endodônticamente e com presença de lesão periapical. Foram analisados 25 dentes assintomáticos dos quais 20 apresentavam bactérias, sendo que destes 20 dentes 14 possuíam presença de *E.faecalis*. Os autores re-instrumentaram os dentes e irrigaram com hipoclorrito de sódio à 2,5% e EDTA. Dos

20 dentes com cultura positiva, apenas 7 apresentaram infecção bacteriana sendo 5 deles com *E.faecalis*.

Em 2000, Noda *et al* avaliaram, *in vivo*, a ação dos antibióticos em bactérias provenientes de canais com exsudato caudados por periodontite apical. Doze espécies bacterianas foram identificadas, o *E.faecalis* foi a mais comum e a mais resistente aos diversos tipos de antibióticos, especialmente às cefalosporinas.

Peters *et al* (2001) analisaram a presença de bactérias em 3 profundidades de dentina, em raízes de dentes que apresentavam lesões periapicais. As amostras colhidas localizam-se entre as paredes do canal e o cimento. As culturas microbiológicas apresentaram 77% das amostras das paredes dos canais, 87,5% das amostras intermediárias de dentina e em 62% das amostras de dentina próximas ao cimento.

Dahlen *et al* (2000) testaram a susceptibilidade do *Enterococcus faecalis* a diversos antibióticos. Foram avaliados 29 dentes com infecção endodôntica persistente e previamente tratados com medicação intra-canal de hidróxido de cálcio entre sessões. 73% das amostras apresentaram cultura positiva para o *E.faecalis*, sendo sensíveis à vancomicina e à eritromicina, mas resistentes aos outros antibióticos. A medicação sistêmica aumentou a resistência microbiana. A sensibilidade reduzida do *Enterococcus spp* a agentes antimicrobianos via sistêmica, contribui para o insucesso do tratamento endodôntico.

Siqueira *et al* (1998) avaliaram 7 soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio à 0,5%, 2,5%, e 4,0%; digluconato de clorexidina à 0,2% e 2,0%, ácido cítrico à 10% e EDTA à 17%.) em 4 tipos de bactérias com pigmentos negros Gram negativas anaeróbicas e 4 tipos anaeróbicas facultativas (*Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Enterococcus faecalis*,

Streptococcus mutans, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus sobrinus*). Todas as soluções mostraram zonas inibitórias em todas as culturas bacterianas. As soluções que mostraram melhor resultado foram as de maiores concentrações. Devemos considerar a efetividade da concentração da solução irrigadora em função ao tempo de contato com o dente.

Pinheiro *et al* (2003) avaliaram 30 dentes com tratamento endodôntico há mais de 4 anos com presença de lesão periapical. Foram isoladas 55 espécies bacterianas, sendo 80% Gram-positivas e 58% anaeróbias facultativas. A espécie mais isolada foi a de *E.faecalis*. Os autores concluíram que em casos de insucesso endodôntico com presença de lesão periapical, a microbiota é predominantemente Gram positiva.

Möller *et al* (2004) inocularam 4 tipos de bactérias em 160 canais de dentes de macacos (*Streptococcus milleri*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis* e *Fusobacterium nucleatum*), e outros 24 canais com *Enterococcus faecalis* e *S. Milleri*. Após 12 meses, com os dentes apresentando lesões periapicais, realizaram retretamento endodôntico em duas sessões e foram coletadas amostras antes e depois do preparo químico-mecânico. As bactérias facultativas anaeróbicas apresentaram mais resistentes ao tratamento que as anaeróbicas.

O biofilme é um mecanismo de resistência bacteriana da qual o *E.faecalis* participa. É um ecossistema envolto por matriz polissacarídea, organizada com canais de água para nutrição e excreção. Distel *et al* (2002) analisaram a capacidade do *Enterococcus faecalis* como formador de biofilme. Utilizaram 46 raízes, deixaram seus ápices imersos em meio de cultura BHI (infusão de cérebro e coração), bolinhas de algodão inoculadas com *E.faecalis* foram colocadas dentro dos espécimes que estavam medicados com hidróxido de cálcio. Após clivados, utilizando MEV (microscopia eletrônica de varredura) observou-se microorganismos na parede do

canal. Utilizando MCLV (microscopia laser confocal de varredura), após 160 dias, observou-se biofilme organizado em forma de “cogumelo”, com espessura de 21 a 30 μm . A viabilidade bacteriana foi de 90%. Os autores salientam que a estrutura física do biofilme pode proporcionar trocas genéticas entre os indivíduos podendo aumentar assim a virulência. George *et al* (2005) estudaram as características do biofilme em condições de anaerobiose, aerobiose, ambiente com e sem nutrição. O biofilme atingiu maior espessura quando o *E. faecalis* foi incubado em aerobiose e em ambiente com nutrição. O tempo de incubação foi de 21 dias.

Lana *et al* (2001) observaram o importante papel das bactérias facultativas anaeróbias em canais. Bactérias microaerófilas e facultativas anaeróbios são importantes patógenos nas patogenias endodônticas, agindo sinergicamente com bactérias anaeróbias, possuem destaque na colonização dos canais. A presença de *E. faecalis* vem sendo associado à presença de lesão periapical.

Em 1992, Sundqvist analisou 65 pacientes e com lesão endodôntica. Considerou a ecologia no sistema de canais radiculares resultado do comensalismo e antagonismo da interrelação das bactérias num meio limitado de nutrientes e presença de oxigênio em canais necróticos.

3.2 Terapia fotodinâmica em endodontia

A terapia fotodinâmica (PDT) possui suas primeiras experiências a cerca de 100 anos. Desde então, diversos corantes e fontes de luz foram testados.

Com o advento dos lasers, a terapia fotodinâmica foi favorecida, pois é utilizado uma fonte de luz com apenas um comprimento de onda. Com o λ conhecido, faz-se

possível a absorção pelo corante específico. Ainda possibilitando o acoplamento da fibra óptica à saída do feixe no aparelho e a possibilidade de controlar os parâmetros da luz emitida.

Quando utilizamos a terapia fotodinâmica em redução microbiana, pretendemos transferir a energia do feixe de luz para o corante que deverá estar impregnado em alguma estrutura do microorganismo alvo. Este corante poderá ser endógeno ou exógeno. A energia absorvida pelo corante produzirá substâncias altamente reativas que causarão danos a estes microorganismos levando-os à morte. Chamamos este procedimento de PACT- quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana.

A terapia é considerada atérmica pois o aumento de temperatura é insignificante, não ultrapassando 1°C. A vantagem da PACT é poder transferir a energia ao fotossensibilizador, sem causar injúrias aos tecidos circunvizinhos. Produzindo reações de oxido-redução e peroxidação (superóxidos), mediando processos oxidativos, degradação de proteínas, inibição de replicação e aumento de permeabilidade em membranas e paredes celulares.

A eficiência desta terapia depende da seletividade e retenção do fotossensibilizador pelo microorganismo, eficiência de absorção e transferência da energia, e ainda do poder oxidativo das substância energizadas na interação com os meios biológicos. A terapia fotodinâmica está sendo estudada como uma terapia promissora para erradicar bactérias patogênicas devido sua seletiva ação antimicrobiana, pois em baixas concentrações apresenta-se letal à elas sem causar injúrias à células normais. (Soukos *et al*, 1996)

Diversos estudos tem sido realizados em odontologia com o intuito de complementar as terapias convencionais. Especificamente em endodontia, a PDT apresenta papel promissor como coadjuvante em retratamento com lesões periapicais.

Estudos vem sendo realizados para demonstrar a redução microbiana intracanal. (Silbert *et al*, 2000), (Seal *et al*, 2002).

Uma vantagem do uso da PDT é a imediata redução microbiana em relação ao uso de agentes antimicrobianos locais. Com o uso de antibióticos, as bactérias podem desenvolver resistência à medicação e limitar a redução microbiana. (Wilson *et al.*, 1995). Estudos realizados por Pinheiro *et al*, 2003, mostrou a baixa susceptibilidade do *E.faecalis* pela azitromicina e à eritromicina. Clindamicina e cefalosporina não são clinicamente efetivos para cepas de *Enterococcus spp*. Pacientes alérgicos à penicilina devem utilizar vancomicina e aminoglicosídeos.

Silbert *et al* (2000), avaliaram a redução microbiana intraradicular utilizando a PDT. Dois grupos foram infectados com *S. Mutans* e *E.faecalis*. Utilizando laser de diodo ($\lambda=670$ nm e $P=3,5$ mW) e corante azul de metileno, as raízes foram irradiadas por períodos de tempo de 30 s a 240 s. Os resultados mostraram que apenas utilizando o corante houve redução bacteriana de aproximadamente 20%, somente a irradiação não houve alteração no número de bactérias, e a associação laser e corante (PDT) reduziu 100% das bactérias do grupo *S.mutans* e 40% do grupo *E.faecalis*. os autores consideraram a PDT como um método efetivo para redução microbiana.

Seal *et al* (2002) avaliaram *in vitro* a efetividade da PDT comparando-a a técnica convencional utilizando hipoclorito de sódio à 3%. 35 dentes foram inoculados com *Streptococcus intermedius*, várias concentrações de corantes e diversas doses de energia foram utilizadas. Concluiu-se que apesar de comprovado efeito bactericida da PDT, a utilização de hipoclorito à 3% durante 10 min foi mais efetiva. Este estudo não utilizou fibra óptica. A utilização da fibra óptica começa a ser considerada devido a

variação da anatomia radicular externa e a ramificação do sistema de canais em sua porção interna.

Kairalla (2006), comparou a redução microbiana promovida pela PDT ($\lambda=660$ nm, azul de metileno 0,01%, TPI= 5 min, P= 37,7 mW, movimentos helicoidais, 10x 28s) e laser de diodo de alta potência (P=3,5W, 5 x 10s, $\lambda=808$ nm) . Este estudo *in vitro* realizado com dentes humanos demonstrou efetiva redução microbiana para ambos os métodos frente a bactéria *Enterococcus faecalis*. A autora cita que ambos os métodos são considerados coadjuvantes à terapia endodôntica.

Rocha (2006), constatou significativa redução microbiana com o auxílio da PDT intracanal. Técnica coadjuvante à terapia endodôntica convencional em pacientes que apresentavam lesão na região periapical. (irradiação realizada com movimentos helicoidais, TPI= 5 min, corante com pasta de azuleno, t= 3 min, E= 1,8 J)

Garcez *et al* (2006) avaliaram a redução microbiana intracanal do *Enterococcus faecalis* utilizando a PDT ($\lambda= 685$ nm, P= 50 mW, E= 9 J) . O corante de azuleno à 25% foi associado ao Endo-PTC e empregado com o tempo de pré-irradiação de 5 minutos e irradiado por 3 minutos com a técnica helicoidal. Os parâmetros utilizados foram considerados efetivos na redução do *E.faecalis* comparado ao uso do hipoclorito de sódio a 0,5% durante 30 minutos.

Outro estudo realizado por Garcez *et al* (2006) comparou a técnica convencional à PDT. Neste estudo 10 dentes foram infectados com *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas bactérias bioluminescentes estáveis, e verificou-se em tempo real a redução microbiana. ($\lambda= 660$ nm, P= 40 mW, movimentos helicoidais, 10x 1 min, TPI= 10 min) Os autores também consideram a PDT como técnica coadjuvante à terapia convencional).

Bonsor *et al* (2006) avaliaram *in vivo* o efeito microbiológico da PDT comparando-a com a terapia convencional. (hipoclorito 2,25%, ácido cítrico 20%). A PDT mostrou-se ser uma técnica auxiliar efetiva na redução microbiana. (TPI= 60 s, azul de toluidina, t= 2 min, P= 100 mW).

Soukos *et al* (2006) avaliaram *in vitro* o efeito da PDT intracanal em biofilme de *E.faecalis*. (P= 10 mW, TPI= 5 min, λ = 665 nm, azul de metileno, utilização de fibra com difusores cilíndricos). Os autores consideram a PDT uma técnica eficiente na redução microbiana como coadjuvante à terapia convencional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo das amostras

Foram selecionados 51 dentes unirradiculares doados de consultório particular, que apresentavam rizogênese completa com apenas um canal, verificado radiograficamente, e mantidos em solução para hidratação (solução fisiológica em temperatura ambiente).

Os espécimes receberam tratamento de limpeza em toda superfície externa, que constou de raspagem com curetas de periodontia e profilaxia com taça de borracha montados em contra-ângulo de baixa rotação utilizando pedra pomes e água.

O comprimento de trabalho (CT) foi estabelecido pela odontometria visual, com auxílio de lima #10 tipo Kerr, ultrapassando o forame apical e subtraindo 1 mm do comprimento obtido.

A porção radicular foi dividida em três partes iguais por dois sulcos de 1 mm de profundidade em toda a sua volta. Os ápices foram vedados com resina composta fotopolimerizável (Z-250, cor A2, 3M[®]) e receberam duas camadas de esmalte de unha (cor preta, Colorama[®]) em toda superfície externa, conforme mostram as figuras 1 e 2.



Fig. 1. Dente unirradicular instrumentado. Desgastes de 1 mm no sentido transversal.



Fig. 2. Dente com verniz preto na porção radicular.

O acesso à câmara pulpar foi realizado com broca esférica diamantada 1013 (KGSorensen®) em alta rotação e o preparo químico cirúrgico (PQC) pela técnica da ampliação progressiva (TAP), segundo Noboro Imura e Mario Zuolo (1998). Utilizaram-se brocas tipo Gates-glidden número 2 e 3, brocas tipo largo número 2 até a região de terço médio e instrumentação com limas de primeira e segunda série (Maillefer®). O preparo apical foi realizado com lima 40. A substância química auxiliar utilizada foi hipoclorito de sódio a 2,5%, cinco-mL a cada troca de instrumento.

Após o PQC todos os canais foram irrigados com 10 mL de EDTA-T 17% (farmácia de manipulação- Fórmula e Ação®), dez-mL de tiosulfato de sódio 5% (farmácia de manipulação- Fórmula e Ação®) (Gomes et al, 2003), e 10 mL de soro fisiológico.

Com o auxílio de silicona de condensação pesada (zetaplus®-Zhemack, Rovigo, Itália) os espécimes foram fixos em *ependorfs* e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 min. O comprimento de trabalho (CT) de cada espécime foi anotado na tampa de cada *ependorf* (figuras 3, 4 e 5).



Fig 3



Fig 4



Fig 5

Dente preparado e fixo em *ependorf*- vista lateral (fig.3) e superior (fig.4); *ependorf* embalado para esterilização (fig.5).

4.2. Preparo do inóculo e incubação

O experimento microbiológico foi desenvolvido no laboratório de microbiologia oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB) sob a orientação da Profa. Dra. Silvana Cai.

Os procedimentos a seguir foram realizados em câmara de fluxo laminar.

A cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi inoculada em 20 mL de meio de cultura EVA (Difco™ Becton, Dickinson and Company, USA) distribuídos em dois tubos de ensaio e incubados em estufa a 37°C durante 10 h até o momento em que a suspensão atingiu a concentração semelhante ao grau de turbidez 2 da escala de Mc Farland (Bio Mérieux® SA- Marcy l'Étoile, França) que corresponde à concentração bacteriana de $6,0 \times 10^8$ ufc/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro), conforme mostra a figura 6.



Fig 6. Escala de Mc Farland #2 e suspensão de *E. faecalis*.

4.3 Inoculação

Cinquenta e um espécimes foram inoculados com 20 μ L da suspensão de *E. faecalis*, colocados em *ependorfs* e mantidos durante 14 dias em estufa a 37°C. O meio de cultura EVA (Difco™ Bector, Dickinson and Company, USA) foi trocado a cada 48 h (figura 7).

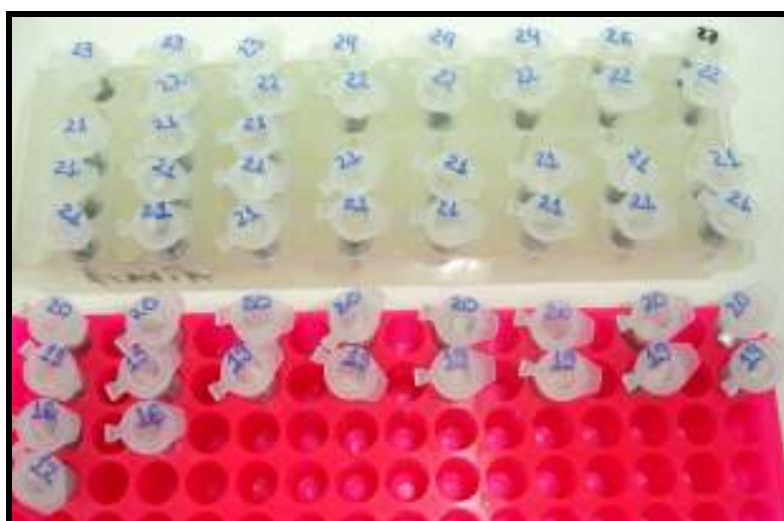


Fig 7. *Eppendorfs* posicionados em caixas na posição vertical

4.4 Irradiação

Os dentes foram divididos em três grupos, contendo 16 dentes cada. Os três dentes inoculados restantes formaram o grupo controle positivo.

Foi utilizado um laser de AsGaAl (MM Optics® Ltda.), $\lambda = 660$ nm, emissão vermelha e contínua. Os dentes do grupo GH (técnica helicoidal) e o grupo GE (estacionário) foram irradiados com o auxílio de uma fibra óptica acoplada à ponta da caneta do laser (fibra óptica plástica, 55 mm de comprimento, diâmetro de 0,3 mm) e

os do grupo GSF, sem fibra. A potência foi aferida, com e sem a fibra óptica acoplada, com o auxílio de um medidor de potência (LasercheckK[®], Coherent, EUA).

Os canais foram secos com cones de papéis esterilizados nº30 (*endopoints*[®]) e preenchidos com corante azul de metileno 0,005% (farmácia de manipulação- Fórmula e Ação[®]) e após 2 minutos de tempo de pré-irradiação (TPI) os espécimes foram irradiados com durante 3 minutos. A potência utilizada foi de 15 mW. O quadro 1 resume o modelo experimental:

Grupo Helicoidal (GH): foi irradiado com o auxílio da fibra óptica, $\Phi = 0,3\text{mm}$, realizando movimentos helicoidais sentido ápico-cervical em toda a extensão da raiz, durante 3 minutos com velocidade de 2 mm/s (Gutkneht *et al*, 1996).

Grupo Estacionário (GE): foi irradiado com o auxílio da fibra óptica, $\Phi=0,3\text{mm}$, mantendo a ponta da fibra fixa por 1 minuto em cada terço da raiz.

Grupo Sem Fibra (GSF): foi irradiado sem fibra óptica. A ponta da caneta que emite o feixe laser foi mantida encostada na região coronária, direcionando o feixe para o interior do canal durante 3 minutos.

Quadro 1: Modelo experimental realizado neste estudo

Após os procedimentos, os espécimes tiveram suas raízes clivadas em três partes com o auxílio de fórceps para a avaliação do número de bactérias remanescentes no interior dos canais.

As raízes foram divididas em porção apical, média e cervical. Cada parte foi colocada num *ependorf* contendo 1 mL de água peptonada estéril submetida à agitação mecânica de 200 rpm por 30 s (vórtex).

Foram realizadas diluições seriadas nas concentrações 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Alíquotas de 25 μL foram semeadas, em triplicata, em placa de Petri contendo o meio de cultura m *Enterococcus* Agar (Difco™ Bector, Dickinson and Company, USA). A figura 8 ilustra o esquema de diluição e semeadura.

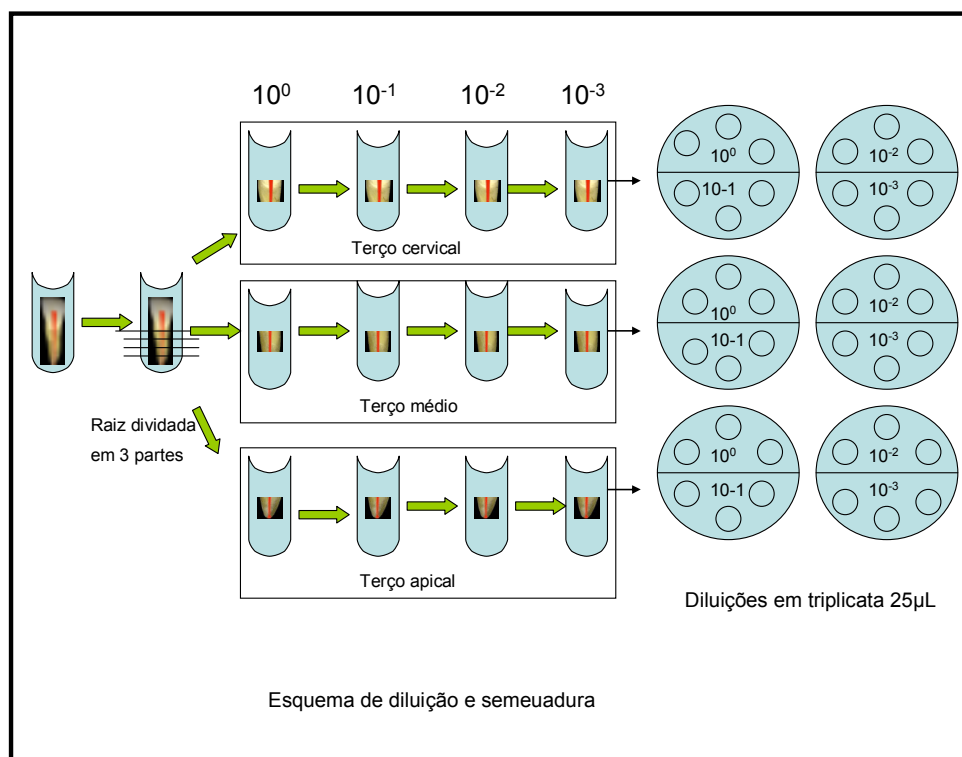


Fig 8. Esquema de diluição e semeadura.

Após 24 h de incubação das placas em estufa a 37°C , foi realizada a coleta de dados. A figura 9 mostra colônias de *E. faecalis* em placa de Petri.

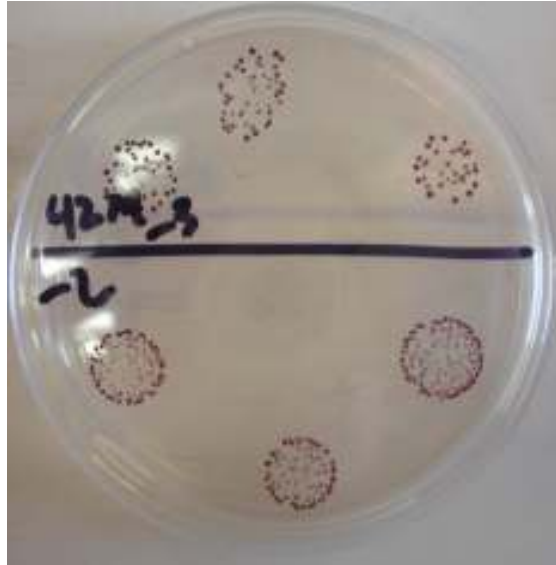


Fig 9. Colônias de *E. faecalis* em placa de Petri.

Os dados obtidos foram tabelados e analisados estatisticamente segundo teste Anova. Foi computada primeiramente, a média dos dados obtidos em triplicata. A média para cada terço radicular foi então calculada para as 16 amostras dos três grupos analisados (GH, GE e GSF). A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Quatorze dias após a inoculação dos espécimes, os três dentes do grupo controle positivo (um para cada grupo experimental) mostrou abundante crescimento bacteriano, da ordem de 10^8 ufc/mL.

A terapia fotodinâmica mostrou-se efetiva para redução do número de células viáveis de *E. faecalis*. Houve diminuição de 2 logs de ufc/mL após a irradiação, independente da técnica utilizada. Ressaltando, inicialmente havia 100 milhões ufc/mL e finalizou em 1 milhão de ufc/mL, houve uma redução aproximada de 99 milhões de ufc/mL. Deste modo, a concentração de 0,005% de azul de metileno associada à emissão de 660 nm da fonte de luz utilizada promoveu a efetividade da terapia empregada.

5.1- Técnica helicoidal

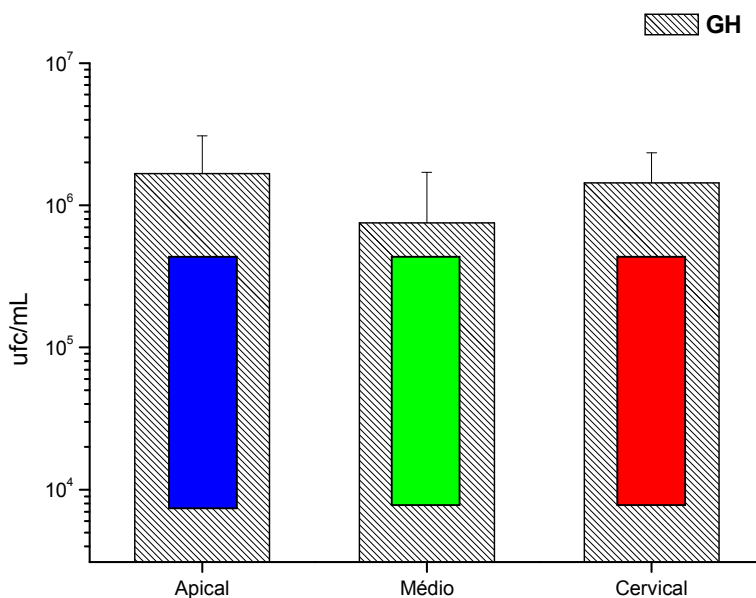


Figura 10. Quantidade das ufc/mL nos terços cervical, médio e apical, após irradiação utilizando a técnica helicoidal.

A figura 10 mostra o valor absoluto da redução de *E. faecalis* para GH. Observa-se que com a técnica helicoidal, houve maior redução bacteriana no terço médio quando comparado aos terços apical e cervical, que apresentaram semelhante valor de redução.

5.2 Técnica estacionária

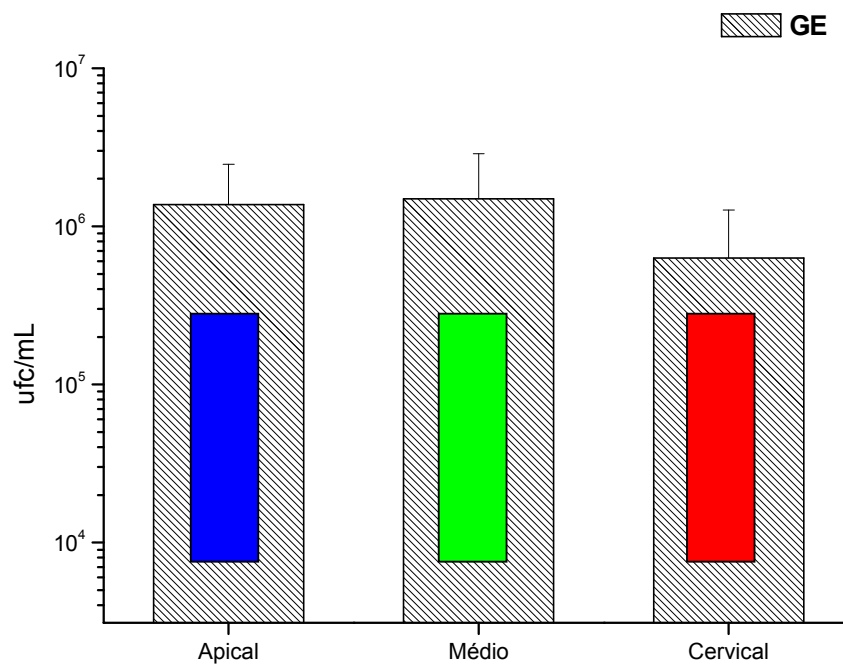


Figura 11. Quantidade das ufc/mL nos terços cervical, médio e apical, após irradiação utilizando a técnica estacionária.

Avaliando a técnica estacionária, houve maior redução microbiana no terço cervical, enquanto os terços médio e apical apresentaram valores próximos de redução (figura 11).

5.3- Técnica Sem Fibra

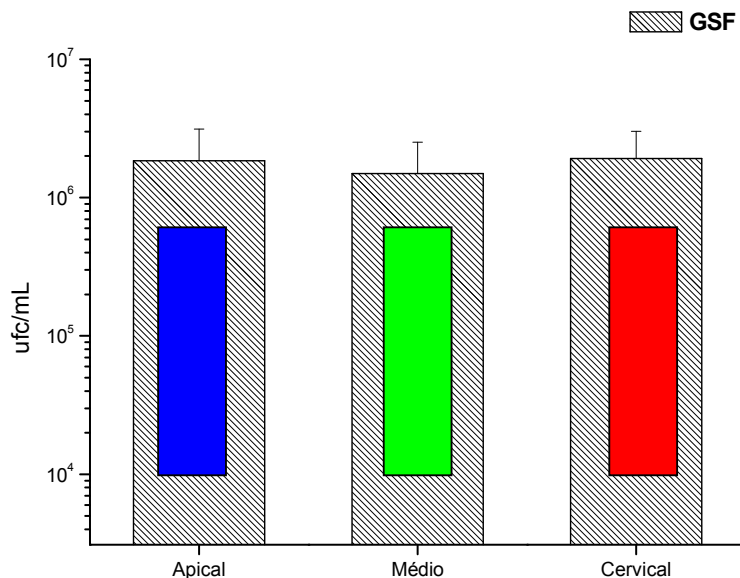


Figura 12. Quantidade das ufc/mL nos terços cervical, médio e apical, após irradiação utilizando a técnica sem fibral.

Sem a utilização da fibra óptica, houve semelhante redução microbiana nos três terço radiculares (figura 12).

O quadro 2 e a figura 13 resumem os resultados obtidos.

(x10 ⁶)	Média/CE	DP	Média/MD	DP	Média/AP	DP
GH	1,44	0,90	0,75	0,95	1,66	1,42
GE	0,63	0,64	1,49	1,39	1,37	1,09
GSF	1,92	1,09	1,5	1,02	1,85	2

Quadro 2. Médias e desvios padrão obtidos dos terços cervicais (CE), médios (MD) e apicais (AP) para os três grupos estudados.

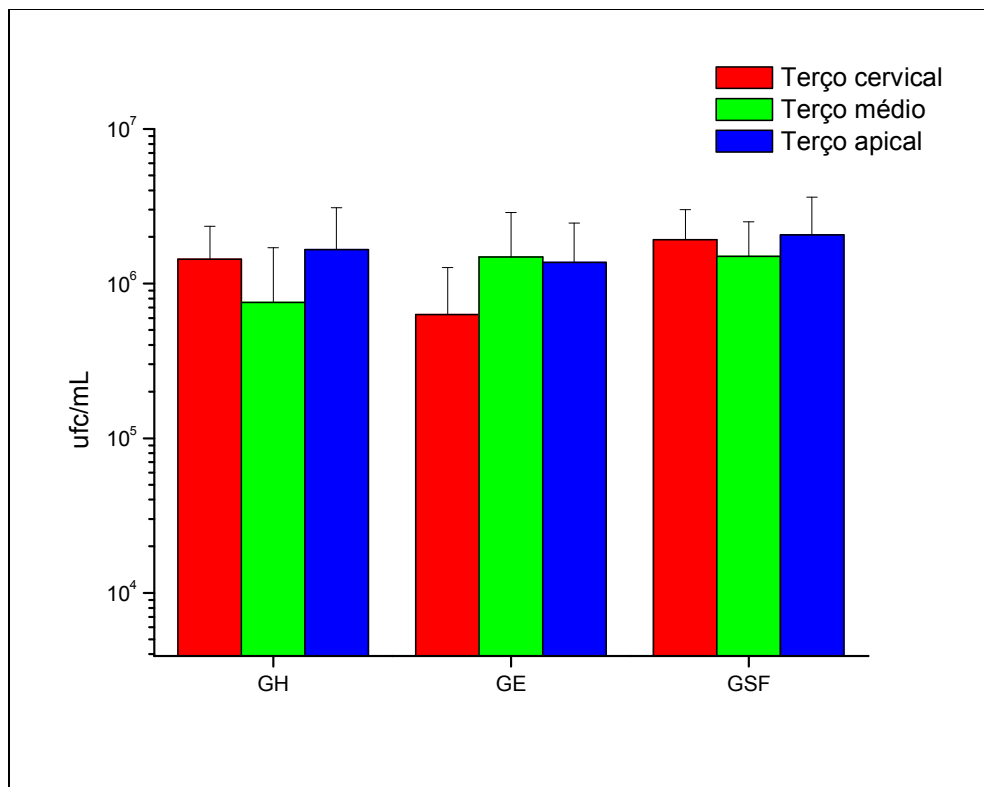


Fig 13. Médias+DP dos terços cervicais, médios e apicais para GH, GE e GSF.

Observa-se do quadro 2 e da figura 13, que comparando-se as técnicas de irradiação investigadas, nota-se que para o terço cervical e apical, a redução bacteriana é maior no grupo GE. Para o terço médio, a maior redução foi obtida para GH.

Após a análise estatística inferencial, obteve-se que, independente da técnica de irradiação utilizada, não há diferença estatística significativa na redução de células viáveis de *E. faecalis* entre os terços apicais e médios. Entretanto, na região do terço cervical, houve redução de *E. faecalis* estatisticamente significativa no grupo GE comparado aos grupos GH e GSF.

6 DISCUSSÃO

A sanificação do sistema de canais radiculares é o principal obstáculo para o sucesso da terapia endodôntica. Devido a anatomia radicular apresentar abundante ramificação, promovem um ambiente favorável ao acúmulo de bactérias, limitando o acesso do instrumento endodôntico.

Para suprir tal deficiência, utilizamos substâncias químicas auxiliares para promovem degradação celular e alteração da dentina radicular. A substância química auxiliar de escolha foi o hipoclorito de sódio a 2,5% devido a sua ação antimicrobiana comprovada na literatura (Imura & Zuolo, 1998). Apresenta alta ação antimicrobiana com reduzido dano aos tecidos periodontais. (Berber *et al*, 2006). O EDTA-T 17% também foi utilizado para promover o aumento dos túbulos dentinários, devido sua ação quelante, favorecendo o acesso de outras substâncias ao sistema de canais.

O ponto crítico da técnica endodontica convencional, podemos afirmar seguramente, é a permanência de microorganismos viáveis no interior dos canais radiculares que não conseguimos remover com os procedimentos padrões.

A microbiota endodôntica é polimicrobiana e dinâmica (Sundqvist; 1998; Love, 2001). Dente as espécies encontradas em retratamentos endodônticos em caso de lesão periapical refratária, o *E.faecalis* apresenta-se em destaque devido sua virulência e capacidade de recolonização. O Enterococcus faecalis é Gram positivo anaeróbio facultativo, encontrado na microflora do trato intestinal humano. Desde 1959, vem recebendo atenção pelos pesquisadores de microbiologia oral devido sua prevalência em retratamentos endodônticos (Winkler *et al*, 1959). Estudos sugerem que *E.faecalis* são resistentes à ambientes básicos, propiciados pelo hidróxido de

cálcio, principal medicação intracanal, e ácidos, ambientes resultantes da presença de cárie (Nakajo *et al*, 2006).

De acordo com Molander *et al*, 1998, bactérias anaeróbias facultativas podem sobreviver por longo período de tempo em baixa atividade metabólica ou em condições que alterem o status nutricional e contribuam para o crescimento bacteriano.

O *Enterococcus faecalis* possui a capacidade de sobreviver em ambientes de nutriente escasso e de baixo comensalismo (Sundqvist; 1998)., Nos retratamentos endodônticos, o fator de virulência do *E.faecalis* foi relacionado à capacidade deste microorganismo em penetrar em túbulos dentinários e aderir ao colágeno na presença de sêrum humano (Love,2001).

Devido à anatomia dos canais e a virulência dos microorganismos que colonizam os condutos radiculares, a Terapia Fotodinâmica está sendo considerada como possível coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional.

A PDT utiliza uma fonte de luz de baixa intensidade que irradia um corante previamente depositado no local. Esses corantes devem possuir características para absorver a luz laser e então promover reações químicas nas células coradas. Os corantes fotossensíveis produzem espécies de oxigênio que são citotóxicos quando irradiados com laser do comprimento de onda ressonantes a sua cor. A energia absorvida pelo corante promove excitação de suas moléculas e quando estas retornam ao seu estado fundamental, o fóton emitido pelo corante ao ambiente promove reações oxidativas que são tóxicas às células, assim, promovendo a morte celular. Para a eficácia da PDT devemos considerar o comprimento de onda, a absorvância do fotosensibilizador, a energia, a intensidade e o tempo de exposição da luz. (Garcez *et al*, 2006)

Neste estudo, utilizamos o azul de metileno à 0,005% como cromóforo absorvedor de energia. Estudos prévios utilizaram diferentes tipos de corantes, com azul de toluidina (Silbert et al, 2000), azuleno (Garcez, 2006) e até mesmo o azul de metileno em maior concentração (Wainwright, 1998; Dobson e Wilson, 1992). A fonte emissora produz laser com comprimento de onda de 660 nm, que é melhor absorvido pelo monômero do azul de metileno na concentração de 0,005%. A menor concentração do corante utilizado neste estudo mostrou-se efetivo para a redução microbiana e diminui o risco do manchamento do elemento dental. O tempo de pré-irradiação também foi reduzido à 3 minutos favorecendo seu uso clínico, sem comprometer a redução microbiana.

A injúria térmica é o fator limitante dos lasers de alta potência, devido aos danos promovidos nos tecidos duros e moles da cavidade oral. Deve-se considerar favorável à PDT a ausência de aumento de temperatura quando utilizamos o laser de baixa potência. Trabalhando com potência de até 1W, não existe risco de dano aos tecidos dentais e periodontais, tornando mais seguro seu uso *in vivo*.(Kairalla, 2006)

Outra vantagem do uso da PDT é a imediata redução microbiana em relação ao uso de agentes antimicrobianos locais. Com o uso de antibióticos, as bactérias podem desenvolver resistência à medicação e limitar a redução microbiana. (Wilson *et al.*, 1995).

O tempo de incubação dos espécimes foi de 14 dias para favorecermos a infiltração das bactérias nos túbulos dentinários, não apenas no canal principal da raiz.

O laser hand (MMOptics) foi selecionado para este estudo por apresentar comprimento de onda na faixa do 660 nm, ser de fácil manuseio para acoplar a fibra óptica, fácil transporte e baixo custo.

A utilização da fibra óptica foi considerado desnecessária segundo resultados obtidos neste trabalho. Não houve diferença estatística significativa entre a redução de células viáveis no terço apical, considerada como o terço mais crítico devido a grande ramificação dos canais, delta apical e região de contaminação externa da raiz.

A técnica de movimentos helicoidais obteve melhor resultado no terço médio e a técnica estática nos terços cervicais e apicais.

Ma devemos considerar a variação do comprimento radicular dos espécimes, sendo que o tempo de irradiação foi fixo para todas as amostras e a energia entregue varia conforme a área irradiada; apesar da porção radicular ser dividida em três partes iguais, a área interna varia intre si. Assim, aumentando o volume do corante depositado, a região cervical acomodava mais corante que a região apical. Portanto, faz-se necessário outros trabalhos para estabelecer um protocolo clínico seguro, visando minimizar o número de variáveis proposto num estudo experimental.

É importante salientar que a PDT é um excelente coadjuvante à terapia endodôntica em única ou múltiplas sessões. Podemos realizá-la após o PQC ou na sessão antes da obturação dos canais, favorecendo a redução microbiana.

7 CONCLUSÕES

Dentro dos parâmetros utilizados neste estudo, pode-se concluir que:

- A terapia fotodinâmica foi efetiva para promover redução de *Enterococcus faecalis* intracanal;
- Independente das técnicas de irradiação utilizadas (helicoidal, estacionária e sem fibra óptica), houve efetiva redução bacteriana nos terços cervical, médio e apical do sistema de canais radiculares.

REFERÊNCIAS

1. Berber,VB; Gomes,BP; Sena, NT; Vianna,ME; Ferraz,CC; Zaia, AA; Souza-Filho,FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reduced *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 39(1): 10-7,2006.
2. Bonsor,SJ; Nichol,R; Reid,TMS; Pearson,GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Brith Den J.* 201, 101-105, 2005.
3. Bonsor,SJ; Nichol,R; Reid,TMS; Pearson,GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An *in vivo* study). *Brith Den J.* 200, p. 337-341, 2006.
4. Bytröm A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J,* 18, 35-40, 1985.
5. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.*25, 97-106, 1992.
6. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from low-power laser. *Arch Oral Biol;* 37(11), 883-887. 1992.
7. Fabricius L, Dahlèn G, Holm SE, Möller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandin J Dent R,* 90, 200-206, 1982.
8. Ferrari, P. Detecção de microorganismos superinfectantes em diferentes fases da terapia endodôntica em pacientes portadores de polpa necrótica e lesão periapical com câmara pulpar fechada. 2001, 159 f. Dissertação (Mestrado em endodontia)-FOUSP
9. Garcez Segundo, A; Ribeiro,MS; Tegos,GP; Núñez,SC; Jorge,AOC; Hamblin,MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional

- endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.*39; p.59-66, 2006.
10. Garcez Segundo AS, Nunez SC, Jorge AOC, Lage-Marques JL, Ribeiro MS. Efficiency of NaCl and laser-assisted photosensitization on reduction of *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol and Endo*, 2006.
 11. Garcez Segundo AS. Laser em baixa intensidade associado a fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico. [Dissertação de mestrado profissionalizante lasers em odontologia]. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2002.
 12. Gomes, BPFA; Pinheiro,ET; Gadê-Neto, CR; Souza, ELR; Zaia,AA; Teixeira,FB; Suza-Filho,FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microb Immunol.* 19, 71-76, 2004.
 13. Gutknecht N, Gogswaardt DV; Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bacterial effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Sur*, v.18,n.2, p.57-60,2000.
 14. Hardee MW, Miserendino L, Kos W, Walia H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. *J Endod*, 20, 8, 1994.
 15. Imura N, Zuolo M. Endodontia para o clínico geral. Série EAP.APCD vol 10. 1998. ed artes médicas.
 16. Kairalla, EC. Estudo da redução microbiana intracanal utilizando laser de baixa potência associado a fotossensibilizador e laser de alta potência. [Dissertação de mestrado profissionalizante em lasers em odontologia]. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2006.

17. Lana,MA; Ribeiro-Sobrinho,AP; Stehling,R; Garcia,GD; Silva BKC, Hamdam,JS; Nicoli,JR; Carvalho,MAR. Microorganisms isolated from root canal presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. Oral Microb Immunol. 16,p100-105, 2001.
18. Love RM, (2001). *Enterococcus faecalis*- a mechanism for its role I endodontic failure. I Endod J, 34, 399-405, 2001.
19. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological Status of root-filled teeth with apical periodontitis. I Endod J, 31, 1-7, 1998.
20. Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Jakolistsch S, Kluger W, Wernisch D T, Sperr W. The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG, Er:YAG laser irradiation in the root canal: an in vitro comparison. J Clin Laser Med & Surg, 17, n4, 161-164, 1999.
21. Nakajo, K; Komori, R; Ishikawa, S; Ueno,T; Suzuki, Y; Iwami, Y; Takahashi, N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. Oral Microb and Immunol. 21, 283-288, 2006.
22. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traum, 6, 142-149, 1990.
23. Ovchinnikov,IS; Tuchin,VV. Photodynamic action on some pathogenic microorganisms of oral cavity. Laser tissue interactions, therapeutic applications, and photodynamic therapy.v.4433,p.160-168, 2001.
24. Paiva JG e Antoniazzi JH. Endodontia Bases para a prática clínica. Segunda edição. Artes Médicas- São Paulo, 1988.
25. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. I Endod J, 28, (2), 95-99, 1995.
26. Pinheiro,ET; Holanda Pinto,AS; Rocha,MMNP; Carvalho, CBM; Gomes,BPFA. Influência do preparo químico-mecânico na microbiota de dentes com periodontite

- apical crônica. 16^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica; Águas de São Pedro, SP: Res AO63, p21, 1999.
27. Pinheiro,ET; Gomes,BPFA; Ferraz,CCR; Teixeira, FB; Zaia, AA; Souza Filho,FJ.Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microb and Immunol. 18, 100-103. 2003.
 28. Ribeiro M, Zezzel DM. Laser de baixa intensidade . In Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser. Quintessence Editora. 2004.
 29. Rocha, PRP. Estudo da ação antimicrobiana do laser em baixa intensidade associado a um fotossensibilizador. [Dissertação de mestrado profissionalizante em lasers em odontologia]. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2006.
 30. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. Dent Clin N Amer 18(2): 23-34, 1974.
 31. Seal GJ, Ng Y-L, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus Intermedius* biofilm in root canals. J Endod J, 35,268-274.2002.
 32. Silbert T, Bird PS, Milburn GJ, Wash LJ. Desinfection of root canals by laser dye photosensitization. J Den Res: 569-679.2000.
 33. Soukos,NS; Wilson,M; Burns,T; Speiht,PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and *Streptococcus sanguis* evaluated in vitro. Lasers Surg Med; 18,p.253-9, 1996.
 34. Soukos,NS; Chen,PSY; Morris,JT; Ruggiero,K; Abernethy,AD; Som,S; Foschi,F; Doucette,S; Bammann,LL; Fontana,CR; Doukas,AG; Stashenko,PP. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. J End. V32, n.10, p979-984, 2006.

35. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod*, 85, 86-93, 1998.
36. Sundqvist,G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*, Chicago, v.18, n.9, p.427-430, Sept, 1992a.
37. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J antimicrob Chem*. V.42, n.1, p.13-28,1998.
38. Wash LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Den J*; 42(5): 302-206.1997.
39. Wilson, M. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol*, v. 78, n.5, p. 569-574, 1995.
40. Winkler, KC; Amerongen JV. Bacteriologic results from 4000 canals cultures. *Oral Surg Oral Med Pathol*. (12), 859-875, 1959.