

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ENDODONTIA**

Tese

**EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA À
SOLUÇÕES IRRIGADORAS FRENTE A DOIS MODELOS DE
BIOFILME**

RICARDO ABREU DA ROSA

Porto Alegre
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ENDODONTIA**

**EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA À SOLUÇÕES
IRRIGADORAS FRENTE A DOIS MODELOS DE BIOFILME**

RICARDO ABREU DA ROSA

Porto Alegre

2015

RICARDO ABREU DA ROSA

**EFETIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA À SOLUÇÕES
IRRIGADORAS FRENTE A DOIS MODELOS DE BIOFILME**

Linha de pesquisa:
Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica, ênfase em Endodontia.

Orientação:
Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só

Porto Alegre
2015

CIP - Catalogação na Publicação

Rosa, Ricardo Abreu da
Efetividade da terapia fotodinâmica associada à
soluções irrigadoras frente a dois modelos de
biofilme / Ricardo Abreu da Rosa. -- 2015.
125 f.

Orientador: Marcus Vinicius Reis Só.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Enterococcus faecalis.
3. soluções irrigadoras. 4. biofilme. I. Só, Marcus
Vinicius Reis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho,

À minha família,
especialmente minha mãe **Eleonora** e meu pai **Romar**, que além de me concederem a maior das dádivas(a própria existência) presenteiam-me com a benção de seu amor irrestrito e me acompanham tão próximos quanto possível em todos os instantes, além de sempre me direcionarem para o caminho correto.

Ao meu irmão,
Tiago pelo apoio, cumplicidade e estímulo constantes.

Aos meus padrinhos,
Sônia e Marco Antônio pelo carinho, atenção e dedicação, como sempre digo, também são meus pais.

À minha namorada,
Mirela pela compreensão pelos momentos que estive longe ao longo destes quase quatro anos, pelo auxílio na execução de uma boa parte dos projetos desenvolvidos e pelo carinho irrestrito.

À duas pessoas que me deixaram ao longo desta caminhada,
Minha Vó **Maria** e minha Tia Avó **Geni**, certamente estariam muito orgulhosas deste momento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só,
agradeço por compartilhar comigo sua experiência, sua inteligência e sua paciência. Que fique aqui registrada minha eterna gratidão por sua assistência sempre que necessária, por suas palavras e atitudes sempre seguras. Finalmente, muito obrigado pelas lições de vida, por me acolher de maneira tão natural e carinhosa em sua família. Graças a ti pude me sentir em casa em Porto Alegre e na UFRGS desde o princípio.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** por me proporcionar todas as condições através de sua estrutura e de seu corpo docente e por poder ingressar em um Curso de Pós-Graduação em uma instituição conceituada.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, pela oportunidade da realização de meu curso de Doutorado nesta conceituada escola.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Francisco Montagner**, cujo apoio e orientação, especialmente nas etapas microbiológicas, foram fundamentais para a conclusão desta tese.

Ao **Prof. Dr. Regis Burmeister dos Santos** pelas conversas descontraídas e também filosóficas, pelos cafés e pelo fino trato a mim dispensado desde a primeira semana de ingresso na casa. Sem dúvida o Sr. e o **Prof. Dr. Marcus Só** são dois grandes exemplos de mestres que pude conhecer dentro da UFRGS.

À equipe de professores de Endodontia da UFRGS, Prof. Dr. **João Ferlini Filho**, Prof^a. Dr^a. **Fabiana Soares Grecca**, Prof. Dr. **Augusto Bodanezi**, Prof^a. Dr^a. **Patrícia Kopper**, Prof^a. Dr^a. **Simone Bonato Luisi** e Prof^a. Dr^a. **Renata Grazziotin**, pela carinhosa acolhida, ensinamentos e amistosa convivência.

À secretária da Endodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS **Andréia Dill**, pelo carinho, disposição, amizade e pelos inúmeros auxílios prestados.

Ao Centro de Microscopia de Eletrônica da UFRGS pelos serviços prestados, em especial ao funcionário **Henrique Biehl** pela competência e dedicação no trato com as imagens de microscopia confocal a laser.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ), pelo apoio financeiro para realização desta Tese.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior CAPES pelo auxílio financeiro ao longo de todo o Curso de Doutorado através de bolsa CAPES - REUNI.

À Prof^a. Dr^a. **Fernanda Visioli** pela amizade e pela disposição e interesse em nos auxiliar na etapa de biologia molecular desta Tese. Embora não tenha havido tempo hábil para inserir tais dados, certamente, eles serão compilados e posteriormente publicados.

Aos estimados colegas de Pós-Graduação, **Márcia Helena Wagner, Daiana Elisabeth Böttcher, Maximiliano Schunke Gomes, Aline Martins Justo, Carolina Bender Hoppe, Eloísa Assmann, Ludmila C. Moraes, Alessandra T. L. Vaucher, Ivana Zaccara, Letícia Mestieri, Pauline Lang, Angela Longo, Israel Carlotto, Flávia Baldasso, Natália Leonardo** pela amizade e carinho. Aprendi muito com todos vocês!

À colega de Doutorado, amiga e irmã **Manuela Favarin Santini** pela parceria em tempo integral, seja nas atividades clínicas, de pesquisa ou nos afazeres domésticos. Sem tua presença, certamente essa jornada teria sido bem mais difícil. Conte sempre comigo. Tenho certeza que nossa amizade e parceria não findarão após esta defesa.

À todos os alunos de iniciação científica que tive a oportunidade de orientar em conjunto com o **Prof. Dr. Marcus Só**. Obrigado pela confiança pessoal. **Simone Chittoni, Tassiana Martini, Caroline Centenaro, Lilian Tietz, Pedro Duarte, Alex Jardine, Karen Heiden, Raíssa Ventura**.

À **Luiza**, técnica responsável pelo Laboratório de Microbiologia (LABIM) da Faculdade de Odontologia da UFRGS, pelo apoio e paciência durante a etapa experimental desta Tese e de tantos outros projetos realizados nas dependências deste laboratório sob sua supervisão.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Microbiota dos canais radiculares infectados	17
2.2. Controle da infecção endodôntica e soluções irrigadoras	20
2.2.1. Hipoclorito de Sódio (NaOCl)	20
2.2.2. Gluconato de Clorexidina (CHX)	26
2.2.3. Terapia fotodinâmica na Endodontia.....	32
2.3. Metodologias para detecção da presença de microrganismos	44
2.3.1. Método de cultura microbiana	44
2.3.2. Método de fluorescência associado à microscopia confocal a laser	45
3. OBJETIVOS	50
3.1. Geral.....	50
3.2. Específicos	50
4. ARTIGO CIENTÍFICO	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
6. CONCLUSÕES	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8. FIGURAS	112
8.1. Quadro de imagens de MCL do grupo SORO	112
8.2. Quadro de imagens de MCL do grupo SORO/PDT.....	113
8.3. Quadro de imagens de MCL do grupo NaOCl.....	114
8.4. Quadro de imagens de MCL do grupo NaOCl/PDT.....	115
8.5. Quadro de imagens de MCL do grupo CHX.....	116
8.6. Quadro de imagens de MCL do grupo CHX/PDT	117
9. ANEXOS	118
9.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS	118
9.2. Aprovação do projeto de pesquisa na Plataforma Brasil	119
9.3. Termo de consentimento livre e esclarecido	121
9.4. Declaração de doação dos dentes bovinos.....	123

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano e a dissolução de biofilme promovido pela terapia fotodinâmica (PDT) associada com o hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% e a clorexidina (CHX) sobre biofilmes mono-espécie e multi-espécies. No modelo de biofilme mono-espécie, quarenta e seis pré-molares inferiores foram contaminados com cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCCC 29212) por 21 dias. Os espécimes foram divididos em três grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada: soro fisiológico, CHX 2% e NaOCl 2,5%. Após irrigação com 5 mL de cada irrigante, a PDT foi realizada. Amostras foram coletadas previamente aos protocolos de irrigação (S1), após irrigação (S2) e após PDT (S3). No modelo de biofilme multi-espécies, sessenta blocos de dentina bovina foram infectados intraoral e divididos em seis grupos: soro fisiológico, soro fisiológico/PDT, CHX, CHX/PDT, NaOCl e NaOCl/PDT. Microscopia confocal a laser foi usada para avaliar a porcentagem e o biovolume de células vivas e o volume total de biofilme. Todos os grupos reduziram as contagens de UFCs após os procedimentos de irrigação (S1-S2); porém a CHX e o NaOCl promoveram as menores contagens de UFCs ($P < 0,05$). A PDT diminuiu significativamente a contagem bacteriana no grupo do soro fisiológico (S2-S3; $P < 0,05$). No modelo de biofilme multi-espécies, a menor quantidade de células vivas foi observada nos grupos CHX, CHX/PDT, NaOCl e NaOCl/PDT, sem diferenças entre si ($P > 0,05$). A PDT não reduziu o volume total de biofilme ($P > 0,05$); porém parece diminuir o biovolume e a quantidade de células vivas após irrigação com CHX 2% e NaOCl 2,5%. A terapia fotodinâmica associada ao soro fisiológico reduziu a carga bacteriana em canais infectados com *E. faecalis*. A PDT parece reduzir a quantidade e o volume de células vivas, mas não o volume total de células em biofilme multi-espécies induzido *in situ*. Finalmente, o tipo de irrigante foi decisivo para dissolver biofilme multi-espécies.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, *Enterococcus faecalis*, soluções irrigadoras, biofilme.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect and the biofilm dissolution promoted by photodynamic therapy (PDT) associated with 2.5% NaOCl and 2% CHX over monospecies and multispecies biofilms. In monospecies biofilm model, forty-six mandibular premolars were contaminated with *Enterococcus faecalis* strains (ATCC 29212) broth culture for 21 days. Specimens were divided into three groups according to the irrigant used: saline, 2% of CHX and 2.5% of NaOCl. After irrigation with 5 mL of each irrigant, PDT was performed. Samples were collected at baseline (S1), after irrigation (S2) and after PDT (S3). In multispecies biofilm model, sixty bovine dentin blocs were infected intraorally, and divided into six groups: saline, saline/PDT, CHX, CHX/PDT, NaOCl and NaOCl/PDT. Confocal laser scanning microscopy was used to assess the percentage and the biovolume of live cells and the total biovolume. All groups reduced UFC' counts after irrigation procedures (S1-S2); however CHX and NaOCl promoted the lowest UFCs counts ($P < 0.05$). PDT significantly reduced the bacterial counts in saline group (S2-S3; $P < 0.05$). In multispecies biofilm model, the lowest amount of live cells was observed in CHX, CHX/PDT, NaOCl and NaOCl/PDT groups, with no differences among them ($P > 0.05$). PDT did not reduce the total biovolume ($P > 0.05$); however it appears to decrease the biovolume and the amount of live cells after irrigation with 2% CHX and 2.5% NaOCl. PDT associated with saline reduced the bacterial load in canal infected with *E. faecalis*. PDT seems to reduce the amount and the biovolume of live cells, but did not reduce the total biovolume of cells in multispecies biofilm induced *in situ*. Finally, the irrigant was decisive to dissolve multispecies biofilm.

Keywords: Photodynamic therapy, *Enterococcus faecalis*, root canal irrigants, biofilm

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% – porcentagem

< - menor

> – maior

x - vezes

≥ – maior ou igual

°C – graus Celsius

μL – microlitro

μL – microlitro

μm – micrometro

AM – Amazonas

AsGaAl – arsênio-gálio-alumínio

AT – azul de toluidina

ATCC – American Type Culture Collection

atm – atmosfera (unidade de pressão)

BHI – *Brain Heart Infusion*

CHX – clorexidina

cm² – centímetro quadrado

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

et al. – e outros

FO – fibra óptica

G – gauge

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

G4 – grupo 4

G5 – grupo 5

G6 – grupo 6

HOCl – ácido hipocloroso

J – joule

KTP – potássio-titânio-fosfato
LED – Light Emitting Diode
Ltda – limitada
MCL – microscopia confocal a laser
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MI – Michigan
mL – mililitro
mm – milímetro
mol/L – molaridade
mW – miliwatts
N – número
NaOCl – hipoclorito de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
Nd:YAG – Neodímio: Ítrio, Alumínio, Granada
NH – grupamento amina
nm - nanometro
OC – obturação do canal
OR – orange
PBM – preparo biomecânico
PCR – *polymerase chain reaction*
PDT – terapia fotodinâmica ou desinfecção fotoativada
pH – Potencial de Hidrogênio, representação da escala na qual uma solução neutra é igual a 7
PR – Paraná
PUI – irrigação ultrassônica passiva
RJ – Rio de Janeiro
RS – Rio Grande do Sul
S – estado singleto original
S* - estado singleto excitado
S1 – coleta inicial
S2 – coleta pós-irrigação
S3 – coleta pós-PDT
SH – sulfidrilas

SP – São Paulo

T* - estado excitado tripleto

TEM – microscopia eletrônica de varredura

UFC – unidade formadora de colônia

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UT – Utah

UV – ultravioleta

W – watts

1. INTRODUÇÃO

O processo de sanificação, modelagem e selamento tridimensional do sistema de canais radiculares são fundamentais para o sucesso do tratamento endodôntico. Dessa maneira, protocolos de desinfecção assumem particular importância dentro do contexto exposto.

Em dentes que apresentam necrose pulpar, o sistema de canais radiculares constitui um nicho ecológico bastante complexo que propicia condições adequadas para o desenvolvimento da infecção endodôntica (SUNDQVIST, 1992).

A eliminação dos microrganismos do interior do sistema de canais radiculares infectados constitui um tema bastante instigante, seja para o profissional, na conduta das mais diversas situações clínicas, seja para a comunidade científica, na condução de múltiplas metodologias e protocolos de desinfecção empregados nas diferentes situações experimentais.

Diferentes pesquisas têm avaliado a eficácia da instrumentação mecânica, do tipo de solução irrigadora e o modo como ela é dispensada e/ou ativada no interior dos canais, da utilização da medicação intracanal e sistêmica e de métodos auxiliares no processo de desinfecção do sistema de canais (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; GHINZELLI *et al.*, 2014). Ainda hoje, o método mais eficiente, de baixo custo e amplamente empregado para descontaminar o sistema de canais radiculares é a minuciosa remoção do conteúdo séptico-tóxico (SCHILDER, 1974), uma vez que os microrganismos presentes em canais radiculares infectados não podem ser alcançados pelas células de defesa do hospedeiro (TAKAHASHI, 1998).

O preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares é capaz de reduzir de maneira significativa a quantidade de microrganismos que constituem a microbiota endodôntica (ENDO *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013, MARTINHO *et al.*, 2014). Entretanto, microrganismos persistentes sobrevivem, não apenas pela incapacidade do preparo químico-mecânico em removê-los das anfractuosidades e complexidades anatômicas inerentes à variada morfologia interna dos sistemas de canais radiculares, mas também

porque alguns nutrientes ali permanecerão (TANG *et al.*, 2004). Tais nutrientes favorecem o crescimento bacteriano, especialmente destes microrganismos residuais, que ali irão permanecer, multiplicar e, estabelecer a contaminação do espaço pulpar (BYSTRÖM *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 1996; SIGNORETTI *et al.*, 2011).

Microrganismos gram-positivos e o biofilme extracelular merecem destaque na manutenção de patologias periapicais persistentes (SIGNORETTI *et al.*, 2011). Nesse sentido, o *Enterococcus faecalis* está com muito mais frequência associado à casos de infecções persistentes após o tratamento endodôntico (ROÇAS *et al.* 2004; GOMES *et al.*, 2008). Em função do exposto, diversas pesquisas que objetivam avaliar protocolos de desinfecção dos canais radiculares acabam por utilizar cepas do *E. faecalis* para contaminação *in vitro*.

Por outro lado, algumas pesquisas têm utilizado modelos de biofilme multi-espécies induzidos *in situ* (CHAVEZ DE PAZ *et al.*, 2010; DEL CARPIO PEROCHENA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2014). Nesse tipo de situação, ocorrem interações bacterianas que não são observadas em biofilmes mono-espécie e também a formação de canais de água e de matriz extracelular que não são observadas em bactérias planctônicas (STANDAR *et al.*, 2010). A formação de matriz extracelular assume particular importância uma vez que dificulta a penetração de agentes antimicrobianos, como as soluções irrigadoras, limitando a efetividade destes.

Com relação às soluções irrigadoras, diversas substâncias têm sido utilizadas, especialmente o hipoclorito de sódio (NaOCl) e a clorexidina (CHX), seja na forma de solução, seja na forma de gel associada ao soro fisiológico. As substâncias químicas devem possuir quatro propriedades principais: atividade antimicrobiana, dissolução de tecido orgânico, ação lubrificante, baixa tensão superficial e não ser tóxico aos tecidos periapicais para que possam desempenhar suas funções durante o preparo do sistema de canais radiculares (CHEUNG; STOCK, 1993). Especialmente a capacidade antimicrobiana e de dissolução de tecido orgânico estão associadas com o fluxo da solução no interior do canal (PETERS, 2004). De acordo com Gregório *et al.* (2010),

existem dois fatores diretamente relacionados com uma irrigação eficiente, o tipo de solução empregada e a maneira como ela é aplicada no interior do canal radicular.

Entretanto, a utilização de métodos auxiliares no processo de desinfecção do sistema de canais é necessária, especialmente para lidar com microrganismos persistentes. Estas situações apresentam-se como um desafio para o clínico, principalmente nos casos em que o canal radicular foi sanificado e modelado de maneira adequada. Nesse sentido, vários sistemas a laser têm sido pesquisados como coadjuvantes nos procedimentos de desinfecção dos condutos radiculares (MEIRE *et al.*, 2009; GURSOU *et al.*, 2013; CHREPA *et al.*, 2014). Acredita-se que o laser pode ser capaz de atingir áreas inacessíveis como região de istmos, canais laterais e túbulos dentinários (MEIRE *et al.*, 2009).

Assim, com base nas informações expostas e no fascínio que este tema gera na comunidade científica, uma série de questionamentos surgiram, dando origem a este estudo que aborda o efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica associada à soluções irrigadoras comumente empregadas na prática clínica sobre um modelo de biofilme mono-espécie (*E. faecalis*) e sobre um modelo de biofilme multi-espécies induzido *in situ*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microbiota dos canais radiculares infectados

As alterações pulpares e periapicais podem ser ocasionadas por agentes físicos e químicos, mas, principalmente por microrganismos e seus produtos (BAUMGARTNER, 2004). Todas as bactérias na cavidade oral têm a oportunidade de invadir do espaço do canal radicular. Entretanto, apenas um grupo restrito de espécies tem sido identificado em canais radiculares infectados (KANTZ; HENRY, 1974; WITGOW; SABISTON, 1975; SUNDQVIST, 1994; SAKAMOTO *et al.*, 2006; RIGGIO *et al.*, 2007; FLYNN *et al.*, 2012; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2013). As interações entre fatores microbiológicos e disponibilidade de nutrientes são os principais elementos que definem a composição da microbiota oral (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

No princípio de uma infecção endodôntica, o número de espécies microbianas normalmente é pequeno. Se a via de invasão for através de uma lesão de cárie, as bactérias presentes na lesão cariogênica são as primeiras a invadirem o tecido pulpar. Nos casos onde não há comunicação aparente com a cavidade oral, as bactérias penetram através dos túbulos dentinários, como pode ocorrer nos casos de traumatismo sem exposição pulpar (SUNDQVIST, 1976). O número de espécies em canais radiculares infectados pode variar de 1 a mais de 12 e o número de células bacterianas pode variar de 100 (cem) a 100.000.000 (cem milhões) por canal radicular (SUNDQVIST; FIGDOR, 2003).

De acordo com Mims *et al.* (1995) na cavidade oral existem cerca de 100.000.000.000 (cem bilhões) de bactérias, sendo mais de 700 diferentes espécies de microrganismos (PASTER *et al.*, 2001; AAS *et al.*, 2005). De acordo com Paster *et al.* (2001), das 700 diferentes espécies bacterianas detectadas na cavidade oral de humanos, cerca de 50% destas ainda não haviam ainda sido isoladas no ano de 2001. Em 2008, dados referentes a trabalhos que utilizaram cultura microbiana e biologia molecular como métodos para identificação bacteriana permitiram a identificação de 103 tipos bacterianos e 6 fúngicos em dentes pós-instrumentação e pós-medicação (SIQUEIRA; ROÇAS, 2008). As espécies bacterianas detectadas nos

referidos estudos pertencem à 5 filos e 41 gêneros, sendo a espécie mais prevalente nas amostras a *Firmicutes* seguida pela *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (SIQUEIRA; ROÇAS, 2008).

Três anos mais tarde, no ano de 2011, cento e oitenta e sete fenótipos bacterianos diferentes já foram identificados em canais radiculares (SIQUEIRA; ALVES; ROÇAS, 2011). Destes, 23 foram encontrados com relativa abundância (acima de 1% das amostras) e 17 foram encontrados em 50% das amostras (SIQUEIRA; ALVES; ROÇAS, 2011). Dez filos foram identificados em amostras apicais de canais radiculares infectados, sendo *Proteobacteria* (43%), *Firmicutes* (25%), *Fusobacteria* (15%), *Bacteroidetes* (9%) e *Actinobacteria* (5%) os filos mais abundantes. Os métodos de sequenciamento identificaram, ainda, 84 gêneros diferentes, sendo o *Fusobacterium* o mais prevalente (15%).

Devido aos avanços, tanto nos métodos de cultura quanto nos métodos moleculares de identificação microbiana, é natural a identificação cada vez maior de novos microrganismos, principalmente por limitações técnicas anteriores. Atualmente, o banco de Dados do Microbioma Oral Humano (*Human Oral Microbiome Database – HOMD*), por exemplo, já possui 691 tipos de microrganismos identificados. Ainda assim, sabe-se que 40% a 60% das espécies bacterianas que habitam a cavidade oral permanecem incultiváveis em ambiente laboratorial (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2013). De acordo com Sakamoto et al. (2006), filotipos não cultivados representam 55% da taxa de bactérias em amostras oriundas de canais radiculares de dentes com periodontite apical. Por outro lado, em coleções purulentas aspiradas de abscessos apicais agudos, filotipos não cultiváveis representam entre 24% e 46% da taxa bacteriana encontrada (SAKAMOTO et al., 2006; RIGGIO et al., 2007; FLYNN et al., 2012).

Mesmo diante da diversidade bacteriana exposta, sabe-se que as infecções endodônticas são caracterizadas por populações mistas de cerca de 10 a 20 espécies bacterianas, com diferentes níveis de virulência. Entretanto, é difícil determinar o limite do número de células bacterianas necessárias para induzir doença (SIQUEIRA; ROÇAS, 2008). A mesma combinação de

espécies bacterianas e em mesmo número podem originar diferentes respostas em diferentes indivíduos.

Canais radiculares infectados, geralmente, abrigam uma microbiota mista com prevalência de anaeróbios estritos (SUNDQUIVIST, 1992; GOMES *et al.*, 1996). Bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes às substâncias auxiliares utilizadas no preparo químico-mecânico e à medicação intracanal quando comparadas a anaeróbios estritos (MOLANDER *et al.*, 1998).

O *Enterococcus faecalis* é um microrganismo anaeróbio facultativo, altamente resistente podendo ser encontrado em até 40% dos casos de infecção endodôntica primária (ROÇAS *et al.*, 2004), mais comumente associado a lesões crônicas assintomáticas do que com abscesso periapical agudo ou periodontite apical aguda. Entretanto, sua prevalência está associada com muito mais frequência a casos de infecções persistentes após o tratamento endodôntico (ROÇAS *et al.* 2004; GOMES *et al.*, 2008).

A patogenicidade do *E. faecalis* está relacionada à sua capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, aderir ao colágeno, além de ser capaz de catabolizar uma grande variedade de fontes de energia, permitindo sua sobrevivência por longos períodos de tempo em ambientes de extremo pH alcalino (TENDOLKAR *et al.*, 2003; CHIVATXARANUKUL *et al.*, 2008), sem interagir com outros microrganismos (STUART *et al.*, 2006) e com ausência de nutrientes, através da diminuição de seu estado metabólico (FIGDOR *et al.*, 2003). Possui, ainda, diversos fatores de virulência, incluindo enzimas líticas, substância de agregação, adesinas de superfície, citolisinas e ácido lipoteicóico, produção extracelular de superóxido (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004). É capaz de distribuir sua virulência entre outras espécies bacterianas, formando um biofilme, que dificulta sua destruição por células fagocíticas (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994; KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004).

Desta forma, o *E. faecalis* tem sido o microrganismo mais utilizado para a realização de testes antimicrobianos *in vitro* de diferentes soluções irrigadoras, medicamentos e cimentos endodônticos (VIANNA *et al.*, 2004;

ESTRELA *et al.*, 2008; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2011; SABRAH *et al.*, 2013; BAILÓN-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2014).

2.2. Controle da infecção endodôntica e soluções irrigadoras

Os mecanismos de defesa do hospedeiro, normalmente, não conseguem combater as bactérias localizadas no interior do sistema de canais radiculares. Dessa maneira, o preparo biomecânico é uma das fases mais importantes do tratamento endodôntico, englobando recursos químicos (solução irrigadora), físicos (irrigação e aspiração) e mecânicos (instrumentação) com o intuito de remover bactérias localizadas tanto na luz do canal como no interior de túbulos dentinários (LEONARDO, 2005).

Procedimentos de sanificação do canal radicular são altamente influenciados pelos efeitos químicos e mecânicos das soluções irrigadoras (BERBER *et al.*, 2006). A eficiência de uma solução irrigadora não depende apenas de sua natureza química, mas também de volume empregado, temperatura, tempo de contato, profundidade de penetração da agulha irrigadora, calibre da agulha, tensão superficial do irrigante e o tempo decorrido de sua fabricação (LEONARDO, 2005).

2.2.1. Hipoclorito de Sódio (NaOCl)

O hipoclorito de sódio é mundialmente utilizado e considerado a mais importante solução irrigadora em Endodontia, com concentrações variando entre 0,5% a 6% (ZEHNDER *et al.*, 2006; GREGÓRIO *et al.*, 2010; RÔÇAS; SIQUEIRA JR, 2011). O uso do NaOCl na Endodontia foi proposto pela primeira vez no ano de 1936, por Walker e a partir da década de 40 por Grossmann (GROSSMAN, 1943). Este composto halogenado é um sal que somente existe em solução aquosa. Sua utilização clínica é decorrente da capacidade em dissolver remanescentes orgânicos, de sua atividade antimicrobiana e da baixa toxicidade em pequenas concentrações (SPÅNGBERG, ENGSTRON e LANGELAND, 1973). Possui amplo espectro

bacteriano, sendo sua capacidade antimicrobiana e toxicidade diretamente proporcional à sua concentração (VIANNA *et al.*, 2004).

Vários estudos tem demonstrado a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio (CÂMARA *et al.*, 2009; DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012; LIN, SHEN e HAAPASALO, 2013). Dornelles-Morgental *et al.* (2011) avaliaram a eficácia antimicrobiana de algumas soluções irrigadoras e suas combinações frente ao *E. faecalis*. Após indução de biofilme intracanal em 110 dentes monorradiculares, foi realizado preparo biomecânico e irrigação com as seguintes soluções irrigadoras: NaOCl 2,5%; NaOCl 2,5% + ácido cítrico 10%; NaOCl 2,5% + vinagre de maçã; vinagre de maçã; solução de clorexidina 2%; ácido paracético; e soro fisiológico. As amostras foram coletadas previamente, imediatamente e sete dias após o preparo biomecânico. Os grupos NaOCl 2,5%, NaOCl 2,5% + vinagre de maçã, solução de clorexidina 2% e ácido paracético não apresentaram unidades formadoras de colônia imediatamente após o preparo biomecânico. Após sete dias, o grupo NaOCl 2,5% apresentou o maior efeito bactericida.

Câmara *et al.* (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do NaOCl 0,5%, 1% e 2,5% em canais instrumentados com o sistema ProTaper e previamente contaminados *in vitro* com *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, e *S. aureus*. As amostras foram coletadas previamente ao preparo biomecânico, após utilização dos instrumentos S1, S2, F1, F2 e F3. Os microrganismos foram eliminados após o preparo com o instrumento S1 em todos os grupos testados, exceto em uma amostra no grupo em que o NaOCl 0,5% foi utilizado. Não houve diferença entre a atividade antibacteriana das diferentes concentrações de NaOCl quando combinadas com instrumentos rotatórios frente aos microrganismos testados.

Quando em contato com água, o NaOCl origina duas substâncias: hidróxido de sódio (NaOH, base forte), potente agente hidrolítico, responsável pela dissolução tecidual e o ácido hipocloroso (HOCl), um ácido fraco, instável, porém com atividade antimicrobiana. A ação antimicrobiana se dá pela liberação de cloro nascente, que se liga ao grupamento amina (NH) dos

aminoácidos, formando cloraminas e interferindo no metabolismo celular. Além disso, inibe a função enzimática bacteriana, a partir de uma oxidação irreversível dos grupos sulfidrilas (SH) de enzimas bacterianas essenciais (ESTRELA *et al.*, 2002).

O grande diferencial do hipoclorito de sódio em relação às outras soluções irrigadoras utilizadas atualmente é a sua capacidade de dissolução de tecido orgânico. Essa propriedade está diretamente relacionada com a sua concentração (ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010; IRALA *et al.*, 2010; STOJICIC *et al.*, 2010; SÓ *et al.*, 2011 CLARKSON *et al.*, 2012; DUTTA; SAUNDERS, 2012). Irala *et al.* (2010) avaliaram, entre outros aspectos, a capacidade de dissolução de tecido pulpar bovino pelo NaOCl 1%, 2,5% utilizados isoladamente ou associados à solução de EDTA em diferentes volumes: NaOCl 1% (4 mL), NaOCl 2,5% (4 mL), NaOCl 1%+ EDTA 17% (2 mL : 2 mL), NaOCl 1% + EDTA 17% (1 mL : 3 mL), NaOCl 2,5% + EDTA 17% (2 mL : 2 mL) e NaOCl 2,5% + EDTA 17% (1 mL : 3 mL). Apenas a solução de NaOCl quando utilizada isoladamente foi capaz de dissolver tecido pulpar bovino. A solução de NaOCl 2,5% foi capaz de dissolver a polpa bovina em menor tempo (35 minutos) quando comparada com o NaOCl 1% (76 minutos).

Stojicic *et al.* (2010) avaliaram o efeito da concentração, da temperatura e da agitação mecânica do hipoclorito na sua capacidade de dissolver tecido orgânico. Foi utilizado hipoclorito de sódio de dois fabricantes nas concentrações de 1%, 2%, 4% e 5,8%, testados em temperatura ambiente, 37°C e 45°C, com e sem agitação sônica e ultrassônica. As amostras de tecido pulpar bovino foram pesadas antes e após o contato com as soluções. Foi utilizado um volume de 10 mL durante 5 minutos. A quantidade de tecido pulpar bovino diminuiu linearmente à medida que a concentração de NaOCl aumentava. Altas temperaturas e a agitação do hipoclorito de sódio resultaram em mais rápida dissolução do tecido pulpar.

Em 2011, Só *et al.* avaliaram a capacidade de dissolução tecidual de varias concentrações de hipoclorito de sódio isoladamente e combinadas com EDTA. Oitenta peças de tecido pulpar bovino foram preparadas e pesadas utilizando balança de precisão. Em seguida, foram imersas individualmente nas

seguintes soluções por duas horas: solução salina, NaOCl 0,5%, NaOCl 1%, NaOCl 2,5%, EDTA 17%, NaOCl 0,5% + EDTA 17%, NaOCl 1% + EDTA 17% e NaOCl 2,5% + EDTA 17%. Após o período experimental, o tecido pulpar bovino foi novamente pesado. A capacidade de dissolução tecidual do hipoclorito de sódio se mostrou dependente e diretamente proporcional às concentrações testadas. Apenas o NaOCl 2,5% foi capaz de dissolver completamente o tecido pulpar bovino em duas horas. O EDTA afeta negativamente a capacidade de dissolução tecidual do NaOCl, independentemente de sua concentração.

Cabe ressaltar que, a presença de matéria orgânica (exsudato inflamatório, remanescentes teciduais, biomassa microbiana) consome o hipoclorito de sódio, diminuindo o seu efeito. Por isso a irrigação contínua e o tempo são fatores importantes na efetividade deste composto (HAAPASALO *et al.*, 2010; MORGENTAL *et al.*, 2013). Morgental *et al.* (2013) compararam o efeito antibacteriano do NaOCl 1%, 6%, clorexidina 2%, QMix e EDTA 17% na presença e na ausência de pó de dentina. A sobrevivência de bactérias expostas aos irrigantes na presença e na ausência de dentina foi monitorada em condições planctônicas. Após contagem das unidades formadoras de colônia, verificou-se que, na ausência de dentina, após 10 segundos de contato com a suspensão bacteriana, o NaOCl 6% apresentou as menores contagens bacterianas. Após 30 segundos, NaOCl 6% apresentou 0 unidades formadoras de colônia por milímetro, enquanto NaOCl 1% e QMix apresentaram menor quantidade de UFCs em comparação com o grupo controle (soro fisiológico). Após 1 minuto, ambas as concentrações de NaOCl não apresentaram crescimento bacteriano e o QMix apresentou reduzido número de colônias, ao passo que clorexidina 2% e o EDTA apresentaram contagem bacteriana similar ao grupo controle. A dentina apresentou efeito inibitório sobre o NaOCl 6% (em 10 segundos), sobre o NaOCl 1% (em 10 segundos e 1 minuto) e sobre o QMix (em 10 segundos e 1 minuto). Após 6 horas, todas as soluções testadas eliminaram totalmente o conteúdo bacteriano, independentemente da presença de dentina.

O hipoclorito de sódio é capaz de neutralizar conteúdos tóxicos, apresenta baixa tensão superficial, ação lubrificante, desodorizante e

detergente, pois promove saponificação lipídica (BLOOMFIELD; MILES, 1979; ZAND *et al.*, 2010). Alguns estudos têm avaliado a capacidade de molhamento do hipoclorito de sódio (KUGA *et al.*, 2011, BUKIET *et al.*, 2012). Kuga *et al.* (2011), na tentativa de aumentar a penetrabilidade do NaOCl, associaram esta solução ao EDTA 17%, ácido cítrico 1% e ácido peracético 1%. Os resultados demonstraram que essas soluções ácidas não aumentam a profundidade de penetração do NaOCl no interior da dentina (KUGA *et al.*, 2011). Por outro lado, Bukiet *et al.* (2012) observaram que a adição de cloreto de benzalcônio ao hipoclorito de sódio aumentou a sua capacidade de molhamento sem afetar a quantidade de cloro livre, a citotoxicidade ou as propriedades antimicrobianas da mistura. Recentemente, uma revisão sobre os efeitos da diminuição da tensão superficial das soluções de hipoclorito de sódio, indicou que agentes surfactantes melhoram a penetração do hipoclorito de sódio no canal principal. Porém consideraram os dados insuficientes para tecer considerações sobre lubrificação, capacidade antimicrobiana e remoção de *debris* e lama dentinária (ROSSI-FEDELE *et al.*, 2013).

Entretanto, o hipoclorito de sódio apresenta algumas desvantagens, como corrosão dos instrumentos endodônticos, instabilidade ao armazenamento, efeito deletério em células endoteliais, ineficácia contra alguns microrganismos quando utilizado em baixas concentrações e toxicidade aos tecidos periapicais quando em altas concentrações (SELTZER; FARBER, 1994; FERRAZ *et al.*, 2001).

Além disso, o hipoclorito não atua na porção inorgânica do magma dentinário (SPANGBERG; ENGSTROM; LANGELAND, 1973). Torna-se necessária a utilização de uma solução quelante para uma eficaz remoção de *debris* e lama dentinária (ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos têm demonstrado diminuição da resistência à fratura radicular e da resistência de união de materiais restauradores à dentina (MORRIS *et al.*, 2001; FARINA *et al.*, 2011; RENOVATO *et al.*, 2013). O hipoclorito de sódio tem ação deletéria sobre os componentes orgânicos da dentina, especialmente o colágeno. Isto pode influenciar na penetração de monômeros resinosos através da estrutura da dentina desmineralizada

(ISHIZUKA *et al.*, 2001). Ele se dissocia em cloreto de sódio e oxigênio. O oxigênio nascente causa uma forte inibição da polimerização na interface dos materiais adesivos (NIKAIDO *et al.*, 1999). Canais radiculares irrigados com hipoclorito de sódio a 5% apresentaram menor resistência de união compósito-dentina em comparação com os dentes controle (RENOVATO *et al.*, 2013). Além disso, existe uma correlação entre o período de exposição da dentina ao hipoclorito e a força de adesão, de maneira tal que essa força aumenta à medida que diminui o tempo de exposição (ARI; YAŞAR; BELLÍ, 2003; SANTOS *et al.*, 2006). Além disso, estudos *in vitro* têm demonstrado que a exposição por longo tempo da dentina ao hipoclorito de sódio em altas concentrações pode ter efeito deletério na elasticidade desta dentina e em sua tensão flexural (MARENDING *et al.*, 2007; JOHN; LÖST; EL AYOUTI, 2013) podendo resultar na fratura dos dentes tratados endodonticamente (ZHANG *et al.*, 2010a).

Moreira *et al.* (2009), utilizando microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura, verificaram o efeito de diferentes substâncias químicas quando utilizadas isoladamente e combinadas sobre a estrutura dentinária bovina, especialmente sobre o colágeno, responsável pelas propriedades mecânicas da dentina. Sessenta raízes bovinas foram divididas em seis grupos de acordo com a substância química utilizada durante o preparo biomecânico: G1 - NaOCl 5,25% + EDTA 17%; G2 – gel de CHX 2%; G3 – NaOCl 5,25%; G4 - EDTA 17%; G5 - CHX 2% + EDTA 17% e G6 – soro fisiológico 0,9%. Após preparo, as raízes foram clivadas longitudinalmente, sendo cada metade avaliada por um dos métodos de análise. Os grupos tratados com NaOCl, apresentaram significativamente maior perda de colágeno próximo ao canal principal comparados com o grupo controle. Os grupos irrigados com CHX 2% e EDTA 17% isoladamente e em associação não apresentaram alterações estruturais quando comparados com o grupo controle (soro fisiológico). Por outro lado, o colágeno presente nas amostras tratadas com NaOCl 5,25% (G1 e G3) apresentou-se desorganizado próximo ao canal radicular. As imagens de microscopia de luz polarizada indicaram que houve uma perda de colágeno nessas regiões quando comparado aos outros grupos experimentais. As imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram

alteração estrutural da matriz inorgânica para todos os grupos que utilizaram EDTA 17%.

Wagner (2014) analisou através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), a ultraestrutura dentinária após a utilização de diferentes protocolos de irrigação. Trinta e nove raízes bovinas foram divididas em 13 grupos de acordo com o protocolo de irrigação empregado: água destilada (controle), soro fisiológico, soro fisiológico + EDTA 17%, soro fisiológico + irrigação ultrassônica passiva, soro fisiológico + irrigação ultrassônica passiva + EDTA 17%, NaOCl 2,5%, NaOCl 2,5% + EDTA 17%, NaOCl 2,5% + irrigação ultrassônica passiva, NaOCl 2,5% + irrigação ultrassônica passiva + EDTA 17%, CHX 2%, CHX 2% + EDTA 17%, CHX 2% + irrigação ultrassônica passiva, CHX 2% + irrigação ultrassônica passiva + EDTA 17%. Uma hemirraiz de cada espécime foi preparada e avaliada através de MEV e, uma de cada grupo, através de MET. A análise descritiva por MET evidenciou degeneração na estrutura orgânica dentinária, caracterizada pelo afinamento das fitas de colágeno, causada pelo NaOCl 2,5%, potencializado pelo EDTA e/ou irrigação ultrassônica passiva. A análise por MEV mostrou que a associação do NaOCl 2,5% com a irrigação ultrassônica passiva provocou maior erosão da dentina peritubular quando comparada com os demais grupos, seguida pela associação do NaOCl 2,5% e EDTA 17% e pelo NaOCl 2,5% associado com EDTA 17% e irrigação ultrassônica passiva. Nestes três grupos ocorreu também erosão na dentina intertubular. O NaOCl 2,5% proporcionou melhor limpeza das paredes do canal radicular bovino, causou erosão da dentina peri e intertubular e promoveu alterações ultraestruturais no colágeno dentinário, potencializado pelo EDTA 17% e/ou irrigação ultrassônica passiva.

2.2.2. Gluconato de Clorexidina (CHX)

O gluconato de clorexidina (CHX) vem ganhando espaço ao longo dos anos como substância química auxiliar no preparo dos canais radiculares. A CHX é uma base catiônica forte, incolor, inodora e com pH próximo ao neutro. A CHX pode ser utilizada na forma líquida ou gel. Apresenta-se mais estável na

forma de solução de gluconato de clorexidina. A forma de gel foi inicialmente pesquisada como medicação intracanal (SIQUEIRA; UZEDA, 1997) e apresentou bons resultados. O gel natrosol (hidroxietil celulose) é utilizado como base para a clorexidina e apresenta características não-iônicas, inerte e hidrossolúvel, utilizado amplamente em shampoos, géis e sabões. A principal vantagem da CHX gel quando comparada com a líquida é sua solubilização mais lenta, dessa maneira, permanece mais tempo em contato com os microrganismos, impedindo seu crescimento (GOMES *et al.*, 2001; DAMETTO *et al.*, 2005; FERRAZ *et al.*, 2007).

Além de efetivo agente antimicrobiano oral, possui amplo espectro de ação antimicrobiana, substantividade e baixa toxicidade como propriedades (FERRAZ *et al.*, 2001; VIANNA *et al.*, 2004). A CHX atua sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. Seu mecanismo de ação pode ser explicado devido a sua molécula, carregada positivamente, ser atraída e adsorvida à superfície bacteriana, por sua vez, carregada negativamente. Ataca a membrana citoplasmática bacteriana causando dano generalizado à estrutura da membrana devido ao comprometimento da bicamada fosfolipídica, permitindo a liberação de componentes citoplasmáticos, o que leva à morte celular (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Gomes *et al.* (2001) compararam a efetividade de diferentes concentrações de NaOCl (0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%) com CHX na forma de gel e solução (0,2%, 1% e 2%) na eliminação de *E. faecalis in vitro*. Uma diluição utilizando BHI caldo foi realizada e o tempo necessário para os irrigantes eliminarem as células bacterianas foi mensurado (10, 30 e 45 segundos; 1, 3, 5, 10, 20 e 30 minutos; e 1 e 2 horas). Todos os irrigantes foram efetivos na eliminação do *E. faecalis*, porém em diferentes tempos. Os irrigantes mais efetivos foram a solução de CHX nas concentrações de 0,2%, 1% e 2% e o NaOCl (5,25%). O tempo necessário para as soluções de CHX 0,2% e o gel de CHX 2% promoverem culturas negativas foi apenas 30 segundos e 1 minuto, respectivamente. O NaOCl 5,25% eliminou completamente o *E. faecalis* em período inferior à 30 segundos.

Vianna *et al.* (2004) investigaram a atividade antibacteriana *in vitro* da CHX na forma de gel e solução (0,2%, 1% e 2%) contra vários patógenos endodônticos e compararam com os achados relativos às diferentes concentrações de NaOCl (0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%). Um teste de diluição em caldo foi utilizado para verificar o efeito antibacteriano das soluções químicas testadas sobre os seguintes microrganismos: *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia*. As soluções de CHX em todas as concentrações e CHX 2% na forma de gel eliminaram microrganismos facultativos (*E. faecalis*) e aeróbicos (*S. aureus* e *C. albicans*) em 1 minuto ou menos. Apenas 15 segundos foram necessários para que todas as soluções de CHX eliminassem microrganismos gram-negativos estritamente anaeróbicos (*P. endodontalis*, *P. gingivalis*, e *P. intermedia*). A solução de CHX em todas as concentrações testadas eliminaram todos os microrganismos em, no máximo, 30 segundos. Ao passo que o gel de CHX precisou de 22 segundos (gel de CHX 2%) a 2 horas (gel de CHX 0,2%) para eliminar por completo os microrganismos testados. O NaOCl 0,5% e 1% levaram mais tempo que as demais concentrações (30 minutos e 20 minutos, respectivamente) para eliminar microrganismos facultativos e aeróbicos. O NaOCl 5,25% apresentou o melhor efeito antibacteriano, eliminando os mesmos microrganismos em 15 segundos. O mesmo tempo foi necessário para todas as concentrações de NaOCl eliminar microrganismos gram-negativos estritamente anaeróbicos. O efeito antimicrobiano das soluções irrigadoras testadas foi ranqueado do mais efetivo para o menos efetivo da seguinte maneira: NaOCl 5,25%, solução de CHX 2% e solução de CHX 1% (todos no mesmo nível), seguido pela solução de CHX 0,2% e gel de CHX 2%.

Dametto *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* o efeito antimicrobiano da CHX 2% na forma de gel e solução e do NaOCl 5,25% frente ao *E. faecalis*. Após contaminação de 80 pré-molares mandibulares durante sete dias, as amostras foram divididas em cinco grupos: solução de CHX 2%, gel de CHX 2%, solução de NaOCl 5,25%, água destilada e gel de natrosol. As amostras foram coletadas antes (S1), imediatamente após (S2) sete dias após (S3) o preparo biomecânico. A CHX 2% na forma de gel e solução reduziu significativamente as UFCs de *E. faecalis* em S2 e S3. O hipoclorito de sódio reduziu, da mesma

forma a quantidade bacteriana imediatamente após o preparo biomecânico (S2), porém não foi capaz de manter o canal radicular livre de microrganismos detectáveis após o período de sete dias.

Vianna *et al.* (2006) determinaram *in vivo* o grau de redução microbiana após o preparo biomecânico de canais radiculares com tecido pulpar necrótico utilizando o hipoclorito de sódio 2,5% e o gel de clorexidina 2%. Trinta e dois dentes monorradiculares foram divididos em dois grupos de acordo com a substância irrigadora utilizada. A análise da carga bacteriana foi realizada utilizando a reação em cadeia da enzima polimerase em tempo real (PCR em tempo real) por meio do SYBRGreen e TaqMan. A quantidade bacteriana foi, ainda, determinada através de métodos tradicionais de cultura. Como achados, os autores reportam redução substancial da carga microbiana em ambos os grupos (acima de 96%). Porém, a técnica de PCR em tempo real indicou maior quantidade microbiana antes e após o preparo biomecânico quando comparado pela técnica de cultura tradicional (UFCs). Além disso, o PCR em tempo real indicou maior redução bacteriana no grupo do NaOCl 2,5% (SYBRGreen 99,99%, TaqMan: 99,63%) em comparação com o grupo em que foi utilizado gel de CHX 2% (SYBRGreen 96,6%; TaqMan: 96,6%). De acordo com a técnica de cultura, 75% dos casos tratados com NaOCl 2,5% apresentaram canais livres de bactéria, ao passo que apenas 50% dos casos tratados com gel de CHX 2% obtiveram o mesmo desfecho. Como conclusão, os autores comentam que o NaOCl apresenta não apenas maior capacidade para eliminar microrganismos mas também é mais eficaz em remover células bacterianas do interior do canal radicular.

Roças e Siqueira (2011) utilizaram 47 dentes monorradiculares com tecido pulpar necrótico e periodontite apical assintomática para comparar os efeitos antibacterianos das soluções de CHX 0,12% e NaOCl 2,5%. As coletas foram realizadas previamente ao preparo biomecânico e imediatamente após o mesmo. A presença de microrganismos foi avaliada utilizando PCR convencional e a identificação bacteriana foi conduzida por meio de *chekboard* de captura reversa tendo como alvo 28 candidatos à patógenos endodônticos. Todas as amostras apresentaram reação de PRC positiva para presença de bactérias, mas negativas para o domínio *archea* e fungos. Não foram

observadas diferenças significativas entre NaOCl e CHX em todos os parâmetros testados incluindo a incidência de resultados negativos para a reação de PCR nas coletas pós-preparo (40% para o NaOCl e 47% para a CHX), a redução do número de espécies por canal e a redução dos níveis bacterianos. Dessa maneira, os autores concluíram que tanto o NaOCl 2,5% quanto a CHX 2%, ambos na forma de solução, reduziram significativamente o número de espécies bacterianas e seus níveis em canais radiculares infectados, sem diferenças significativas entre si.

Além da baixa toxicidade, apresenta efeito residual (substantividade) por, pelo menos, 48 horas (CHASSOT, POISL e SAMUEL, 2006). O mecanismo responsável pela substantividade da CHX decorre da sua capacidade de adsorção às superfícies, ligando-se à hidroxiapatita, sendo lentamente liberada à medida que a concentração no meio decresce, permitindo assim um tempo de ação prolongado (LOPES; SIQUEIRA; ELIAS, 2004).

Rosenthal *et al.* (2004) avaliaram a substantividade da clorexidina no interior do sistema de canais radiculares, bem como por quanto tempo esta solução permanece efetiva contra microrganismos. Raízes bovinas foram padronizadas em 8 milímetros. No grupo controle, as amostras foram tratadas com NaOCl 1% e EDTA 1mol/L e, em seguida, obturadas com guta percha e cimento AH26. No grupo experimental as amostras foram tratadas da mesma maneira, exceto pelo fato de a solução irrigadora utilizada ser a CHX 2% por 10 minutos previamente à obturação. Os espécimes de cada grupo foram subdivididos em 4 subgrupos de acordo com o tempo experimental referente à avaliação: 1 dias, 3 semanas, 6 semanas e 12 semanas. Após o período de armazenagem todos os espécimes foram seccionados longitudinalmente e raspas de dentina radicular foram removidas com brocas Peeso. Tais raspas foram agitadas com 700 µL de soro fisiológico por 5 horas para liberar a CHX. Após centrifugação o sobrenadante foi analisado com espectrofotometria UV. Para determinar se a CHX obtida a partir das amostras ainda apresentavam efeito antibacteriano, o extrato obtido a partir das amostras foram misturados com *E faecalis*. Após 1 dia de armazenagem, o extrato continha aproximadamente 0,0048% de CHX. Após 3, 6 e 12 semanas, os extratos

continham 0,0023%, 0,0016% e 0,0010% de CHX respectivamente. Os extratos do grupo da CHX apresentaram efeito antibacteriano altamente dependente do tempo decorrido entre o contato com a solução e o momento da coleta. Já os extratos do grupo tratado com NaOCl 1% não apresentaram efeito antimicrobiano independentemente do tempo experimental. Dessa maneira, os autores concluíram que a CHX fica retida na dentina radicular em quantidades efetivas para exercer efeito antimicrobiano por até 12 semanas.

Khademi *et al.* (2006) compararam a substantividade da CHX 2%, doxiciclina e NaOCl 2,6% na dentina bovina. Oitenta tubos de dentina preparados a partir de incisivos bovinos foram infectados *in vitro* por 14 dias com *E. faecalis*. As amostras foram divididas em cinco grupos: além das soluções testadas, um grupo controle positivo (tubos de dentina infectados) e um grupo controle negativo (tubos de dentina esterilizados) foram realizados. Raspas de dentina foram coletadas através do uso de brocas em diferentes tempos experimentais: 0, 7, 14, 21 e 28 dias após o contato com os irrigantes. Após cultura, o número de unidades formadoras de colônia foi contado. No tempo experimental 0 dias, o grupo NaOCl apresentou a maior ação antibacteriana dentre as soluções testadas. Entretanto, nos demais tempos experimentais a CHX apresentou o maior potencial antibacteriano. Dessa maneira, dentre as soluções testadas, a CHX apresentou maior substantividade que o NaOCl e a doxiciclina em um período experimental de até 28 dias.

Souza *et al.* (2012) avaliaram a substantividade da CHX 2% na forma de gel e solução no interior do sistema de canais radiculares. Quarenta e cinco dentes anteriores foram divididos em três grupos, de acordo com a substância utilizada no preparo biomecânico: CHX 2% na forma de gel, CHX 2% na forma de solução e água destilada. Os canais foram preparados até a lima tipo K 45 e, em seguida, clivadas longitudinalmente, originando 30 amostras por grupo. A partir daí foram subdivididas de acordo com o período decorrido entre o preparo (24 horas, 30 dias e 90 dias) e a análise cromatográfica líquida de alto desempenho para medir a quantidade de CHX (em micrômetros). Significativa quantidade de CHX, seja na forma de solução seja na forma de gel, permaneceu retida ao substrato dentinário independentemente do tempo de incubação. A solução de CHX apresentou maior substantividade que a CHX

gel, exceto pelos grupos incubados por 90 dias, onde os resultados de substantividade foram similares. Além disso, quantidades decrescentes de CHX foram observadas no substrato dentinário, sendo 24 horas > 30 dias > 90 dias para solução de CHX 2% e 24 horas > 30 dias ≥ 90 dias. Dessa maneira, os autores concluíram que a CHX 2% tanto na forma de gel quanto na forma de solução permanecem ligadas ao substrato dentinário por períodos de até 90 dias.

Sua principal desvantagem é que não atua como solvente orgânico (MARLEY *et al.* 2001, OKINO *et al.* 2004). Durante o preparo biomecânico, há a deposição de raspas de dentina provenientes da instrumentação nas paredes do canal radicular, formando uma camada amorfa fracamente aderida, denominada magma dentinário. O magma dentinário é potencialmente infectado e sua remoção permite, além da diminuição do conteúdo séptico dos canais, a penetração mais eficiente das soluções irrigadoras e da medicação intracanal no interior dos túbulos dentinários (TORABINEJAD *et al.*, 2002). Apesar do NaOCl e da CHX apresentarem eficácia sobre a parte orgânica do conteúdo dos canais radiculares, sua ação sobre a porção inorgânica do magma dentinário é ineficaz (GARBEROBLIO; BECCE, 1994). No sentido de complementar a ação destas substâncias, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na forma de solução aquosa 17% e pH 7,3 tem sido empregado na Endodontia. O EDTA reage com os íons cálcio presentes na dentina e forma quelatos de cálcio solúveis (VIOLICH; CHANDLER, 2010), podendo desmineralizar dentina em uma profundidade de 20-30 µm em um período de 5 minutos (VON DER FEHR; NYGAARD-OSTBY, 1963), porém com menor efeito quelante na porção apical do canal radicular (FRASER, 1974). No sentido de melhorar a eficiência quelante do EDTA na região apical, a agitação, seja ultrassônica ou manual, da solução irrigante é importante para melhorar a limpeza desta porção dos condutos (CARON *et al.*, 2010). Várias combinações entre EDTA e NaOCl foram pesquisadas em relação a remoção de magma dentinário e *debris* do interior dos canais radiculares (GOLDMAN *et al.*, 1982; CENGIZ; AKTENER; PISKIN, 1990).

2.2.3. Terapia fotodinâmica na Endodontia

Lidar com microrganismos persistentes é um desafio, especialmente em casos em que o canal radicular foi preparado e sanificado adequadamente para os procedimentos de irrigação e colocação da medicação intracanal (COLDERO *et al.*, 2002). As técnicas endodônticas atuais que objetivam eliminar a infecção do sistema de canais radiculares incluem o preparo e modelagem do canal principal, irrigação com soluções antibacterianas, medicação intracanal e obturação tridimensional do sistema de canais. De maneira geral, as diferentes técnicas resultam em índices de sucessos similares, porém cerca de 2% a 3% dos casos podem falhar e, se forem considerados os casos de retratamento endodôntico, estes índices são ainda maiores (PEAK *et al.*, 2001; RICUCCI *et al.*, 2009).

Nesse sentido, vários sistemas a laser têm sido pesquisados como coadjuvantes nos procedimentos de desinfecção dos condutos radiculares (MEIRE *et al.*, 2009). Acredita-se que o laser pode ser capaz de atingir áreas inacessíveis como região de istmos, canais laterais e túbulos dentinários (MEIRE *et al.*, 2009). De fato, túbulos dentinários efetivamente atuam como canais de fibra ótica, redirecionando a luz em múltiplas direções (ODOR *et al.*, 1996). Estes procedimentos utilizando luzes com um comprimento de onda específico são denominados de terapia fotodinâmica ou desinfecção fotoativada (PDT). Atuam através da ativação de um corante fotoativo não-tóxico (foto-sensibilizador) quando em presença de oxigênio (SOUZA *et al.*, 2010). O envolvimento da luz e do oxigênio no processo fotodinâmico foi demonstrado pela primeira vez em 1904 por Hermann Von Tappeiner. A partir da absorção de um fóton de luz, uma molécula do foto-sensibilizador (azul de toluidina, azul de metileno) em seu estado singleto original (S) é excitada (S^{*}). Porém, o estado de excitação da molécula do foto-sensibilizador é muito fugaz para permitir interações com as moléculas à sua volta (DOUGHERTY *et al.*, 1998; KONAN *et al.*, 2002). O estado S^{*} decai rapidamente para o estado S emitindo fótons como energia luminosa (fluorescência) ou através da conversão interna de energia luminosa em calor. De maneira alternativa, a molécula pode se converter em estado excitado tripleto (T^{*}). Neste estado, a molécula pode emitir fluorescência retornando ao seu estado S ou pode reagir

de duas maneiras utilizando oxigênio. Tipo I envolve reações de eletrotransferência a partir do estado tripleto com a participação de um substrato para produzir radicais livres que podem reagir com oxigênio para produzir espécies citotóxicas como superóxidos, íons hidroxilas e radicais livres derivados de lipídios (ATHAR *et al.*, 1988). O mecanismo chamado tipo II envolve transferência de energia a partir do estado excitado tripleto do foto-sensibilizador para o estado tripleto básico da molécula de oxigênio que, por sua vez, produz oxigênio excitado na forma singleto, capaz de oxidar diversas moléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (REDMOND; GAMLIN, 1999). O oxigênio singleto, portanto, é o maior responsável pelo efeito antibacteriano da desinfecção fotoativada e é capaz de se difundir a uma distância de, aproximadamente, 100 nm (MOAN, 1990).

De maneira simplificada, a transferência de energia do foto-sensibilizador ativado para o oxigênio disponível origina íons oxigênio altamente reativos e radicais livres, que podem produzir injúria e destruição de microrganismos através de danos à moléculas celulares essenciais, incluindo proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos (KONOPKA; GOSLINSKI, 2007). A eliminação de microrganismos promovida pela PDT age da seguinte forma: (1) o agente foto-sensibilizador se liga a membrana celular do microrganismo, (2) a irradiação luminosa, com um comprimento de onda específico, combinada com o pico de absorção do foto-sensibilizador leva à formação de oxigênio singleto (altamente reativo) e (3) morte bacteriana pela destruição da parede bacteriana causada pelo oxigênio singleto. Ainda que o poder de oxidação do oxigênio singleto tenha se mostrado indutor dos efeitos antibacterianos, os detalhes da relação entre quantidade de oxigênio singleto e o grau de efeito antibacteriano ainda não está bem estabelecido (KOMINE; TSUJIMOTO, 2013).

Souza *et al.* (2010) compararam a utilização do azul de toluidina e do azul de metileno no efeito antibacteriano da PDT associada ao NaOCl em duas concentrações (2,5% e 0,85%) e não observaram diferenças entre os dois foto-sensibilizadores. A concentração ideal de azul de metileno necessária para proporcionar a maior liberação de oxigênio singleto e, por consequência, os

melhores efeitos antibacterianos varia entre 0,001% e 0,01% (KOMINE; TSUJIMOTO, 2013).

Foschi *et al.* (2007) avaliaram o efeito da PDT com azul de metileno em 64 canais radiculares contaminados com *E. faecalis in vitro*. O processo de contaminação foi confirmado através de microscopia eletrônica de varredura 3 dias após a inoculação. Após irrigação dos canais radiculares com azul de metileno por 5 minutos, estes foram expostos à luz emitida por laser de diodo e fibra óptica. Após aplicação do laser o conteúdo do canal foi coletado e as amostras diluídas de maneira seriada e cultivadas em ágar sangue. PDT promoveu redução bacteriana de 77,5%. O foto-sensibilizador azul de metileno e o laser de diodo quando utilizados isoladamente reduziram a viabilidade bacteriana em 19,5% e 40,5%, respectivamente.

Bergmans *et al.* (2008) testaram o efeito antibacteriano da desinfecção fotoativada sobre alguns patógenos inoculados *in vitro* em canais radiculares. Trinta e oito canais radiculares foram preparados até o instrumento tipo K 30 e conicidade 10%, autoclavados e divididos em três grupos (N = 12), de acordo com o tipo de microrganismo inoculado (*Streptococcus anginosus*, *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*), e dois controles negativos. Os diferentes grupos experimentais foram tratados de três maneiras: PDT, controle para o laser, controle para o corante e controle positivo. As UFCs foram contadas após cada modalidade de tratamento e as mudanças estruturais das células bacterianas foram avaliadas utilizando microscopia eletrônica de varredura ambiental nas superfícies dentinárias inoculadas antes (1, 2 e 6 dias de incubação) e após os tratamentos testados. O tratamento com PDT reduziu de maneira significativa a carga bacteriana, eliminando 93,8% do *S. anginosus*, 88,4% do *E. faecalis* e 98,5% do *F. nucleatum*. O laser quando utilizado isoladamente não teve efeito na carga bacteriana, bem como o corante sem a aplicação do laser. As imagens de microscopia eletrônica de varredura ambiental mostraram que células individuais ou camadas bacterianas simples foram facilmente eliminadas com PDT. Porém, quando o biofilme estava presente (2 e 6 dias para *E. faecalis* e 6 dias para *S. anginosus*) a eliminação bacteriana foi substancialmente reduzida em camadas mais profundas. De acordo com os autores, a desinfecção fotoativada atua como um

complemento aos protocolos de desinfecção já existentes e a interação entre laser e o corante propicia um efeito antibacteriano de amplo espectro.

Bago *et al.* (2013) avaliaram o efeito antimicrobiano do laser diodo de alta potência, da desinfecção fotoativada (PDT), da irrigação convencional e da ativação sônica do NaOCl 2,5% frente ao *E. faecalis*. Cento e vinte canais de dentes monorradiculares foram preparados com sistema ProTaper, esterilizados e contaminados, posteriormente com *E. faecalis* por 7 dias. Os espécimes foram divididos de acordo com o protocolo de desinfecção utilizado: G1 – irrigação convencional com 5 mL de NaOCl 2,5% e agulha 30G (60 segundos), G2 - agitação sônica do NaOCl com o sistema EndoActivator (60 segundos), G3 - laser diodo no modo pulsado com fibra óptica (2W, 3 ativações de 20 segundos), G4 – canais foram preenchidos com azul de toluidina e irradiados com laser de alta potência e fibra óptica (PDT) (100 mW, 60 segundos), G5 – canais preenchidos com cloreto de fenotiazina e irradiados com laser de alta potência e fibra óptica (EndoProbe) (PDT) (100 mW, 60 segundos). O padrão de colonização foi visualizado através da microscopia eletrônica de varredura. Amostras foram obtidas após o preenchimento dos condutos com soro fisiológico previamente e posteriormente aos protocolos de desinfecção. O número de bactérias em cada amostra foi determinado pela contagem de UFCs. A presença e a ausência de *E. faecalis* foi determinada pela reação em cadeia da enzima polimerase (PCR convencional). Houve uma redução significativa da população bacteriana após os protocolos utilizados. A PDT, utilizando ambos os sistemas a laser, e a ativação sônica do NaOCl foram significativamente mais efetivos que a irradiação com laser diodo de alta potência e a irrigação convencional com NaOCl em reduzir a quantidade de UFCs. Laser de diodo de alta potência e a irrigação convencional com NaOCl apresentaram similar efeito antibacteriano. A PDT (G4 e G5) e o sistema EndoActivator foram mais eficientes em reduzir a infecção intracanal que o laser de diodo e a irrigação convencional com NaOCl 2,5%.

Estudos *in vivo* também têm avaliado o efeito da PDT na desinfecção dos canais radiculares (GARCEZ *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012).

Garcez *et al.* (2010) conduziram um estudo que avaliou o efeito antimicrobiano da PDT associada ao tratamento endodôntico convencional de pacientes com tecido pulpar necrótico e microbiota resistente a terapia antibiótica prévia. Todos os dentes incluídos no estudo apresentavam sinais e sintomas de periodontite apical crônica e lesão óssea periapical visível radiograficamente. Alguns pacientes apresentavam dor à percussão vertical e edema local. Trinta dentes anteriores de 21 pacientes foram selecionados e as amostras coletadas após acessar o canal, após preparo biomecânico e após PDT. As amostras foram cultivadas em caldo nutriente esterilizado para posterior identificação microbiana por meio de características fenotípicas e análise por meio de antibiograma. Todos os pacientes apresentaram pelo menos um microrganismo resistente aos antibióticos. Para aplicação da PDT foi utilizada a clorina polietilenimina como fotossensibilizante e um aparelho de laser diodo. O preparo biomecânico produziu uma redução significativa no número de espécies microbianas, mas apenas três dentes estiveram livres de bactéria, enquanto que aplicação da PDT após o preparo dos canais resultou na eliminação de todas as espécies resistentes e todos os canais apresentaram-se livres de bactérias.

Miyabe *et al.* (2011) avaliaram o efeito da PDT sobre vinte cepas de *Staphylococcus* isoladas a partir da cavidade oral humana. Trinta testes foram realizados para cada cepa bacteriana, originando 600 avaliações. Cada cepa bacteriana foi submetida às seguintes condições experimentais (n = 6): G1 - azul de metileno + laser arsênio-gálio-alumínio (AsGaAl) (660 nm, poder de 35 mW, energia de 10 J); G2 - azul de metileno sem laser; G3 - soro fisiológico e aplicação do laser seguindo os mesmos parâmetros do G1; G4 - tratamento com ciprofloxacina; e G5 - soro fisiológico sem aplicação do laser. Alíquotas de 0,1 µL de suspensão bacteriana foram dispensadas individualmente em placas de cultura celular de 96 poços. Em seguida, 0,1 µL do azul de metileno foram adicionados nos grupos 1 e 2; 0,1 µL de soro fisiológico nos grupos 3 e 5 e 0,1 µL de ciprofloxacina no grupo 4. Após agitação das placas por 5 minutos, os grupos que receberam aplicação do laser foram irradiados (G1 e G3). Após diluição seriada, alíquotas de 0,1 µL das diluições foram semeadas em placas com BHI ágar. Uma redução significativa na contagem de UFCs foi observada

para os grupos submetidos à PDT na presença do azul de metileno como foto-sensibilizador, superior àquela observada nos demais grupos.

Silva *et al.* (2012) avaliaram a resposta dos tecidos apical e periapical de cachorros com periodontite apical após tratamento endodôntico em sessão única. Após a indução da periodontite apical em 60 dentes de cães, estes foram instrumentados e divididos em 4 grupos: G1 - aplicação da PDT, obturação do canal e restauração (PDT+/OC+); G2 - PDT, sem obturação do canal radicular e restauração definitiva (PDT+/OC-); G3 - sem aplicação da PDT, obturação do canal após o preparo biomecânico e restauração (PDT-/OC+); e G4 - sem aplicação da PDT e sem obturação do canal radicular, apenas restauração definitiva foi realizada (PDT-/OC-). O corante utilizado nesta pesquisa foi utilizado o cloreto de fenotiazina. Após 90 dias os animais foram sacrificados e suas mandíbulas e maxilas foram coradas com hematoxilina-eosina e examinadas através de microscopia de luz. A análise descritiva foi realizada baseada no tecido mineralizado apical recém-formado, infiltrado inflamatório periapical, espessura do ligamento periodontal apical e reabsorção tecidual mineralizada. Já a análise quantitativa baseou-se no tamanho de lesão periapical e no número de células inflamatórias. O tamanho da lesão periapical não diferiu entre os grupos PDT+/OC+, PDT+/OC- e PDT-/OC+. O número de células inflamatórias, por sua vez, foi significativamente menor nos grupos que utilizaram a desinfecção fotoativada quando comparados com os grupos que não a utilizaram. A obturação do canal radicular não foi determinante para alterar número de células inflamatórias presentes. Além disso, os grupos que aplicaram PDT apresentaram região periapical moderadamente/severamente alargada, moderada neoangiogênese e fibrogênese e as menores áreas de lesão periapical. Diante dos achados, os autores da pesquisa afirmam que a PDT pode ser um importante auxiliar no processo de desinfecção dos canais radiculares em dentes com periodontite apical crônica submetidos à tratamento endodôntico em sessão única.

Alguns autores têm avaliado a influência da utilização da fibra óptica para aplicação da desinfecção fotoativada (NUNES *et al.*, 2011; GARCEZ *et al.*, 2013). Nunes *et al.* (2011) avaliaram a efetividade da PDT com e sem a utilização de fibra óptica (FO) na redução de *E. faecalis* inoculados em 60

dentes extraídos. Os dentes foram divididos em seis grupos: controle positivo – sem tratamento; NaOCl – tratamento convencional com NaOCl 1%, PDT/FO⁹⁰ – PDT/FO por 90 segundos, PDT/FO¹⁸⁰ – PDT/FO por 180 segundos, PDT⁹⁰ – PDT sem fibra óptica por 90 segundos e PDT¹⁸⁰ – PDT sem fibra óptica por 180 segundos. A PDT foi aplicada com potência de 90 mW e comprimento de onda de 660 nm. O foto-sensibilizador utilizado foi o azul de metileno na concentração de 0,01% dissolvido em água deionizada. As amostras foram coletadas antes e após os procedimentos e a quantidade de UFCs foi determinada. A maior redução de microrganismos foi obtida após irrigação com 10 ml de NaOCl 1% (99,99%) e nos grupos PDT/FO¹⁸⁰ (99,65%) PDT¹⁸⁰ (99,64%). Os grupos em que foi realizada PDT apresentaram similar potencial antimicrobiano, sem diferença entre eles, independentemente do tempo de aplicação e do uso da fibra óptica.

Por outro lado, Garcez *et al.* (2013) investigaram a relevância da utilização da fibra óptica quando da realização da PDT associada ao tratamento endodôntico. Após realização do tratamento endodôntico convencional, 50 dentes foram esterilizados e os canais contaminados com *E. faecalis* por três dias. Os espécimes foram divididos em 5 grupos: G1 – aplicação da PDT com ponta do laser com área de 0,04 cm², G2 – PDT com ponta do laser com área de 0,028 cm², G3 – dentes com coroa, irradiados com ponta do laser com área de 0,04 cm², G4 - dentes com coroa, irradiados com ponta do laser com área de 0,028 cm² e G5 – dentes com coroa e irradiados com fibra óptica de 200 µm de diâmetro acoplada ao laser diodo. As coletas microbianas foram realizadas em três momentos: antes da abordagem no canal radicular, após tratamento endodôntico convencional e após aplicação da PDT. Os grupos 1 e 2 apresentaram redução microbiana de 99%, os grupos 3 e 4, 85% e 97%, respectivamente. E o grupo 5 apresentou redução de 99,99%. Os resultados sugerem que o uso da PDT utilizando fibra óptica, associada ao tratamento endodôntico convencional, é mais eficaz na eliminação de *E. faecalis* que a utilização direta do laser na cavidade de acesso.

A desinfecção fotoativada parece exercer efeito complementar ao tratamento endodôntico convencional (GARCEZ *et al.*, 2010; RIOS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012,). Quando utilizada isoladamente exerce efeito

antibacteriano, porém não de mesma magnitude das soluções irrigadoras comumente utilizadas (FIMPLE *et al.*, 2008; MEIRE *et al.*, 2009).

Fimple *et al.* (2008) investigaram o efeito da PDT utilizando o azul de metileno sobre biofilme multi-espécies (*Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum subspecies nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*) em canais infectados *in vitro*. A presença dos microrganismos residuais foi detectada usando sondas de DNA. Os canais radiculares foram preenchidos com azul de metileno por 10 minutos e, em seguida, expostos à luz vermelha com comprimento de onda de 665 nm e energia de 30 J/cm² utilizando fibra óptica para distribuir uniformemente a luz no interior do canal. A microscopia eletrônica de varredura confirmou a presença de biofilme após três dias de incubação. O valor médio das contagens com sondas de DNA para *P. gingivalis*, *A. israelii*, *F. nucleatum subspecies nucleatum* e *P. intermedia* foi de 5×10^5 , 10^5 , 4.3×10^5 e 4.5×10^5 , respectivamente. A PDT conseguiu reduzir em até 80% as UFCs. Cabe ressaltar que neste estudo os autores não utilizaram soluções antimicrobianas como o NaOCl e a CHX previamente à aplicação da desinfecção fotoativada.

Rios *et al.* (2011) avaliaram o potencial antimicrobiano da PDT associada ao azul de toluidina (AT) após desinfecção convencional com NaOCl 6% de canais contaminados com *E. faecalis* por duas semanas. Os dentes foram divididos em 5 grupos: NaOCl – irrigação com 1 mL de NaOCl 6% por 30 segundos, AT – preenchimento dos canais com azul de toluidina por 3 segundos, LED – canais preenchidos com soro fisiológico e ativados com LED e fibra óptica por 30 segundos, AT/LED – canais foram preenchidos com azul de toluidina e a aplicação da PDT realizada por 30 segundos, e NaOCl/AT/LED - desinfecção combinada dos grupos NaOCl e AT/LED. Raspas de dentina foram coletadas a partir do canal radicular e a quantidade de UFCs foi determinada. A taxa de sobrevivência bacteriana no grupo NaOCl/AT/LED foi inferior aos demais grupos (0,1%), seguido pelo grupo NaOCl (0,66%) e AT/LED (2,9%), todos com diferenças significativas entre si. Baseados nos resultados, os autores defendem o potencial antimicrobiano do azul de toluidina associado ao LED como um auxiliar no processo de desinfecção dos canais radiculares após o uso de NaOCl.

A comparação da eficácia de alguns sistemas à laser com o NaOCl 2,5% na eliminação de *E. faecalis* de canais radiculares contaminados *in vitro* foi realizada por Meire *et al.* (2009). A irradiação à laser com lasers de neodímio dopado-ítrio-alumínio-granada (Nd:YAG) e de potássio-titânio-fosfato (KTP) e a terapia fotodinâmica com laser de diodo (PDT) foram utilizados neste estudo. Observou-se que PDT e NaOCl 2,5% resultaram em redução significativa do número de células microbianas, ao passo que a irradiação à laser (Nd:YAG e KTP) não exerceram efeito antibacteriano tanto em suspensão aquosa quanto em modelo de dentina infectada (MEIRE *et al.*, 2009).

Em 2011, Ng *et al.*, (2011) conduziram um estudo *ex vivo* que utilizou métodos moleculares para identificação microbiana (checkboard) em dentes recém extraídos e submetidos à preparo biomecânico com NaOCl 6% com e aplicação posterior da PDT (PBM/PDT) ou apenas preparo biomecânico (PBM). Trinta e quatro pacientes doaram seus dentes recém extraídos totalizando vinte e seis dentes para o grupo PBM (49 canais) e vinte seis para o grupo PBM/PDT (52 canais). Os protocolos de desinfecção eram realizados em até 30 minutos após a extração. O preparo biomecânico era realizado com instrumentos rotatórios (Profile) de calibre apical igual a 0,465 mm para canais distais de molares inferiores, palatinos de molares superiores e para dentes monorradiculares. Canais mesiais de molares inferiores e vestibulares de molares superiores eram preparados até instrumento com diâmetro apical de 0,36 mm. A PDT foi realizada com azul de metileno e a aplicação do laser realizada em duas vezes com tempo de exposição de 2,5 minutos. As coletas foram realizadas previamente aos protocolos de desinfecção e imediatamente após os protocolos de desinfecção. A associação PBM/PDT reduziu significativamente mais a frequência de canais com contagem positiva para microrganismos. Após PBM/PDT, 45 dos 52 canais (86,5%) não apresentaram UFCs, após PBM 24, dos 49 canais (49%) não apresentaram UFCs. Espécies bacterianas no interior dos túbulos dentinários foram detectadas em 77% no grupo PBM e em 51% no grupo PBM/PDT ($P < 0,05$).

Recentemente, Stojicic *et al.* (2013) compararam os efeitos antibacterianos da PDT convencional com um novo modelo de PDT que envolve adição de algumas soluções bactericidas em baixa concentração ao

azul de metileno. Os autores concluíram que a PDT modificada foi superior à PDT convencional contra *E. faecalis* e contra placa bacteriana na forma planctônica e na forma de biofilme. A otimização da concentração do azul de metileno e a adição de EDTA com peróxido de hidrogênio ou clorexidina ao foto-sensibilizador seguida da irradiação a laser resultaram em maior erradicação de bactérias planctônicas e em um período de tempo muito menor. Além disso, a PDT modificada foi de duas à oito vezes mais efetiva contra biofilmes bacterianos que o NaOCl 1%, 2% e que a CHX 2%.

Por outro lado, de acordo com Muhammad *et al.*, (2014), PDT não foi efetiva em eliminar biofilmes induzidos *in vitro* por sete dias, ao contrário da combinação irrigação ultrassônica passiva (PUI) do EDTA e irrigação convencional com NaOCl 2,6%. Trinta dentes foram preparados e divididos em três grupos de acordo com o método de desinfecção: sistema de desinfecção fotoativado Aseptim Plus® (LED), laser diodo e azul de toluidina como foto-sensibilizador e irrigação ultrassônica do EDTA e irrigação convencional com NaOCl 2,6% como grupo controle. Previamente aos protocolos de desinfecção, os canais foram contaminados com *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. O tempo de trabalho estabelecido para os grupos experimentais foi de 3 minutos. A presença e ausência de biofilme foi avaliada sob condições aeróbicas e anaeróbicas. As amostras foram semeadas em ágar sangue de carneiro 5%. Em seguida, 5 linhas paralelas foram criadas no ágar e repetidas por três vezes, originando 5 áreas de crescimento, classificadas como escores. Se o crescimento ocorreu apenas no poço, foi classificado como escore 1, se atingiu a primeira linha demarcada, escore 2, se atingiu a segunda, escore 3 e assim por diante, até o escore máximo de 5. Três dentes por grupo foram cultivados em condições anaeróbicas. Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas previamente e posteriormente aos protocolos de desinfecção. Não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos após aplicação do Aseptim Plus® (LED) e do laser de diodo. Os escores obtidos após análise das culturas indicaram os maiores crescimentos para estes grupos. Em contrapartida, o grupo onde foi aplicada PUI no EDTA e irrigação com NaOCl 2,6% apresentou os melhores resultados, apresentando redução significativa

da carga bacteriana e destruição do biofilme microbiano. Além disso, o grupo PUI/NaOCl apresentou paredes dentinárias livres de biofilme, enquanto os demais grupos apresentaram agrupamentos bacterianos isolados ainda presentes.

Zand *et al.* (2014) compararam o efeito da PDT e do NaOCl na concentração de 1% e 2,5% sobre biofilme mono-espécie de *E. faecalis* em diferentes estágios de desenvolvimento. Biofilmes de quatro, seis e oito semanas foram submetidos às seguintes abordagens: solução salina fosfatada, PDT, NaOCl 1% e NaOCl 2,5%. Raspas de dentina foram suspensas e usadas para contagem das UFCs. A PDT e o NaOCl 2,5% eliminaram completamente os biofilmes de *E. faecalis* independentemente do estágio de maturação destes biofilmes. Por outro lado, NaOCl 1% resultou em 81,88%, 85,73% e 78,72% de redução das contagens bacterianas nos biofilmes de quatro, seis e oito semanas, respectivamente. A solução salina fosfatada apresentou o menor percentual de redução microbiana.

Ainda em 2014, Ghinzelli *et al.* avaliaram a influência da ativação ultrassônica na terapia fotodinâmica sobre o sistema de canais infectado com *E. faecalis*. Após preparo de 50 dentes monorradiculares até instrumento tipo K #60, os espécimes foram autoclavados e, posteriormente contaminados com *E. faecalis* por 30 dias. Os grupos experimentais foram: G1 – controle (ausência de procedimento), G2 – fotossensibilizante (azul de metileno 0,01%), G3 - ativação ultrassônica do azul de metileno, G4 – aplicação da PDT e G5 – ativação ultrassônica do azul de metileno e PDT. Testes microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura foram utilizados para avaliar e ilustrar, respectivamente a efetividade dos protocolos testados. Nenhum dos protocolos testados foi capaz de eliminar por completo os microrganismos do interior do canal radicular. A associação da ativação ultrassônica e da PDT promoveu maior desinfecção. A aplicação convencional da PDT apresentou média de contaminação inferior àquela verificada em G1, G2 e G3. As maiores contagens microbianas foram verificadas no grupo controle. As imagens em MEV referentes ao grupo controle indicaram *E. faecalis* cobrindo por completo as paredes do canal radicular e a entrada dos túbulos dentinários. Não houve diferença nas imagens em G2 e G3 no padrão de contaminação, onde o *E.*

faecalis ocupou áreas significativas da parede do canal e da entrada dos túbulos dentinários. A aplicação da PDT (G4) demonstrou redução significativa do microrganismo em comparação com os grupos anteriores. Por fim, após a associação da ativação ultrassônica do azul de metileno e da aplicação da PDT foram observadas as menores quantidades de *E. faecalis* na parede do canal e na entrada dos túbulos dentinários.

Como desvantagens da terapia fotodinâmica pode ser citada a quantidade de calor liberada que, apesar de variável, apresenta potencial para carbonizar a dentina, anquilosar raízes, dissolver cimento e causar reabsorção radicular, bem como necrose periapical (BAHCALL *et al.*, 1992; HARDEE *et al.*, 1994). Estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando terapia fotodinâmica têm mostrado que esta técnica tem potencial para maximizar a desinfecção do canal radicular após preparo químico-mecânico utilizando NaOCl como solução irrigadora (BONSOR *et al.*, 2006; SOUKOS *et al.*, 2006; WILLIAMS; PEARSON; COLLES, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007; BERGMANS *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2008; GARCEZ *et al.*, 2008; MEIRE *et al.*, 2009).

2.3. Metodologias para detecção da presença de microrganismos

Para avaliar a presença e a viabilidade de microrganismos no interior do canal radicular, têm sido empregadas algumas metodologias.

2.3.1 Método de cultura microbiana

O cultivo de microrganismos, através de um meio de crescimento artificial, possui grande importância para avaliação microbiológica de doenças infecciosas, especialmente infecções odontogênicas (DAHLEN; MOLLER, 1992).

Este método apresenta como vantagens: amplo espectro, possibilitando identificação microbiana de várias espécies em uma mesma amostra clínica; fornece cepas para a realização de testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos e permite o estudo da fisiologia e patogenicidade microbiana (SIQUEIRA; ROÇAS, 2005). Além disso, proporciona a identificação da

viabilidade dos microrganismos cultiváveis. Em contrapartida, apresenta como desvantagens o tempo necessário para cultivo de algumas bactérias anaeróbias fastidiosas; podem apresentar baixa sensibilidade e especificidade, dependendo, inclusive, da experiência do microbiologista; e apresenta dependência do meio de transporte da amostra (SIQUEIRA; ROÇAS, 2005a).

Cerca de 40-75% da microbiota humana, em diferentes sítios, é composta por bactérias ainda não cultivadas (SUAU *et al.*, 1999; PASTER *et al.* 2001; HAYASHI; SAKAMOTO; BENNO, 2002). A dificuldade de cultura de determinados microrganismos está relacionada a alguns aspectos tais como: ausência de determinados nutrientes ou de fatores de crescimento no meio de cultura artificial; toxicidade do próprio meio de cultura, prejudicando o crescimento bacteriano; produção de substâncias inibitórias ao microrganismo alvo por outras espécies; dependência metabólica entre diferentes espécies; ruptura de sistemas de intercomunicações bacterianas induzidas pela separação de bactérias no meio de cultura sólido (WADE, 2004).

2.3.2. Método de fluorescência associado à microscopia confocal a laser

Existem diversos indicadores de viabilidade celular que podem ser utilizados, em nível de uma única célula, sem necessidade de cultura. Estes indicadores se baseiam em moléculas fluorescentes que podem ser detectadas por microscopia de epifluorescência e por citometria de fluxo ou de estado sólido.

Na última década, novos corantes fluorescentes e equipamentos sensíveis para sua detecção foram desenvolvidos para melhorar métodos de separação de células vivas e mortas (SHEN *et al.*, 2010). Procedimentos que permitam o acúmulo intracelular seletivo de corantes consistem em métodos eficazes para determinar a quantidade de biofilme e estimar a viabilidade de microrganismos.

Del Carpio-Perochena *et al.* (2011) avaliaram a dissolução de biofilme e a capacidade de limpeza de diferentes soluções irrigadoras frente à biofilmes induzidos intraoral. Para tanto, os autores utilizaram o corante laranja de

acridina. Este corante permite determinar a quantidade de biofilme através da microscopia confocal a laser, bem como os perfis bacterianos na estrutura dentinária. Como desvantagem, o laranja de acridina não permite a análise tridimensional do biofilme formado, apenas a análise da superfície do biofilme. Ainda, os programas de computadores designados para análise de biofilme não são capazes de realizar a quantificação bacteriana marcada por este corante em função de ele também marcar a estrutura dentinária.

Por outro lado, kits de viabilidade bacteriana como o LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Molecular Probes, Eugene, OR) são capazes de identificar células bacterianas viáveis e não viáveis. Possuem dois marcadores, iodeto de propídio e SYTO9, ambos capazes de corar ácidos nucleicos. A fluorescência verde do SYTO9 é capaz de penetrar em todas as células e é usada para fazer a contagem total do número de células, enquanto que a fluorescência vermelha, obtida pelo iodeto de propídio, é capaz de penetrar apenas em células com membranas citoplasmáticas comprometidas. Embora o kit permita apenas diferenciação entre bactérias com membrana citoplasmática intacta ou comprometida, ele é frequentemente utilizado para diferenciar células ativas e mortas (MA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012; DU *et al.*, 2014). Estes kits são rápidos e de fácil uso, e permitem não apenas contar o número de células viáveis, como também o total de células presentes (Shen *et al.*, 2010).

Sabe-se que bactérias podem responder a determinadas situações ativando mecanismos de sobrevivência (Roszak e Colwell, 1987). A falta de nutrientes e condições extremas estimula uma resposta bacteriana, através da diminuição de seu metabolismo, que permite a manutenção de sua vitalidade. A sua presença por longos períodos em estado cultivável, porém de não-crescimento é chamada de carência nutricional (Oliver, 2005). Os microrganismos podem, ainda, se apresentar em um estado viável, porém não-cultivável (Paludan-Muller *et al.*, 1996; Oliver, 2005). Nesta situação, deixam de crescer em meios de rotina bacteriológica em que normalmente cresceriam e formariam colônias. Entretanto, estão vivos e capazes de retomar sua plena atividade metabólica se o acesso aos nutrientes for reestabelecido. Assim, métodos de cultura possivelmente não indicariam a presença dos

microrganismos neste estado metabólico, ao contrário dos indicadores fluorescentes de viabilidade celular.

Inúmeros trabalhos têm utilizado a microscopia confocal a laser associada ao iodeto de propídio e ao SYTO9 para verificar capacidade antibacteriana de soluções irrigadoras (MA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012; DU *et al.*, 2014), de diferentes medicações intracanal (LEE *et al.*, 2013; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013) e a capacidade de dissolução de biofilme induzida pelos mais diversos irrigantes e suas associações (SHEN *et al.*, 2009; HOHSCHIEDT *et al.*, 2014).

Shen *et al.* (2010) compararam duas metodologias para avaliar viabilidade de bactérias em diferentes estágios de crescimento quando organizadas em biofilme. Os métodos utilizados foram a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e o método LIVE/DEAD Backlight. Ambos os métodos mostraram-se eficazes na detecção de viabilidade bacteriana quando em um meio com a presença de nutrientes, ausência e, novamente, com nutrientes disponíveis. Além disso, foi observada uma relação direta entre os métodos testados para viabilidade bacteriana.

Um ano mais tarde, Ordinola-Zapata *et al.* (2011) avaliaram, *in vivo*, o volume residual de bactérias vivas, a espessura do biofilme e a cobertura do substrato por biofilmes mistos tratados com diferentes soluções irrigadoras através técnica LIVE/DEAD por microscopia confocal a laser. A clorexidina 2%, o ácido cítrico 10%, o EDTA 17% e o soro fisiológico não foram capazes de modificar a viabilidade e a arquitetura do biofilme. A única solução capaz de modificar estruturalmente o biofilme e a viabilidade das bactérias foi o hipoclorito de sódio 1%.

Wang; Shen; Haapasalo (2012) avaliaram os efeitos antibacterianos de diferentes irrigantes sobre biofilme mono-espécie (*E. faecalis*) jovens e maduros utilizando microscopia confocal a laser e os corantes iodeto de propídio e SYTO9. O conteúdo bacteriano foi introduzido no interior dos túbulos dentinários por centrifugação. Após períodos de um dia e três semanas de incubação, 40 espécimes de dentina infectada foram expostos às seguintes

soluções por um e três minutos: NaOCl 2%, NaOCl 6%, CHX 2% e QMix. Significativamente menos bactérias foram eliminadas nos biofilmes de três semanas quando comparados com biofilmes de um dia. Três minutos de exposição resultaram em mais bactérias mortas que um minuto para ambos os biofilmes em todos os grupos. NaOCl e QMix foram as soluções mais efetivas contra biofilmes jovens, ao passo que frente à biofilmes maduros, o NaOCl 6% foi o mais eficiente, seguido pelo QMix. NaOCl 2% foi tão efetivo quanto a CHX 2%. Dessa maneira, os autores concluíram que bactérias organizadas em biofilmes maduros no interior dos túbulos dentinários são eliminadas com maior dificuldade pelos irrigantes endodônticos do que bactérias organizadas em biofilmes jovens.

Dois anos mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa publicou outro trabalho, com metodologia muito similar, avaliando o efeito antibacteriano de diferentes soluções irrigadoras sobre biofilme de *E. faecalis* jovens e maduros, no interior dos túbulos dentinários, exposto à diferentes períodos de tempo (3, 10 e 30 minutos) (DU *et al.*, 2014). A proporção de bactérias mortas foi menor após três minutos de contato com as soluções quando comparada com o período de 10 e 30 minutos de exposição ao NaOCl 2% e 6% e à CHX 2%. A eliminação bacteriana foi maior nos primeiros três minutos e diminuiu significativamente após 10 minutos. NaOCl 6% foi o irrigante mais efetivo tanto frente ao biofilme jovem quanto ao maduro. Não foi observada diferença entre a eliminação bacteriana promovida pela CHX 2% e pelo NaOCl 2,5%. Finalmente, mais células bacterianas foram eliminadas em biofilmes jovens quando comparados com biofilmes maduros em todos os grupos experimentais. Assim, pôde-se concluir que a eliminação bacteriana em túbulos dentinários infectados promovida por soluções irrigadoras é tempo-dependente e pouco efeito adicional é obtido após 10 minutos de exposição aos agentes antibacterianos.

Entretanto, ao contrário das técnicas de cultura bacteriana convencionais, as técnicas que utilizam corantes associados com a visualização através da microscopia confocal a laser não permitem a utilização da mesma amostra em diferentes tempos experimentais. Com as técnicas de cultura bacteriana, é possível induzir a contaminação bacteriana e, a partir

deste momento, realizar coletas antes do início do experimento, imediatamente após a aplicação dos protocolos de irrigação testados (CASE *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013) ou das medicações intracanal utilizadas (AL-NAZHAN; AL-OBAIDA, 2008; LANA *et al.*, 2009; COHENCA *et al.*, 2010) e, finalmente, após algumas horas ou dias após a realização dos protocolos. Esta é a principal desvantagem da técnica que lança mão de corantes para detectar viabilidade celular. Não é possível acompanhar aquela comunidade microbiana em diferentes tempos experimentais. Uma vez corada, a amostra não pode ser submetida a novos tratamentos e analisadas em um segundo momento.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito antibacteriano e a capacidade de dissolução de biofilme promovido pela terapia fotodinâmica associada ao hipoclorito de sódio 2,5% e à clorexidina 2% sobre biofilmes mono-espécie (*Enterococcus faecalis*) e multi-espécies (induzido *in situ*).

3.2. Específicos

- Investigar o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio 2,5% e da solução de clorexidina 2% quando utilizados isoladamente ou associados à terapia fotodinâmica sobre biofilme mono-espécie de *Enterococcus faecalis* induzido em pré-molares inferiores.
- Comparar a carga microbiana inicial de canais radiculares contaminados *in vitro* com *E. faecalis* (S1) com a carga microbiana após o contato com as soluções irrigadoras testadas (S2) e após a aplicação da terapia fotodinâmica (S3).
- Mensurar a proporção de células viáveis e não-viáveis após o contato do biofilme induzido intraoral (*in situ*) com as soluções irrigadoras de maneira isolada ou associadas à terapia fotodinâmica utilizando microscopia confocal a laser.
- Investigar a capacidade de dissolução de biofilme promovido pelas soluções irrigadoras isoladamente ou associadas à terapia fotodinâmica através da mensuração do volume de biofilme total e do volume de células viáveis presente no biofilme.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Rosa RA, Santini MF, Barreto MS, Figueiredo JA, Visioli F, Montagner F, Só MVR. Efetividade da terapia fotodinâmica associada a soluções irrigadoras frente a dois modelos de biofilme. (Formatado de acordo com as normas do International Endodontic Journal).

Efetividade da terapia fotodinâmica associada a soluções irrigadoras frente a dois modelos de biofilme

Rosa RA[†], Santini MF[†], Barreto MS[§], Figueiredo JA^{†*}, Visioli F[†], Montagner F[†], Só MVR[†].

Abstract

Aim: To evaluate the antibacterial effect and the biofilm dissolution promoted by photodynamic therapy (PDT) associated with 2.5% NaOCl and 2% CHX over monospecies and multispecies biofilms. **Methodology:** In monospecies model, forty-six mandibular premolars were contaminated with *Enterococcus faecalis* broth culture for 21 days. Specimens were divided into three groups according to the irrigant used: saline, 2% of CHX and 2.5% of NaOCl. After irrigation with 5 mL of each irrigant, PDT was performed. Samples were collected at baseline (S1), after irrigation (S2) and after PDT (S3) and UFC counts were performed. In multispecies model the direct contact of the irrigants was assessed. Sixty bovine dentin blocs were infected intraorally, and divided into six groups: saline, saline/PDT, CHX, CHX/PDT, NaOCl and NaOCl/PDT. Confocal laser scanning microscopy was used to assess the percentage and the biovolume of live cells and the total biovolume. **Results:** All groups reduced UFC' counts after irrigation procedures (S1-S2); however CHX and NaOCl promoted the lowest UFCs counts ($P < 0.05$). PDT significantly reduced the bacterial counts in saline group (S2-S3; $P < 0.05$). In multispecies biofilm model, the lowest amount of live cells was observed in CHX, CHX/PDT, NaOCl and NaOCl/PDT groups, with no differences among them ($P > 0.05$). PDT did not reduce the total biovolume ($P > 0.05$); however it appears to decrease the biovolume of live cells. **Conclusions:** PDT associated with saline reduced the bacterial load in canals infected with *E. faecalis*. PDT did not reduce the total biovolume *in situ*; however the irrigant was decisive to dissolve multispecies biofilm.

Keywords: Photodynamic therapy, *Enterococcus faecalis*, root canal irrigants, biofilm, confocal laser scanning microscopy

([†]) School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

([‡]) School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

([§]) School of Dentistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Corresponding author, Ricardo Abreu da Rosa, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; R. Ramiro Barcelos, 2492, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; CEP 90035. E-mail address: rabreudarosa@yahoo.com.br

Introdução

Microrganismos e seus subprodutos no interior do sistema de canais radiculares necróticos são os principais fatores etiológicos da periodontite apical (Ricucci & Siqueira 2010). A organização bacteriana dinâmica, aderida a uma superfície e embebida em uma matriz exopolissacarídea, responsável por preencher o espaço entre os microrganismos, dá-se o nome de biofilme (Costerton *et al.* 2007). Os biofilmes são capazes de resistir a situações de estresse alcalino (Brandle *et al.* 2008), bem como a ação de agentes antibacterianos, especialmente em casos de biofilmes maduros (Wang *et al.* 2012, Zand *et al.* 2014).

Devido às características morfológicas dos sistemas de canais, o uso de soluções irrigadoras antibacterianas é imprescindível para a dissolução de tecido necrótico e para a diminuição do número de bactérias viáveis (Del Carpio-Perochena *et al.* 2011). Embora diversas soluções tenham sido propostas, o hipoclorito de sódio (NaOCl) vem sendo o irrigante mais efetivo na eliminação de patógenos endodônticos, especialmente pela sua ação proteolítica, além de sua capacidade de dissolução de tecido orgânico (Irala *et al.* 2010, Só *et al.* 2011). A clorexidina (CHX) vem sendo proposta como uma solução alternativa ao NaOCl. Clinicamente, apresenta algumas vantagens sobre o NaOCl, tais como: baixa toxicidade, amplo espectro antimicrobiano

(Ferraz *et al.* 2007) e substantividade (Lenet *et al.* 2000). A principal desvantagem da clorexidina consiste na sua incapacidade de dissolver matéria orgânica, que afeta negativamente sua capacidade de limpeza (Yamashida *et al.* 2004).

Os biofilmes podem resistir a ação das soluções irrigadoras devido à três mecanismos: falha na completa penetração do irrigante no biofilme, especialmente em regiões mais profundas; células bacterianas que crescem lentamente devido às limitações nutricionais; e a adoção de fenótipos resistentes aos agentes microbianos (Mah & O'Toole 2001). Nesse sentido, novos métodos têm sido propostos no intuito de auxiliar o processo de desinfecção do sistema de canais radiculares, dentre eles, a terapia fotodinâmica (PDT). A PDT consiste em uma estratégia antimicrobiana baseada na inativação de células, microrganismos e moléculas induzida por luz (Gursoy *et al.* 2013). Atua através da ativação de um corante fotoativo não-tóxico (foto-sensibilizador) quando em presença de oxigênio (Souza *et al.* 2010). A transferência de energia do foto-sensibilizador ativado para oxigênio disponível origina íons oxigênio altamente reativos e radicais livres, que podem produzir injúria e destruição de microrganismos através de danos à moléculas celulares essenciais, incluindo proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos (Konopka & Goslinski 2007). Após a condução de uma revisão sistemática, Chrepa *et al.* (2014) observaram que os estudos disponíveis indicaram influência da PDT na redução da carga microbiana dos canais radiculares.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano e a capacidade de dissolução da PDT associada ao NaOCl 2,5% e à CHX 2% sobre biofilmes mono-espécie (*E. faecalis*) e multi-espécies (induzido *in situ*). As hipóteses nulas deste estudo são: (1) não há diferença na contagem de UFCs após o contato com as soluções irrigadoras e após a PDT em biofilme mono-espécie; (2) a PDT não altera o número de células viáveis, tampouco o volume de biofilme multi-espécies observado na microscopia confocal a laser.

Materiais e Métodos

Para avaliar os efeitos antibacterianos e de dissolução de biofilme da PDT associada com NaOCl 2,5% e com a CHX 2%, este estudo utilizou dois métodos de formação de biofilme e dois métodos de análise. Primeiramente, um modelo de biofilme mono-espécie foi usado e canais de dentes extraídos foram inoculados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O segundo método induziu biofilme multi-espécies intraoral. Os dados obtidos com os modelos mono-espécie e multi-espécies foram avaliados através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs) e da microscopia confocal a laser (MCL), respectivamente.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS sob o número 09157313.4.0000.5347.

Modelo de biofilme mono-espécie

Quarenta e seis pré-molares inferiores foram selecionados, limpos esterilizados e armazenados em solução salina a 4°C. Todos os dentes foram radiografados para confirmar a presença de apenas um canal, ausência de calcificação, reabsorções, formação radicular completa e ausência de tratamento endodôntico prévio. As coroas foram removidas e o comprimento de trabalho estabelecido visualmente 1 mm aquém da abertura foraminal. Com o intuito de padronizar o diâmetro dos canais radiculares, estes foram preparados até o instrumento F2 do sistema ProTaper Universal® (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) sob constante irrigação/aspiração com NaOCl 2,5% (Farmácia Marcela, Porto Alegre, RS, Brasil). Em seguida, os canais foram irrigados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) e agitados manualmente por três minutos para remover a *smear layer* e lavados com soro fisiológico (Texon, Viamão, RS, Brasil), para remover o EDTA.

Os ápices foram selados com resina composta (Magicfill Vigodent-Coltene, São Paulo, SP, Brasil) e a superfície externa das raízes com esmalte de unha. Em seguida, as raízes foram fixadas individualmente em placas de 12 poços e então levadas para esterilização em óxido de etileno (Hospital de

Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil). A eficácia da esterilização foi verificada pela coleta de uma amostra utilizando três pontas de papel absorvente #25 esterilizadas (Tanariman, Manacapuru, AM, Brasil). As pontas de papel foram depositadas em um tubo plástico (Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) contendo 1 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI) (BHI; Difco, Detroit, MI, EUA) e armazenadas a 37°C por sete dias. A turbidez do meio foi monitorada a cada 24 horas. Ao final de sete dias, não houve turvação do meio, indicando eficácia do processo de esterilização.

Cepas de *E. faecalis* (ATCCC 29212) foram utilizadas para a contaminação dos canais radiculares. Uma suspensão foi preparada adicionando 1 mL de cultura pura de *E. faecalis* semeada em BHI ágar por 24h a 37°C em uma incubadora bacteriológica. A concentração da suspensão microbiana obtida foi ajustada para 0,5 na escala de McFarland. Cinquenta microlitros do caldo bacteriano foram inoculados nos canais radiculares e as raízes foram mantidas por vinte e um dias na temperatura de 37°C (Soares et al. 2010; Dorneles-Morgental et al. 2011). A cada dois dias, 25 µL do caldo microbiano era removido de cada canal e 25 µL de BHI puro era inserido, a fim de garantir a nutrição e viabilidade celular.

Após o período de incubação as amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com a solução irrigadora empregada (N = 15 por grupo): soro fisiológico, NaOCl 2,5% e solução de CHX 2% (Farmácia Marcela, Porto Alegre, RS, Brasil).

As coletas microbianas e contagem das UFCs foram realizadas em três momentos: antes (S1), imediatamente após o contato com as soluções irrigadoras (S2) e após a aplicação da PDT (S3). A coleta inicial (S1) foi realizada utilizando três cones de papel número 25 inseridos no interior do canal por um minuto e, então, transferidas para um tubo de polipropileno contendo 1 mL de solução salina estéril. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto (Vortex Ap 56; Phoenix, Araraquara, SP, Brasil). Após diluições seriadas decimais, alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo BHI ágar (Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas para permitir a contagem das

UFCs. A pureza das culturas foi confirmada pela morfologia das colônias, coloração Gram e pelo teste de catalase.

Em seguida, foram realizados os protocolos de irrigação/aspiração conforme segue: irrigação com 5 mL da solução durante 5 minutos utilizando uma seringa plástica e uma agulha NaviTip® 30G (Ultradent Products, Inc., South Jordan, UT, EUA). Uma vez concluído o processo de irrigação, a solução era aspirada completamente com cânula endodôntica (Flex Suctor; Angelus, Londrina, PR, Brasil) e pontas de aspiração (Endo Tips, Angelus, Londrina, PR, Brasil). Neste momento, a segunda coleta (S2) e as diluições seriadas foram realizadas.

Imediatamente após a S2, os canais foram preenchidos com 50 µL de azul de metileno na concentração de 0,01% (Chimiolux 10; DMC, São Carlos, SP, Brasil). O fotossensibilizante foi mantido no interior do canal e agitado manualmente utilizando uma lima tipo K #20 por 1 minuto (período pré-irradiação). Em seguida, foi realizada a aplicação do laser diodo (Therapy XT; DMC, São Carlos, SP, Brasil) nos seguintes parâmetros: comprimento de onda de 650 nm ± 10 nm e potência de 100 mW ± 20%. A irradiação foi realizada por 60 segundos com luz vermelha contínua e uma fibra óptica adaptada na ponta do laser (diâmetro de 600 µm) foi posicionada 2 mm aquém do comprimento de trabalho. Após a PDT os canais foram irrigados com 1 mL de soro fisiológico. E a coleta pós-PDT (S3) foi realizada.

Um avaliador cegado para os grupos experimentais realizou a contagem das UFCs 24 horas após cada coleta.

Modelo de biofilme multi-espécies

Sessenta blocos de dentina bovina (3 mm × 3 mm × 2 mm) foram obtidos a partir de raízes bovinas previamente esterilizadas. Um disco diamantado dupla face (Komet, Santo André, SP, Brasil) montado em micro motor de baixa rotação foi utilizado para confeccionar os blocos de dentina. Em seguida, os blocos foram imersos em 3 mL de NaOCl 1% durante 15 minutos

(a solução foi renovada a cada 5 minutos) e, posteriormente, em 3 mL de EDTA 17% por 5 minutos.

Os blocos de dentina foram armazenados em tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, contendo 5 mL de água destilada e esterilizados em autoclave (30 minutos, 121⁰C e 1 atm).

Previamente à indução de biofilme oral, *in situ*, foram feitas moldagens do arco superior de dois voluntários e, por meio dos modelos de gesso, foi confeccionado um aparelho intraoral superior em resina acrílica autopolimerizável (Jet Clássico, São Paulo, SP, Brasil). Após a cura da resina, foram feitos nichos e 10 blocos de dentina bovina foram fixados com godiva (DFL Indústria e Comércio, Jacarepaguá, RJ, Brasil) no dispositivo intraoral (Del Carpio-Perochena et al., 2011). Sobre os blocos, foi colocada uma tela protetora para impedir uma possível remoção mecânica do biofilme.

O dispositivo intraoral foi utilizado por dois voluntários durante 72 horas, sendo retirado apenas para alimentação e para realização dos procedimentos de higiene oral (Del Carpio-Perochena et al., 2011).

Após o processo de formação do biofilme, cada bloco foi cuidadosamente removido do seu nicho e armazenado em estufa, a 37°C, dentro de tubos plásticos tipo *ependorf* contendo 1 mL de BHI caldo por 24h em condições aeróbias para proporcionar maior crescimento do biofilme previamente induzido.

Os blocos de dentina foram removidos do meio BHI e lavados com 1 mL de água destilada para remoção do meio de cultura e das células não aderidas. Em seguida, os blocos de dentina foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais (N = 7) de acordo com a solução irrigadora e a utilização da PDT: SORO, SORO/PDT, NaOCl, NaOCl/PDT, CHX E CHX/PDT.

Cada bloco de dentina foi imerso, separadamente, em 5 mL de solução irrigadora dispensada em placas de cultura de doze poços durante 5 minutos. Os espécimes pertencentes aos grupos que receberam PDT foram,

em seguida, imersos em 5 mL de azul de metileno na concentração de 0,01% (Chimiolux 10; DMC). Os blocos de dentina permaneceram imersos no fotossensibilizante por 1 minuto (período pré-irradiação). Logo após, foi realizada a aplicação do laser diodo (Therapy XT; DMC) como descrito para o modelo de biofilme mono-espécie, exceto pelo fato de, no modelo multi-espécies não ter sido utilizada fibra óptica. Após o contato com as soluções nos grupos sem PDT e após a aplicação da PDT nos demais grupos, a superfície dos blocos foi lavada com 1 mL de soro fisiológico.

A análise da viabilidade do biofilme foi realizada em MCL utilizando os corantes SYTO9 e iodeto de propídio (Live/Dead[®] BacLight Bacterial Viability; Invitrogen, Eugene, OR, USA).

Inicialmente foram misturados 10 µL de cada corante em um tubo plástico tipo *ependorf* esterilizado. Em seguida, uma alíquota de 4 µL foi dispensada sobre a superfície do bloco de dentina a ser analisada. Primeiramente, as amostras foram analisadas em MCL (Olympus Fluoview 1000, Olympus Corporation, Tóquio, Japão) em aumento de 60x para localizar áreas de maior espessura de biofilme. Os comprimentos de onda referentes à absorção e emissão foram 494/518 nm para SYTO 9 e 536/617 nm para o iodeto de propídio, respectivamente. Em seguida, três regiões foram selecionadas e analisadas em aumento de 100x, com 1µm de espessura em cada secção e formato de 512 x 512 pixels. Vinte e um *stacks* foram obtidos para cada grupo experimental (três campos operatórios x sete amostras por grupo experimental). A análise quantitativa do biofilme foi conduzida utilizando o programa Biolume_L. Os parâmetros avaliados foram o biovolume total (µm³), o biovolume de células viáveis (µm³) e a porcentagem de células viáveis em relação às células não-viáveis.

Análise Estatística

Os dados obtidos nos modelos mono-espécie e multi-espécies foram analisados utilizando o pacote estatístico Bioestat 5.0 (Instituto Mamirauá, Tefé, AM, Brasil). A distribuição não normal dos dados foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Dessa maneira, no modelo mono-espécie, a análise inter-grupos

foi realizada utilizando os testes de Kruskal-Wallis e Dunn para comparar as contagens de UFCs em cada tempo experimental. A análise intra-grupo foi conduzida através do teste de Friedman para comparar cada um dos grupos nos diferentes tempos experimentais.

Já para o modelo multi-espécies, os dados referentes ao biovolume total, biovolume de células viáveis e à porcentagem de células viáveis (verde) foram comparados pelos testes de Kruskal-Wallis e de Dunn. Para todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

Resultados

Modelo de biofilme mono-espécie

A quantidade de UFCs observada nos grupos experimentais foi similar em S1 ($P > 0,05$). Em todos os grupos, inclusive no grupo SORO, houve redução significativa na contagem de UFCs após a irrigação (S2) ($P < 0,05$). A maior redução de UFCs em S2 foi verificada nos grupos CHX e NaOCl, sem diferenças significativas entre si ($P > 0,05$). O efeito da PDT foi significativo na redução bacteriana no grupo controle (SORO S2-S3; $P < 0,05$). A aplicação da PDT resultou em redução da quantidade bacteriana de S2 para S3 nos grupos CHX e NaOCl, porém sem diferenças significativas ($P > 0,05$). Após S3, os menores valores de UFCs foram observados nos grupos NaOCl (0) e CHX ($0,0041 \times 10^4$ UFC/mL), sem diferenças entre si ($P > 0,05$). A Tabela 1 indica a mediana, percentil 25 e percentil 75 da contagem de UFCs ($\times 10^4$ UFC/mL) em cada um dos tempos experimentais, além do percentual de redução bacteriana de S1 para S2 e de S2 para S3.

Tabela 1 – Mediana, percentil 25 e percentil 75 da contagem de UFCs ($\times 10^4$ UFC/mL) após coleta inicial (S1), após irrigação (S2) e após PDT (S3) e percentual de redução bacteriana após cada etapa experimental.

	S1	S2	S3	S1-S2 (%)	S2-S3 (%)
SORO	200 ^{Aa} (160 – 780)	11,6 ^{Ba} (6,6 – 21,5)	3,4 ^{Ca} (0,9 – 7)	94,1%	70,6 %
NaOCl	100,7 ^{Aa} (37,7 - 200)	0,6 ^{Bb} (0 – 11,2)	0 ^{Bb} (0 – 7,1)	99,4%	100 %

CHX	108,2 ^{Aa} (30,8 – 239,7)	1,6 ^{Bb} (0,4 – 3,6)	0,0041 ^{Bb} (0 – 1,5)	98,3%	99,3 %
------------	---------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------	-------	--------

Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferenças estatisticamente significativas após o teste de Friedman ($P < 0,05$).

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças estatisticamente significativas após o teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($P < 0,05$).

Modelo de biofilme multi-espécies

A mediana e os valores referentes ao percentil 25 e o percentil 75 para o volume absoluto de biofilme, volume de células viáveis e para a porcentagem de células vivas após a realização dos protocolos propostos estão descritos na Tabela 2.

Independentemente da aplicação da PDT, o NaOCl e a CHX apresentaram menor quantidade de células vivas em comparação ao grupo controle (SORO) ($P < 0,05$), porém sem diferenças entre si ($P > 0,05$). A utilização da terapia fotodinâmica após a utilização do soro (SORO/PDT) não alterou a proporção de células viáveis (verde) e não-viáveis (vermelho) ($P > .05$). Por outro lado, apesar de não ter ocorrido diferença estatisticamente significativa, pôde-se observar que a porcentagem de células vivas no grupo NaOCl/PDT (24.3%) diminuiu quarenta pontos percentuais em comparação com o grupo NaOCl (64.4%). O mesmo ocorreu no grupo CHX/PDT (29.9%) onde houve queda de dezessete pontos percentuais em relação ao número de células vivas observadas no grupo CHX (46%).

A terapia fotodinâmica não foi capaz de reduzir o volume total de biofilme ($P > 0,05$), porém o tipo de solução irrigadora foi determinante para a dissolução de matéria orgânica ($P < 0,05$). Os grupos NaOCl e NaOCl/PDT apresentaram volumes de biofilme inferiores àqueles apresentados pelos grupos SORO e SORO/PDT ($P < 0,05$). Os grupos CHX e CHX/PDT apresentaram volumes intermediários de biofilme. Imagens representativas das amostras avaliadas estão contidas na Figura 1.

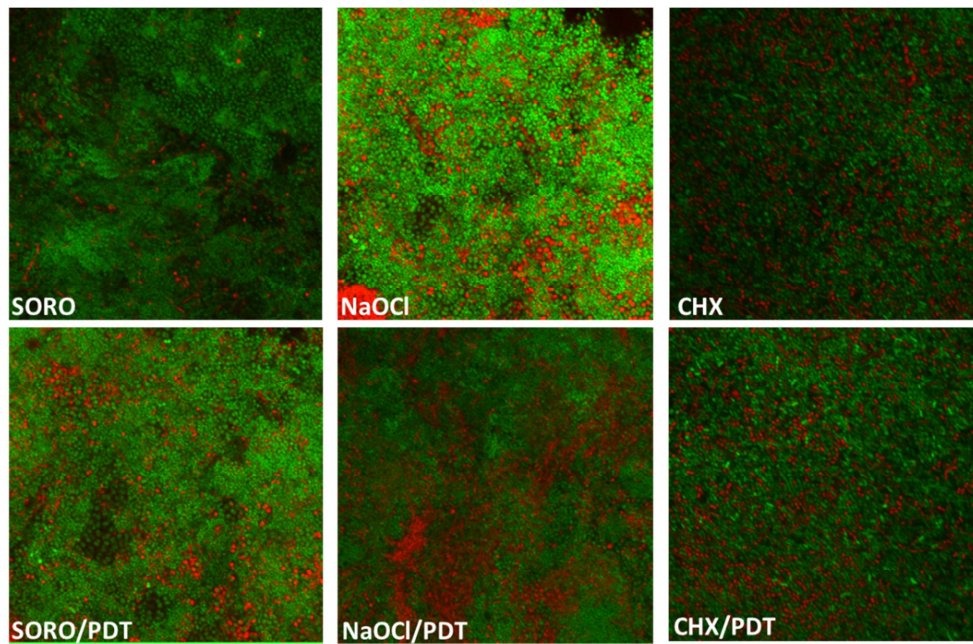


Figura 1 – Imagens de microscopia confocal a laser referente às células viáveis (verde) e não-viáveis (vermelho) para cada um dos grupos experimentais.

A aplicação da PDT reduziu o biovolume de células viáveis, porém sem diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$). O menor biovolume de células viáveis foi observado no grupo NaOCl/PDT ($0,4 \times 10^6 \mu\text{m}^3$). Em contrapartida, os grupos SORO e SORO/PDT ($64,8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ e $40,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, respectivamente) apresentaram os maiores biovolumes de células viáveis ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Mediana, percentil 25 e percentil 75 para a porcentagem de células viáveis, para o volume absoluto de biofilme e para o volume de células viáveis após a realização dos protocolos propostos.

	SORO	SORO/PDT	NaOCl	NaOCl/PDT	CHX	CHX/PDT
Porcentagem de células viáveis (Mediana, P25 – P75)	93,1 % ^A (91,6 – 94,7)	91,2 % ^A (84,7 - 92,8)	64,4 % ^B (40 - 72,7)	24,3 % ^B (1,8 – 58,6)	46,0 % ^B (41,2 – 60,2)	29,9 % ^B (27,9 – 56,1)
Biovolume total (Mediana - x 10⁶ μm³ - P25 – P75)	75,5 ^A (45,5 – 119,8)	44,4 ^A (36,4 – 94,0)	9,3 ^B (5,1 – 16,5)	10,3 ^B (0,6 – 12,5)	33,9 ^{AB} (32,4 – 47,1)	35,1 ^{AB} (27,3 – 66,7)
Biovolume células viáveis (Mediana - x 10⁶ μm³ - P25 – P75)	64,8 ^A (42,9 – 113,2)	40,5 ^A (33,2 – 80,9)	7,1 ^B (2,7 – 16,5)	0,4 ^B (0,07 – 7,4)	23,5 ^{AB} (14,2 – 27,8)	9,8 ^B (6,8 – 39,0)

Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas após aplicação dos testes de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn (P < 0,05).

Discussão

A desinfecção do sistema de canais radiculares consiste em um desafio e, muitas vezes, pode ser necessário o advento de terapias auxiliares às soluções irrigadoras e aos instrumentos endodônticos. Nesse sentido, a PDT tem sido proposta como um método coadjuvante no tratamento de dentes necróticos (Garcez *et al.* 2010, Souza *et al.* 2010, Silva *et al.* 2012, Bago *et al.* 2013; Chrepa *et al.* 2014). Por razões metodológicas, este estudo foi delineado para avaliar o efeito antibacteriano e de dissolução de biofilme das soluções irrigadoras e sua combinação com a PDT sobre biofilmes mono-espécie e multi-espécies. Cabe ressaltar que o processo de irrigação consiste em apenas uma das etapas do tratamento endodôntico. O processo de desinfecção do sistema de canais radiculares contempla, ainda, a ação mecânica dos instrumentos endodônticos e a utilização de medicação intracanal.

Estudos anteriores avaliaram o efeito isolado da PDT na desinfecção de canais radiculares, porém não estudaram o efeito desta terapia associada às soluções antibacterianas como o NaOCl e a CHX (Foschi *et al.* 2007; Bergmans *et al.* 2008; Miyabe *et al.* 2011, Ghinzelli *et al.* 2014). Ghinzelli *et al.* (2014) compararam a técnica tradicional de PDT com a ativação ultrassônica do azul de metileno previamente à PDT com na eliminação de *E. faecalis* de canais contaminados *in vitro*. A indicação da desinfecção fotoativada dá-se após o completo preparo biomecânico do canal radicular e não isoladamente. Dessa maneira, metodologias como a do presente estudo, que abordam o efeito combinado da PDT com a ação dos irrigantes e/ou dos instrumentos endodônticos parecem adequadas.

A primeira hipótese nula foi rejeitada. Houve diferença na contagem de UFCs após o contato com as soluções irrigadoras e após a PDT frente a biofilmes mono-espécie. Inicialmente, o número de UFCs foi similar para todas as soluções testadas (S1) ($P > 0,05$). Esta verificação é importante, uma vez que identifica o padrão uniforme de infecção alcançado pelo método empregado. Diversos estudos têm utilizado metodologias similares para identificar a redução da carga bacteriana através de métodos de tradicionais de cultura (Soares *et al.* 2010, Alves *et al.* 2011, Machado *et al.* 2013). Neste estudo foi verificada a ação química da solução irrigadora e o efeito físico do

processo irrigação/aspiração, além da ação da PDT sobre o *E. faecalis*. Caso o efeito mecânico do preparo do canal fosse incluído como uma variável, provavelmente a quantidade de microrganismos observada após o preparo seria muito baixa, minimizando o efeito químico das soluções irrigadoras e da PDT, objetos do estudo (Oliveira *et al.* 2007, Dornelles-Morgental *et al.* 2011). O referido fato foi observado por Dornelles-Morgental *et al.* (2011), onde foram feitas coletas após o preparo manual até lima tipo K-50 associado com irrigações com NaOCl e CHX, entre outros irrigantes e combinações. Canais preparados e irrigados com NaOCl 2,5% e solução de clorexidina 2% não apresentaram unidades formadoras de colônia imediatamente após o preparo biomecânico, provavelmente pelo efeito químico combinado dos irrigantes com a ação mecânica dos instrumentos.

Foi observada diminuição significativa na contagem de UFCs em S2 em todos os grupos, inclusive no grupo SORO ($P < 0,05$). Este efeito deve-se à ação física do processo de irrigação/aspiração responsável pela redução significativa das bactérias planctônicas (observadas pelos métodos de coleta e, posterior cultura). A ação física combinada com o potencial antimicrobiano da CHX 2% e do NaOCl 2,5% proporcionou as menores contagens de UFCs em S2 ($P < 0,05$), sem diferenças entre si ($P > 0,05$). É sabido o efeito antimicrobiano destas soluções, especialmente quando o método de avaliação consiste na coleta com cones de papel absorvente (Gomes *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2007, Dornelles-Morgental *et al.* 2011). Soma-se a isso o fato de o NaOCl e a CHX, nas concentrações estudadas neste trabalho, serem indicados para desinfecção de canais necróticos (Spratt *et al.* 2001, Sena *et al.* 2006, Clegg *et al.* 2006). Rôças & Siqueira (2011), em um estudo clínico utilizando 47 dentes com periodontite apical cônica, observaram similar redução dos tipos de microrganismos e de seus níveis promovidos pela solução de CHX 0,12% e pelo NaOCl 2,5%.

Estudos prévios têm confirmado o efeito bactericida da PDT, especialmente quando associadas às soluções com potencial antimicrobiano (Foschi *et al.* 2007, Bergmans *et al.* 2008, Garcez *et al.* 2010). Recente revisão sistemática alerta para a escassez de informações clínicas a respeito do potencial bactericida da terapia fotodinâmica, entretanto apontam para uma

efetividade em torno de 91%-100% da PDT no processo de desinfecção do sistema de canais radiculares (Chrepa *et al.* 2014). Na presente pesquisa, o grupo controle (SORO) apresentou 70% de redução bacteriana após aplicação da PDT (S3) ($P < 0,05$). Foschi *et al.* (2007) observaram porcentagem de redução bacteriana similar à encontrada no presente estudo (77%) após aplicação do laser de diodo com fibra óptica associado ao azul de metileno.

Por outro lado, a aplicação da PDT (S3), após a utilização das soluções antimicrobianas, reduziu a quantidade de UFCs, porém sem diferenças significativas ($P > 0,05$). A utilização das soluções irrigadoras antibacterianas por si só foi capaz de reduzir a contagem de UFCs de tal forma que o efeito da PDT não foi detectado estatisticamente. Além disso, após a aplicação da PDT (S3), uma importante informação é que 50% das amostras do grupo NaOCl e 60% das amostras do grupo CHX não apresentaram formação de UFCs. Em um estudo, *in vivo*, a aplicação da PDT associada ao tratamento endodôntico convencional com hipoclorito de sódio 2,5% resultou em uma expressiva diminuição da carga microbiana (Garcez *et al.* 2010). Após tratamento convencional, 33% das amostras apresentaram-se livres de microrganismos, ao passo que as coletas após preparo do canal e aplicação da PDT indicaram ausência de microrganismos frente aos métodos de cultura convencional (Garcez *et al.* 2010).

A segunda hipótese nula deste estudo foi confirmada. A PDT não alterou a quantidade de células viáveis, tampouco o volume de biofilme multi-espécies observado através da MCL. No presente estudo, não foi observado efeito antibacteriano da PDT no grupo controle. Os índices de células viáveis nos grupos SORO e SORO/PDT foram similares (93,1% e 91,2%, respectivamente). O soro fisiológico é uma solução inerte, desprovida de qualquer ação antibacteriana. Dessa maneira, esperava-se não observar ação antimicrobiana de tal solução. Sendo assim, à exemplo de estudos anteriores, foi proposta a utilização do soro fisiológico como controle para as soluções irrigadoras com potencial antimicrobiano e para aplicação da terapia fotodinâmica (Bago *et al.* 2013, Zand *et al.* 2014). Podemos atribuir às limitações da metodologia empregada a pequena quantidade de células não-viáveis, 7% no grupo SORO e 9% no grupo SORO/PDT. Tal morte celular

provavelmente ocorreu por saturação do meio ou pelo processamento das amostras para análise em MCL.

Por outro lado, nos grupos onde soluções antibacterianas foram utilizadas, a PDT parece ter exercido efeito antibacteriano complementar, embora não tenha ocorrido diferença significativa ($P > 0,05$). No grupo NaOCl/PDT houve uma redução de 62% no número de células viáveis em comparação ao grupo NaOCl. Ao passo que no grupo CHX/PDT a redução foi de 35%. A razão pela qual a PDT exerce maior efeito antibacteriano após aplicação de soluções antibacterianas ainda é uma incógnita.

O efeito antibacteriano da PDT após irrigação com NaOCl e CHX pode ser explicado pelo fato da irradiação sobre o fotossensibilizante ser mais efetiva quando da presença apenas de microrganismos residuais, resistentes ao primeiro contato com o irrigante antibacteriano. Esse aspecto ressalta a característica coadjuvante da terapia fotodinâmica no processo de desinfecção dos canais radiculares (Bergmans *et al.* 2008, Silva *et al.* 2012). Em contrapartida, quando o biofilme está estruturado sem ser previamente desorganizado pelo irrigante ou pela ação mecânica do instrumento, a PDT parece não ter efeito (SORO e SORO/PDT, $P > 0,05$). A transferência de energia do fotossensibilizante ativado para o oxigênio disponível origina íons oxigênio altamente reativos e radicais livres, que podem produzir injúria e destruição de microrganismos através de danos a moléculas celulares essenciais, incluindo proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos (Konopka & Goslinski 2007). O poder de oxidação do oxigênio singleto tem se mostrado indutor dos efeitos bactericidas. Os detalhes da relação entre quantidade de oxigênio singleto e o grau de efeito antibacteriano, bem como da quantidade de biofilme presente no substrato e o potencial bactericida da PDT, ainda não estão bem estabelecidos (Komine & Tsujimoto 2013).

Nenhum estudo prévio avaliou a capacidade de dissolução de biofilme promovida pela desinfecção fotoativada. Em contrapartida, a capacidade de dissolução de matéria orgânica das soluções irrigadoras está diretamente associada ao tipo de solução irrigante, e, no caso do hipoclorito de sódio, à sua concentração (Naenni *et al.* 2004, Sirtes *et al.* 2005, Irala *et al.* 2010, Stojicic *et*

al. 2010, Só *et al.* 2011). No presente estudo, em concordância com a literatura, os menores volumes de biofilme, sejam eles totais ou de células viáveis, foram observados nos grupos onde o NaOCl foi utilizado. Estudos prévios têm sido unânimes em afirmar que a CHX não é capaz de dissolver tecido pulpar vivo ou necrótico, seja na forma líquida ou gel (Marley *et al.* 2001, Okino *et al.* 2004). Neste estudo, foram observados valores intermediários de volume de biofilme total para os grupos em que foi utilizada a CHX ($33,9 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ para CHX e $35,1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ para CHX/PDT), entretanto há de se considerar que a matéria orgânica referida neste estudo consiste apenas no biofilme multi-espécie e não nos demais constituintes orgânicos do canal radicular como tecido pulpar e fibras colágenas, por exemplo. A explicação mais racional para este achado parece estar relacionada com o efeito bactericida da CHX na concentração de 2%. De acordo com Gomes *et al.* (2013) o efeito bactericida da CHX 2% ocorre pela precipitação/coagulação do citoplasma bacteriano. Tal precipitação origina *debris* celulares no interior do canal radicular, que podem ser facilmente removidos através de uma vigorosa irrigação com água destilada (Vianna *et al.* 2006). No presente estudo, a remoção deste conteúdo citoplasmático extravasado parece ter ocorrido pela irrigação utilizando 1 mL de soro fisiológico após a imersão nas soluções testadas.

Vale ressaltar que a presente metodologia para avaliação da efetividade da PDT sobre biofilme mono-espécie não contempla a análise bacteriana no interior dos túbulos dentinários. O referido aspecto pode e deve ser abordado em estudos futuros para analisar o efeito destas soluções e da PDT no interior desta estrutura e nas irregularidades do canal radicular em dentes com morfologia complexa. Ainda, o modelo de biofilme multi-espécies apresenta como substrato uma superfície plana onde o biofilme é formado. Teoricamente, o acesso dos irrigantes, do fotossensibilizante e de uma luz de comprimento de onda específico é facilitado nesta estrutura. Como resultado, o efeito antibacteriano e de dissolução de biofilme dos irrigantes e da PDT podem ser superestimados.

Conclusão

Diante dos achados do presente estudo e, levando em consideração suas limitações, pode-se concluir que a aplicação da PDT, após irrigação com solução inerte (soro fisiológico), reduziu a quantidade bacteriana em canais radiculares contaminados com biofilme mono-espécie (*E. faecalis*). Além disso, sobre biofilme multi-espécies induzido *in situ*, a PDT parece reduzir a quantidade e o volume de células viáveis quando associada a soluções antibacterianas. A terapia fotodinâmica não foi capaz de reduzir o volume total de biofilme *in situ*, porém o tipo de solução irrigadora foi determinante para a dissolução de biofilme.

Referências

Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira JF Jr (2011) Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *Journal of Endodontics* **37**, 496-501.

Bago I, Plečko V, Gabrić Pandurić D, Schauperl Z, Baraba A, Anić I (2013) Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International Endodontic Journal* **46**, 339-47.

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2008) Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *International Endodontic Journal* **41**, 227-39.

Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T (2008) Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *Journal of Endodontics* **34**, 579-82.

Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM (2014) The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *Journal of Endodontics* **40**, 891-8.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR (2006) The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms *in vitro*. *Journal of Endodontics* **32**, 434-437.

Costerton JW (2007) The biofilm primer, 1st edn Berlin/New York: Springer.

Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA *et al.* (2011) Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *Journal of Endodontics* **37**, 1134-8.

Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M (2011) Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **112**, 396-400.

Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2007) Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Brazilian Dental Journal* **18**, 294-8.

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K *et al.* (2007) Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**, 782-7.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblim MR, Suzuki H, Ribeiro MS (2010) Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *Journal of Endodontics* **36**, 1463-6.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001) *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* **34**, 424-8.

Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC (2013) Chlorhexidine in endodontics. *Brazilian Endodontic Journal* **24**, 89-102.

Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S (2013) Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical Oral Investigations* **17**, 1113-25.

Irala LE, Grazziotin-Soares R, Salles AA, Munari AZ, Pereira JS (2010) Dissolution of bovine pulp tissue in solutions consisting of varying NaOCl concentrations and combined with EDTA. *Brazilian Oral Research* **24**, 271-6.

Komine C, Tsujimoto Y (2013) A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **39**, 411-4.

Konopka K, Goslinski T (2007) Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of Dental Research* **86**, 694–707.

Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, et al. (200) Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *Journal of Endodontics* **26**, 652–5.

Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, Reis FA, Britto ML, Cai S (2013) Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *International Endodontic Journal* **46**, 1083-7.

Mah TF, O'Toole GA (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **1**, 34–39.

Marley JT, Ferguson DB, Hartwell GR (2001) Effects of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: short-term results. *Journal of Endodontics* **27**, 775-778.

Miyabe M, Junqueira JC, Costa AC, Jorge AO, Ribeiro MS, Feist IS (2011) Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus spp.* *Brazilian Oral Research* **25**, 230-4.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M (2004) Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *Journal of Endodontics* **30**, 785-7.

Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA (2004) Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *International Endodontic Journal* **37**, 38-41.

Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB (2007) *In vitro* antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **103**, 702-6.

Ricucci D, Siqueira JF Jr (2010) Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics* **36**, 1277-88.

Rôças IN, Siqueira JF Jr (2011) Comparison of the *in vivo* antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *Journal of Endodontics* **37**, 143-50.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME *et al.* (2006) *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *International Endodontic Journal* **39**, 878-885.

Silva LA, Novaes AB Jr, de Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M Jr, Silva RA (2012) Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *Journal of Endodontics* **38**, 360-6.

Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M (2005) The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *Journal of Endodontics* **31**, 669-71.

Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM *et al.* (2010) Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics* **36**, 894-8.

Souza LC, Brito PRR, Oliveira JCM *et al.* (2010) Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation

procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* **36**, 292-296.

Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M (2010) Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *Journal of Endodontics* **36**, 1558-62.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G (2006) *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *International Endodontic Journal* **39**, 484- 492.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2012) Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of Endodontics* **38**, 1376-9.

Yamashita JC, Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB (2003) Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *International Endodontic Journal* **36**, 391-4.

Zand V, Milani AS, Amini M *et al.* (2014) Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on monoculture biofilms of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. *Photomedicine Laser and Surgery* **32**, 245-51.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ação antimicrobiana e a capacidade de dissolução de biofilme constituem importantes propriedades físico-químicas das soluções irrigadoras, uma vez que possibilitam o acesso e a atuação em áreas inacessíveis aos instrumentos endodônticos. Além disso, a PDT têm sido proposta como um coadjuvante no processo de desinfecção dos canais radiculares.

Da Metodologia

O modelo experimental utilizado na presente pesquisa onde pré-molares inferiores foram infectados com *E. faecalis* proporcionou a formação de um ambiente favorável para o crescimento bacteriano, favorecendo o crescimento destes microrganismos tanto na luz do canal quanto no interior dos túbulos dentinários. Esta metodologia de indução de biofilme mono-espécie vem sendo amplamente empregada para análise do potencial antimicrobiano de soluções irrigadoras, medicação intracanal, protocolos de desinfecção e técnicas de preparo biomecânico (ALVES *et al.*, 2011, DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011, MACHADO *et al.*, 2013, MIRANDA *et al.* 2013, SHOKRANEH *et al.* 2014).

Os procedimentos de vedamento apical e selamento da superfície externa radicular foram realizados com a finalidade de evitar a contaminação da luz do canal por outras espécies bacterianas e para evitar que os microrganismos inoculados atingissem a superfície externa radicular conforme Dametto *et al.* (2005), Dornelles-Morgental *et al.* (2011) e Machado *et al.* (2013).

O *Enterococcus faecalis* tem sido o microrganismo mais utilizado para a realização de testes antimicrobianos *in vitro* de diferentes soluções irrigadoras, medicamentos e cimentos endodônticos (VIANA *et al.*, 2004; ESTRELA *et al.*, 2008; GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2011; SABRAH *et al.*, 2013; BAILÓN-SÁNCHEZ *et al.*, 2014; DU *et al.*, 2014). A escolha do *E. faecalis* deve-se pelo fato de ser um microrganismo de alta prevalência em casos de infecções

persistentes, embora não seja o único associado à esse tipo de lesão (ROÇAS *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2008). Sua patogenicidade deve-se à sua capacidade penetrar nos túbulos dentinários, aderir ao colágeno, e capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes de extremo pH alcalino e privação nutricional (TENDOLKAR *et al.*, 2003; CHIVATXARANUKUL *et al.*, 2008). Por fim, sua escolha também ocorreu por ser um microrganismo de fácil cultivo e de crescimento rápido.

O período de inoculação do *E. faecalis* têm variado bastante na literatura. Autores têm proposto tempos de infecção variando desde 24 horas (AGRAWAL *et al.*, 2013) até 30 dias (ALVES *et al.*, 2011). Diversos trabalhos têm usado 21 dias como período necessário para infecção *in vitro* por *E. faecalis* (BERBER *et al.*, 2006, SOARES *et al.*, 2010, RETAMOSO *et al.*, 2010, DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011). De acordo com Berber *et al.* (2006), e Dornelles-Morgental *et al.* (2011) vinte e um dias são suficientes para que a suspensão de *E. faecalis* se difunda pelos túbulos dentinários em direção ao cimento. Além disso, Wang; Shen; Haapasalo (2012) verificaram que biofilmes maduros (21 dias) são mais resistentes aos agentes antibacterianos do que biofilmes jovens (24 horas). Diante do exposto, a presente metodologia empregou um período de infecção *in vitro* dos canais radiculares de vinte e um dias.

A escolha dos irrigantes deu-se por serem soluções utilizadas em Endodontia, especialmente nestas concentrações. Cabe ressaltar que o processo de irrigação consiste em apenas uma das etapas do tratamento endodôntico. O processo de desinfecção do sistema de canais radiculares contempla, ainda, a ação mecânica dos instrumentos endodônticos e a utilização de medicação intracanal. Como o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da PDT associada à soluções irrigadoras, a utilização de instrumentos endodônticos não foi realizada. Caso o efeito mecânico do preparo do canal fosse incluído como uma variável, provavelmente a quantidade de microrganismos observada após o preparo seria muito baixa, minimizando o efeito químico das soluções irrigadoras e da PDT, objetos do estudo. Vale ressaltar ainda a escolha do tempo de contato com a solução irrigadora. Du *et al.* (2013) suportam a opção por cinco minutos de contato no

presente estudo, uma vez que observaram dependência entre o efeito antibacteriano do NaOCl e da CHX e o tempo de exposição do *E. faecalis* frente à esses irrigantes. Após período de três minutos, os autores observaram que a morte bacteriana continuava a ocorrer, porém em velocidade muito inferior aquela verificada nos primeiros três minutos. Em 10 minutos, o efeito antimicrobiano destes irrigantes foi muito pobre. Os achados de Du *et al.* (2013) confirmam a necessidade da troca constante da solução irrigadora e de um grande volume de solução durante o processo de irrigação/aspiração dos canais radiculares.

Importantes limitações dos estudos que avaliam a microbiota endodôntica referem-se aos procedimentos de coleta. O método da análise da turbidez do meio tem sido empregado em estudos prévios (RETAMOSO *et al.*, 2010) para detectar bactérias viáveis, todavia este modelo necessita de completa ausência de contaminação externa, para evitar a formação de resultados falso-positivos. O método do contato direto do irrigante com o microrganismo também é usado para avaliar o potencial antimicrobiano de um irrigante ou de um protocolo de irrigação. Entretanto, não leva em consideração a capacidade tampão da dentina e tampouco a complexidade do sistema de canais radiculares (HAAPASALO *et al.*, 2000, MORGENTAL *et al.*, 2013). Finalmente, o método empregado neste estudo pode ser considerado o mais utilizado para coleta de microrganismos no canal radicular. Mesmo que a coleta com cones de papel absorvente seja capaz de reter apenas microrganismos situados no canal principal ela é amplamente utilizada (MACHADO *et al.*, 2013, GHINZELI *et al.*, 2014). Sabe-se que os microrganismos são capazes de se alojar nas ramificações, túbulos dentinários, istmos, anfractuosidades e em áreas não tocadas pelos instrumentos endodônticos. E nestas áreas, as bactérias permanecem inacessíveis à este método de coleta.

A utilização de biofilmes mistos induzidos intraoral vem sendo proposta por estudos anteriores para investigar ação antimicrobiana das medicações intracanal (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013) e das soluções irrigadoras quando utilizadas isoladamente (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011; DEL CARPIO PEROCHENA *et al.*, 2011) ou associadas (GUERREIRO-TANOMARU *et al.*, 2014).

A direta observação do biofilme bacteriano utilizando microscopia confocal a laser permite a quantificação bacteriana de maneira mais representativa quando comparada com a quantificação pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFCs) (SHEN *et al.*, 2010). A contagem de UFCs permite apenas a contagem de células capazes de iniciar o processo de divisão celular em uma taxa suficiente para gerar colônias, além disso, tal crescimento está diretamente vinculado ao meio de cultura utilizado (SHEN *et al.*, 2010). As bactérias, podem, ainda, ser sensíveis às condições de cultura como temperatura, pH e tempo de incubação. Por fim, as respostas dos microrganismos frente aos métodos tradicionais de cultura podem necessitar de longos períodos experimentais, variando de 24h até uma semana.

Trabalhos prévios têm utilizado a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para avaliar a presença de bactérias no interior do canal, nos túbulos dentinários e na superfície externa radicular (NAIR *et al.*, 1999, SUNDE *et al.*, 2002, NAIR *et al.*, 2005, CARR *et al.*, 2009). Tais investigações utilizam dentes já indicados à extração ou fragmentos obtidos a partir de cirurgia periapical prévia. Nair *et al.* (2005) utilizaram a MET para ilustrar a infecção intracanal residual após o tratamento endodôntico em sessão única de dezesseis raízes mesiais de molares inferiores. As imagens de MET indicaram contaminação maciça de canais acessórios necróticos e de istmos não instrumentados por bacilos embebidos em uma matriz extracelular. Na mesma linha, Carr *et al.* (2009) avaliaram através de MET a região apical de um molar inferior que recebeu o primeiro tratamento endodôntico há dez anos e o segundo há dois, porém com infecção persistente. Após cirurgia periapical e preparo da peça, pôde ser observada presença de biofilme complexo formado por múltiplos fenótipos na região de istmo. Além disso, restos pulpares e de raspas de dentina também puderam ser evidenciados através da MET. A principal vantagem da microscopia eletrônica de transmissão é proporcionar imagens de alta resolução da estrutura orgânica dentinária e dos microrganismos em geral. Como desvantagens, podem ser citados o custo elevado e o tempo de preparação da amostra, fazendo com que apenas um número limitado de peças seja analisado. Além disso, a estrutura da amostra pode ser modificada durante a etapa de preparo.

Outro método utilizado para avaliar a quantidade de biofilme remanescente utiliza microscopia eletrônica de varredura (MEV). Além da análise de biofilme, a MEV permite analisar os microrganismos no interior do canal principal, no interior dos túbulos dentinários, na superfície externa das raízes e na região periapical (TRONSTAD; BARNETT; CERVONI, 1990, GRÜNDLING *et al.*, 2011, ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2014). Soma-se à isso, como vantagem deste método a possibilidade de armazenamento das amostras para posterior análise em novos estudos. Por outro lado, A MEV apresenta algumas desvantagens. O processo de preparação das amostras previamente à análise em MEV pode ocasionar ressecamento do biofilme possível diminuição na sua espessura e, por consequência, no seu volume. Isso ocorre devido ao processo de desidratação crescente no preparo dos espécimes previamente à metalização. Tal método não possibilita adequada quantificação tridimensional da biomassa remanescente (COSTERTON *et al.*, 2007). Soma-se a isso o fato de a MEV não indicar a viabilidade dos microrganismos presentes nas imagens micrográficas. Tais imagens podem apontar para a presença de células bacterianas, porém estas podem não se apresentarem viáveis.

Nesse sentido, a utilização da microscopia confocal a laser pode oferecer algumas vantagens sobre a microscopia eletrônica de varredura. As amostras de MCL não necessitam de tratamento prévio para análise microscópica (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011) e, além disso, possibilitam a análise volumétrica do biofilme (DEL CARPIO PEROCHENA *et al.*, 2011). Finalmente, a principal vantagem sobre a MEV consiste no fato de a MCL possibilitar a determinação da viabilidade bacteriana mediante a utilização de corantes específicos. A utilização destes corantes vem ganhando força nos últimos anos por constituir um método rápido e fácil de ser realizado, além de permitir tanto a contagem de células viáveis presentes num dado biofilme quanto o biovolume total deste. Os dois corantes utilizados na presente metodologia diferem pela sua capacidade de penetrar em células bacterianas normais e com danos em sua membrana celular. O SYTO9 é capaz de corar bactérias com membrana celular intacta gerando fluorescência verde, ao passo que bactérias mortas, com a membrana celular rompida, permitem a

penetração do iodeto de propídio, responsável pela fluorescência vermelha. A principal desvantagem deste método consiste na impossibilidade de reutilização das amostras, uma vez que a energia gerada pelo laser com os fluoróforos da amostra torna esse processo irreversível pela gradativa perda de fluorescência (WHITE; AMOS; FORDHAM, 1987).

Apesar das vantagens citadas na utilização da indução intraoral de biofilme associada à microscopia confocal a laser como método de análise, vale ressaltar a dificuldade em reproduzir as condições clínicas reais em que as soluções irrigadoras e as medicações intracanaís se difundem no sistema de canais radiculares, especialmente em áreas de complexidade anatômica como em canais curvos, ísmos ou mesmo na região apical de dentes permanentes. Estas áreas acabam por proteger microrganismos alojados no seu interior, dificultando a ação dos agentes antimicrobianos e, finalmente, prejudicando o prognóstico do caso (VERA *et al.*, 2012). A falta de variações anatômicas presentes nos corpos de prova obtidos a partir de dentina bovina utilizados neste estudo constituem a principal limitação deste método. A seleção de blocos de dentina com superfície plana para a indução de biofilme foi realizada para facilitar o acúmulo de microrganismos e para proporcionar adequada visualização através da microscopia confocal à laser, uma vez que esta apenas consegue realizar a aquisição de imagens a partir de uma superfície plana.

É compreensível e esperado que haja variações na composição microbiana no interior dos canais e na microbiota presente no modelo de indução de biofilme intraoral. Se por um lado, o modelo de biofilme mono-espécie com posterior análise por meio da contagem de UFCs apresenta a vantagem de ser induzido no interior do canal radicular com suas características particulares, no modelo de biofilme multi-espécies induzido *in situ* ocorrem interações bacterianas que não são observadas em biofilmes mono-espécie e também a formação de canais de água e de matriz extracelular que não são observadas em bactérias planctônicas (STANDAR *et al.*, 2010). A formação de matriz extracelular assume particular importância uma vez que dificulta a penetração de agentes antimicrobianos, como as soluções irrigadoras, e limita sua efetividade.

A indução de biofilmes *in vitro* ou *in situ* é importante para determinar as interações bacterianas no interior destes biofilmes, entretanto são incapazes de simular de maneira exata o que ocorre na cavidade oral devido a diversidade de nutrientes, às alterações de umidade e pH, variações de temperatura e presença de saliva.

Na metade da década de 70, Kolourides *et al.* (1974) introduziram modelos *in situ* inicialmente para o estudo da cárie dentária e que, posteriormente, foram adaptados para a Endodontia. As principais vantagens dos modelos de indução de biofilme *in situ* são:

- devido ao fato da cavidade oral ser o microambiente onde a infecção bacteriana é induzida, as características deste meio são diferentes das obtidas em estudos *in vitro* e em animais e, portanto, mais próximas às condições reais;

- a microbiota oral humana é capaz de colonizar facilmente diferentes superfícies;

- a indução do biofilme é realizada em um curto espaço de tempo (três dias, no presente estudo) em comparação com a indução de biofilmes *in vitro*. Tal diminuição no tempo de indução facilita a superação de muitos aspectos éticos relacionados à pesquisas com seres humanos.

- o biofilme oral formado apresenta característica polimicrobiana e de multi-espécies, podendo apresentar até 800 espécies bacterianas presentes na cavidade oral (PASTER *et al.*, 2006; PREZA *et al.*, 2008).

Em contrapartida, o limitado número de participantes voluntários devido à incomodidade do uso do dispositivo intraoral e a dependência da colaboração dos mesmos nos cuidados com higiene e alimentação constituem as principais desvantagens deste método. Na tentativa de minimizar este aspecto, um número reduzido de voluntários (apenas dois) utilizou o dispositivo intraoral. Dessa maneira, para induzir a formação de biofilme em 60 blocos de dentina, cada um dos voluntários teve que repetir o processo de indução de biofilme por três vezes.

Após o estudo de Kolourides *et al.* (1974), outros trabalhos foram conduzidos utilizando a indução de biofilme intraoral (BARTHEL *et al.*, 2002; VIRTEJ *et al.*, 2007; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2014). Barthel *et al.* (2002) induziram a formação de biofilme intraoral *in situ* sobre cilindros de dentina e, após comprovada a colonização bacteriana, tais cilindros receberam as medicações intracanáis estudadas (pasta de hidróxido de cálcio, clorexidina 5% e cones de guta percha contendo tanto hidróxido de cálcio quanto clorexidina) e foram levados à incubadora por sete dias até o período de avaliação dos espécimes. Da mesma forma, Ordinola-Zapata *et al.* (2013) mantiveram as amostras incubadas por sete dias após a aplicação das medicações intracanáis testadas (hidróxido de cálcio, clorexidina gel 2% e pasta triantibiótica). No presente estudo, à exemplo dos estudos de Ordinola-Zapata *et al.* (2011) e Ordinola-Zapata *et al.* (2014), a análise do volume de biofilme e da viabilidade celular deu-se imediatamente após a aplicação dos agentes antimicrobianos e apenas um dia após a remoção dos blocos de dentina infectados do dispositivo intraoral. Inicialmente, através de um estudo piloto, tentou-se realizar a análise em MCL imediatamente após a remoção dos blocos de dentina do dispositivo intraoral. Contudo, a quantidade de biofilme formada era muito pequena, dificultando a visualização e análise. Dessa maneira, à exemplo do estudos de Ordinola-Zapata *et al.* (2011) e Del Carpio Perochena *et al.* (2011), as amostras foram imersas individualmente em tubos plásticos do tipo *ependorf* contendo BHI caldo por 24 horas para induzir maior e mais espessa formação de biofilme no substrato.

Além da dentina bovina, diferentes substratos têm sido utilizados para induzir a colonização bacteriana e consequente indução de biofilme. Dentre eles podem ser citados a própria dentina humana (Machado *et al.*, 2013), discos de hidroxiapatita (SHEN *et al.*, 2010) e membranas de metilcelulose (DENG *et al.*, 2004). No presente estudo foi utilizada dentina bovina como substrato pelo fato de ela apresentar similaridade microscópica e macroscópica com a dentina humana (SCHILKE *et al.*, 2000; CAMARGO *et al.*, 2007). De acordo com Camargo *et al.* (2007) a dentina radicular bovina, assim como a dentina humana, apresenta túbulos dentinários em maior quantidade e em

maior diâmetro na sua porção cervical e, à medida que se aproxima da região apical, o número de túbulos e seus diâmetros diminuem. A dentina bovina apresenta maior número de túbulos dentinários em comparação à dentina humana, porém o diâmetro dos túbulos dentinários de ambos os substratos são similares (CAMARGO *et al.*, 2007). No presente estudo, tais diferenças entre dentina humana e bovina não constituem aspectos relevantes, uma vez que o objeto do estudo foi o biofilme oral formado na superfície do substrato e não a penetração intratubular destes microrganismos.

Alguns autores têm reportado o efeito deletério de raspas de dentina, componentes orgânicos, bactérias não viáveis e exsudato purulento, quando em altas concentrações, sobre a capacidade antimicrobiana de algumas soluções irrigadoras (HAAPASALO *et al.*, 2007; MORGENTAL *et al.*, 2013; SLUTZKY-GOLDBERG *et al.*, 2013). Morgental *et al.* (2013) expuseram cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC29212) à alguns irrigantes (NaOCl, CHX, QMix e EDTA), na ausência e na presença de raspas de dentina. Os autores observaram que as raspas de dentina retardaram a ação antimicrobiana do NaOCl e do QMIX quando o tempo de contato destas soluções foi de até 1 minuto. No período experimental de 6 horas, a presença de raspas de dentina não influenciou a capacidade antimicrobiana das soluções irrigadoras. Em razão deste efeito inibitório em períodos mais curtos de contato do irrigante com o substrato, estudos que objetivam avaliar o efeito antimicrobiano dos irrigantes ou sua capacidade de dissolução de biofilme acabam por realizar a renovação do irrigante após 5 minutos (DEL CARPIO PEROCHENA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2011). Neste estudo, as soluções irrigadoras não foram renovadas para cada espécime, pois o período de contato das soluções com o substrato foi de apenas 5 minutos. A opção pela clorexidina e pelo hipoclorito de sódio deu-se em função de ambas soluções serem amplamente empregadas em Endodontia, com seu uso sendo recomendado por praticamente um século no caso do hipoclorito de sódio (COOLIDGE, 1919; WALKER, 1936) e há mais de trinta anos para a clorexidina (DELANY *et al.*, 1982).

Deve-se reconhecer que nenhum método *in situ* é capaz de fielmente refletir as condições em que os microrganismos crescem e se desenvolvem no

interior do canal radicular. A implementação de modelos que levam em consideração que os microrganismos endodônticos são mais ou menos susceptíveis à ação dos agentes antimicrobianos, quando organizados em comunidades aderidas às paredes do canal radicular, devem melhorar nossa compreensão da sua persistência e como eles podem ser eliminados ou reduzidos clinicamente do sistema de canais radiculares.

Dos resultados

Terapias auxiliares vêm sendo propostas em associação com os métodos convencionais de desinfecção do canal radicular. Nesse contexto, podemos citar a irrigação ultrassônica passiva (*passive ultrasonic irrigation – PUI*), sistema de irrigação por pressão negativa (EndoVac) e sistemas a laser (desinfecção fotoativada). Com relação à PDT, o potencial antimicrobiano desta técnica vem sendo bastante estudado, tanto em investigações *in vitro*, quanto *in vivo* (Garcez *et al.* 2010, Souza *et al.* 2010, Silva *et al.* 2012, Bago *et al.* 2013; Chrepa *et al.* 2014).

Por razões metodológicas, este estudo foi delineado para avaliar o efeito antibacteriano e de dissolução de biofilme pelas soluções irrigadoras e sua combinação com a PDT sobre biofilmes mono-espécie e multi-espécies. Cabe ressaltar que o processo de irrigação consiste em apenas uma das etapas do tratamento endodôntico. O processo de desinfecção do sistema de canais radiculares contempla, ainda, a ação mecânica dos instrumentos endodônticos e a utilização de medicação intracanal.

Estudos anteriores avaliaram o efeito isolado da PDT na desinfecção de canais radiculares, porém não estudaram o efeito desta terapia associada às soluções antibacterianas como o NaOCl e a CHX (Foschi *et al.* 2007; Bergmans *et al.* 2008; Miyabe *et al.* 2011, Ghinzelli *et al.* 2014). Ghinzelli *et al.* (2014) compararam a técnica tradicional de PDT com a ativação ultrassônica do azul de metileno previamente à PDT na eliminação de *E. faecalis* de canais contaminados *in vitro*. Miyabe *et al.* (2011) observaram que a PDT foi efetiva em reduzir o número de células viáveis de 20 cepas de *Staphylococcus* estudadas. Estas investigações e tantas outras apontam para um efeito deletério significativo da PDT sobre células bacterianas. Entretanto, em

consonância com o que a literatura vem propondo, a PDT é indicada como um método coadjuvante no processo de desinfecção do canal radicular. Em função disso, parece lícito propor a investigação de seus efeitos antibacterianos, de dissolução de biofilme, bem como de seus efeitos adversos, após a utilização de soluções irrigadoras, após o preparo biomecânico do canal radicular e até mesmo após eventual uso de medicação intracanal. Por si só, tais ações podem reduzir de tal maneira a carga microbiana, que a PDT não exerça nenhum efeito adicional.

Inicialmente, o número de UFCs foi similar para todas as soluções testadas (S1) ($P > 0,05$). Esta verificação é importante, uma vez que identifica o padrão uniforme de infecção alcançado pelo método empregado. Pôde ser observado em S1 que a mediana da contagem de UFCs ($\times 10^4$ UFC/mL) foi de 200, 100,7 e 108,2 para o SORO, NaOCl e CHX, respectivamente. Diversos estudos têm utilizado metodologias similares para identificar a redução da carga bacteriana através de métodos de tradicionais de cultura (Soares *et al.* 2010, Alves *et al.* 2011, Machado *et al.* 2013). Neste estudo foi verificada a ação química da solução irrigadora e o efeito físico do processo irrigação/aspiração, além da ação da PDT sobre o *E. faecalis*. Caso o efeito mecânico do preparo do canal fosse incluído como variável, provavelmente a quantidade de microrganismos observada após o preparo seria muito baixa, minimizando o efeito químico das soluções irrigadoras e da PDT, objetos do estudo (Oliveira *et al.* 2007, Dornelles-Morgental *et al.* 2011). O referido fato foi observado por Dornelles-Morgental *et al.* (2011), onde foram feitas coletas após o preparo manual até lima #50 associado com irrigações com NaOCl e CHX, entre outros irrigantes e combinações. Canais preparados e irrigados com NaOCl 2,5% e solução de clorexidina 2% não apresentaram unidades formadoras de colônia imediatamente após o preparo biomecânico, provavelmente pelo efeito químico combinado dos irrigantes com a ação mecânica dos instrumentos.

A primeira hipótese nula foi rejeitada. Houve diferença na contagem de UFCs após o contato com as soluções irrigadoras e após a PDT frente ao biofilme mono-espécie. Foi observada diminuição significativa na contagem de UFCs em S2 em todos os grupos, inclusive no grupo SORO ($P < 0,05$). Este

efeito deve-se à ação física do processo de irrigação/aspiração responsável pela redução significativa das bactérias planctônicas (observadas pelos métodos de coleta e cultura). Cabe ressaltar que o presente estudo não teve por objetivo avaliar a capacidade de desinfecção da PDT associada às soluções irrigadoras restadas frente aos microrganismos localizados no interior dos túbulos dentinários ou em estruturas anatômicas complexas como em canais laterais, colaterais, deltas apical. Além disso, investigações a respeito do potencial antimicrobiano da PDT em dentes com complexidades anatômicas devem ser conduzidas.

A ação física combinada com o potencial antimicrobiano da CHX 2% e do NaOCl 2,5% proporcionou as menores contagens de UFCs em S2 ($P < 0,05$), sem diferenças entre si ($P > 0,05$). É sabido o efeito antimicrobiano destas soluções, especialmente quando o método de avaliação consiste na coleta com cones de papel absorvente (Gomes *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2007, Dornelles-Morgental *et al.* 2011). Soma-se a isso o fato de o NaOCl e a CHX, nas concentrações estudadas neste trabalho, serem indicados para desinfecção de canais necróticos (Spratt *et al.* 2001, Sena *et al.* 2006, Clegg *et al.* 2006). Rôças & Siqueira (2011), em um estudo clínico utilizando 47 dentes com periodontite apical cônica, observaram similar redução dos tipos de microrganismos e de seus níveis promovidos pela solução de CHX 0,12% e pelo NaOCl 2,5%.

Estudos prévios têm confirmado o efeito bactericida da PDT, especialmente quando associadas às soluções com potencial antimicrobiano (Foschi *et al.* 2007, Bergmans *et al.* 2008, Garcez *et al.* 2010). Recente revisão sistemática alerta para a escassez de informações clínicas a respeito do potencial bactericida da terapia fotodinâmica, entretanto apontam para uma efetividade em torno de 91%-100% da PDT no processo de desinfecção do sistema de canais radiculares (Chrepa *et al.* 2014). Na presente pesquisa, o grupo controle (SORO) apresentou 70% de redução bacteriana após aplicação da PDT (S3) ($P < 0,05$). Foschi *et al.* (2007) observaram porcentagem de redução bacteriana similar à encontrada no presente estudo (77%) após aplicação do laser de diodo com fibra óptica associado ao azul de metileno.

Por outro lado, a aplicação da PDT (S3), após a utilização das soluções antimicrobianas, reduziu a quantidade de UFCs, porém sem diferenças significativas ($P > 0,05$). A utilização das soluções irrigadoras antibacterianas por si só foi capaz de reduzir a contagem de UFCs de tal forma que o efeito da PDT não foi detectado estatisticamente. Além disso, após a aplicação da PDT (S3), uma importante informação é que 50% das amostras do grupo NaOCl e 60% das amostras do grupo CHX não apresentaram formação de UFCs. Em um estudo *in vivo* a aplicação da PDT associada ao tratamento endodôntico convencional com hipoclorito de sódio 2,5% resultou em uma expressiva diminuição da carga microbiana (Garcez *et al.* 2010). Após tratamento convencional, 33% das amostras apresentaram-se livres de microrganismos, ao passo que as coletas após preparo do canal e aplicação da PDT indicaram ausência de microrganismos frente aos métodos de cultura convencional para todas as amostras (Garcez *et al.* 2010).

A segunda hipótese nula deste estudo foi confirmada. A PDT não alterou a quantidade de células viáveis, tampouco o volume de biofilme multi-espécies observado através da microscopia confocal a laser. No presente estudo, não foi observado efeito antibacteriano da PDT no grupo controle. Os índices de células viáveis nos grupos SORO e SORO/PDT foram similares (93,1% e 91,2%, respectivamente). O soro fisiológico é uma solução inerte, desprovida de qualquer ação antibacteriana. Dessa maneira, esperava-se não observar ação antimicrobiana de tal solução. Sendo assim, à exemplo de estudos anteriores, foi proposta a utilização do soro fisiológico como controle para as soluções irrigadoras com potencial antimicrobiano e para aplicação da terapia fotodinâmica (Bago *et al.* 2013, Zand *et al.* 2014). Podemos atribuir às limitações da metodologia empregada a pequena quantidade de células não-viáveis, 7% no grupo SORO e 9% no grupo SORO/PDT. Tal morte celular provavelmente ocorreu por saturação do meio ou pelo processamento das amostras para análise em microscopia confocal à laser.

Por outro lado, nos grupos onde soluções antibacterianas foram utilizadas, a PDT parece ter exercido efeito antibacteriano complementar, embora não tenha ocorrido diferença significativa ($P > 0,05$). No grupo NaOCl/PDT houve uma redução de 62% no número de células viáveis em

comparação ao grupo NaOCl. Ao passo que no grupo CHX/PDT a redução foi de 35%.

A razão pela qual a PDT exerce maior efeito antibacteriano após aplicação de soluções antibacterianas ainda é uma incógnita. Entretanto, algumas considerações podem ser comentadas com relação a este fato. Talvez, a irradiação do laser no fotossensibilizante seja mais efetiva quando da presença apenas de microrganismos residuais, resistentes ao primeiro contato com o irrigante antibacteriano. Esse aspecto ressalta a característica coadjuvante da terapia fotodinâmica no processo de desinfecção dos canais radiculares (Bergmans *et al.* 2008, Silva *et al.* 2012). Em contrapartida, quando o biofilme está estruturado sem ser previamente desorganizado pelo irrigante ou pela ação mecânica do instrumento, a PDT parece não ter efeito (SORO e SORO/PDT, $P > 0,05$). A transferência de energia do fotossensibilizante ativado para o oxigênio disponível origina íons oxigênio altamente reativos e radicais livres, que podem produzir injúria e destruição de microrganismos através de danos a moléculas celulares essenciais, incluindo proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos (Konopka & Goslinski 2007). O poder de oxidação do oxigênio singlete tem se mostrado indutor dos efeitos bactericidas. Os detalhes da relação entre quantidade de oxigênio singlete e o grau de efeito antibacteriano, bem como da quantidade de biofilme presente no substrato e o potencial bactericida da PDT, ainda não estão bem estabelecidos (Komine & Tsujimoto 2013).

Nenhum estudo prévio avaliou a capacidade de dissolução de biofilme promovida pela desinfecção fotoativada. Em contrapartida, a capacidade de dissolução de matéria orgânica das soluções irrigadoras está diretamente associada ao tipo de solução irrigante, e, no caso do hipoclorito de sódio, à sua concentração (Naenni *et al.* 2004, Sirtes *et al.* 2005, Irala *et al.* 2010, Stojicic *et al.* 2010, Só *et al.* 2011). No presente estudo, em concordância com a literatura, os menores volumes de biofilme, sejam eles totais ou de células viáveis, foram observados nos grupos onde o NaOCl foi utilizado. Estudos prévios têm sido unânimes em afirmar que a CHX não é capaz de dissolver matéria orgânica, seja na forma líquida ou gel (Marley *et al.* 2001, Okino *et al.* 2004). Entretanto, foram observados valores intermediários de volume de

biofilme total para os grupos em que foi utilizada a CHX ($33,9 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ para CHX e $35,1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ para CHX/PDT). A explicação mais racional para este achado parece estar relacionada com o efeito bactericida da CHX na concentração de 2%. De acordo com Gomes *et al.* (2013) o efeito bactericida da CHX 2% ocorre pela precipitação/coagulação do citoplasma bacteriano. Tal precipitação origina *debris* celulares no interior do canal radicular, que podem ser facilmente removidos através de uma vigorosa irrigação com água destilada (Vianna *et al.* 2006). No presente estudo, a remoção deste conteúdo citoplasmático extravasado parece ter ocorrido pela irrigação utilizando 1 mL de soro fisiológico após a imersão nas soluções testadas.

Vale ressaltar que a presente metodologia para avaliação da efetividade da PDT sobre biofilme mono-espécie não contempla a análise bacteriana no interior dos túbulos dentinários. O referido aspecto pode e deve ser abordado em estudos futuros para analisar o efeito destas soluções e da PDT no interior desta estrutura e nas irregularidades do canal radicular em dentes com morfologia complexa. Ainda, o modelo de biofilme multi-espécies apresenta como substrato uma superfície plana onde o biofilme é formado. Teoricamente, o acesso dos irrigantes, do fotossensibilizante e de uma luz de comprimento de onda específico é facilitado nesta estrutura. Como resultado, o efeito antibacteriano e de dissolução tecidual dos irrigantes e da PDT podem ser superestimados.

6. CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e dos resultados obtidos no presente estudo, é lícito concluir que:

- a aplicação da PDT, após irrigação com solução inerte (soro fisiológico), reduziu a quantidade bacteriana em canais radiculares contaminados com biofilme mono-espécie (*E. faecalis*);
- a irrigação com NaOCl 2,5% e CHX 2% diminuiu consideravelmente a carga bacteriana, de modo que a PDT não exerceu influência significativa na redução bacteriana de S2 para S3;

- a PDT reduziu a quantidade e o volume de células viáveis quando associada a soluções antibacterianas em biofilme multi-espécies induzido *in situ*;

- a terapia fotodinâmica não foi capaz de reduzir o volume total de biofilme *in situ*, porém o tipo de solução irrigadora foi determinante para a dissolução de biofilme.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAS, J.A., *et al.* Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol.** v. 43, n. 11, p. 5721-32, 2005.

AGRAWAL, V., RAO, M.R., DHINGRA, K., GOPAL, V.R., MOHAPATRA, A., MOHAPATRA, A. An *in vitro* comparison of antimicrobial efficacy of three root canal irrigants-BioPure MTAD, 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as a final rinse against *E. faecalis*. **J Contemp Dent Pract.** v. 14, 5, p. 842-7, 2013.

AL-NAZHAN, S., AL-OBAIDA, M. Effectiveness of a 2% chlorhexidine solution mixed with calcium hydroxide against *Candida albicans*. **Aust Endod J.** v. 34, n. 3, p. 133-5, 2008

ALVES, F.R., ALMEIDA, B.M., NEVES, M.A., MORENO, J.O., RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA, J.F. JR. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. **J Endod.** v. 37, n. 4, p. 496-501, 2011.

ARI, H., YAŞAR, E., BELLÍ S. Effects of NaOCl on bond strengths of resin cements to root canal dentin. **J Endod.** v. 29, n. 4, p. 248-51, 2003.

ATHAR, M., MUKHTAR, H., ELMETS, C.A., ZAIM, M.T., LLOYD, J.R., BICKERS, D.R. *In situ* evidence for the involvement of superoxide anions in cutaneous porphyrin photosensitization. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 151, n. 3, p. 1054-9, 1988.

BAGO, I., PLEČKO, V., GABRIĆ PANDURIĆ, D., SCHAUPERL, Z., BARABA, A., ANIĆ, I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. **Int Endod J.** v. 46, n. 4, p. 339-47, 2013.

BAHCALL, J., HOWARD, P., MISERENDINO, L., WALIA, H. Preliminary investigation of the histological effects of laser endodontic treatment on the periradicular tissues in dogs. **J Endod.** v. 18, n. 2, p. 47-51, 1992.

BAILÓN-SÁNCHEZ, M.E., BACA, P., RUIZ-LINARES, M., FERRER-LUQUE, C.M. Antibacterial and anti-biofilm activity of AH plus with chlorhexidine and cetrimide. **J Endod.** v. 40, n. 7, p. 977-81, 2014.

BARTHEL, C.R., ZIMMER, S., ZILLIGES, S., SCHILLER, R., GÖBEL, U.B., ROULET, J.F. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. **J Endod.** v. 28, n. 6, p. 427-30, 2002.

BAUMGARTNER, J.C., *et al.* Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. **J Endod.** v. 30, n. 3, p. 141-4, 2004.

BERBER, V.B., *et al.* Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **Int Endod J.** v. 39, n. 1, p. 10-7, 2006.

BERGMANS, L., MOISIADIS, P., HUYBRECHTS, B., VAN MEERBEEK, B., QUIRYNEN, M., LAMBRECHTS, P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **Int Endod J.** v. 41, n. 3, p. 227–239, 2008.

BLOOMFIELD, S.F., MILES, G.A. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. **J Appl Bacteriol.** v. 46, n. 1, p. 65-73, 1979.

BONSOR, S.J., NICHOL, R., REID, T.M. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an *in vivo* study). **Br Dent J.** v. 200, n. 6, p. 337-341, 2006.

BUKIET, F., *et al.* Wetting properties and critical micellar concentration of benzalkonium chloride mixed in sodium hypochlorite. **J Endod.** v. 38, n. 11, p. 1525-9, 2012.

BYSTRÖM, A., CLAEISSON, R., SUNDQVIST G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol.** v. 1, n. 5, p. 170-5, 1985.

CÂMARA, A.C., DE ALBUQUERQUE, M.M., AGUIAR, C.M., DE BARROS CORREIA, A.C. *In vitro* antimicrobial activity of 0.5%, 1%, and 2.5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with the ProTaper Universal system. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 108, n. 2, e55-61, 2009.

CAMARGO, C.H., SIVIERO, M., CAMARGO, S.E., DE OLIVEIRA, S.H., CARVALHO, C.A., VALERA, M.C. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. **J Endod.** v. 33, n. 4, p. 422-6, 2007.

CARON, G., NHAM, K., BRONNEC, F., MACHTOU, P. Effectiveness of different final irrigant activation protocols on smear layer removal in curved canals. **J Endod.** v. 36, n. 8, p. 1361-6, 2010.

CARR, G.B., SCHWARTZ, R.S., SCHAUDINN, C., GORUR, A., COSTERTON, J.W. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. **J Endod.** v. 35, n. 9, p. 1303-9, 2009.

CASE, P.D., BIRD, P.S., KAHLER, W.A., GEORGE, R., WALSH, L.J. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **J Endod.** v. 38, n. 4, p. 523-6, 2012.

CENGIZ, T., AKTENER, B.O., PISKIN, B. Effect of dentinal tubule orientation on the removal of smear layer by root canal irrigants. A scanning electron microscopic study. **Int Endod J.** v. 23, n. 3, p. 163-71, 1990.

CHASSOT, A.L., POISL, M.I., SAMUEL, S.M. *In vivo* and *in vitro* evaluation of the efficacy of a peracetic acid-based disinfectant for decontamination of acrylic resins. **Braz Dent J.** v. 17, n. 2, p. 17-21, 2006.

CHÁVEZ DE PAZ, L.E., BERGENHOLTZ, G., SVENSÄTER, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. **J Endod.** v. 36, n. 1, p. 70-7, 2010.

CHEUNG, G.S., STOCK, C.J. *In vitro* cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. **Int Endod J.** v. 26, n. 6, p. 334-43, 1993.

CHIVATXARANUKUL, P., DASHPER, S.G., MESSER, H.H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J.** v. 41, n. 10, p. 873-82, 2008.

CHREPA, V., *et al.* The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. **J Endod.** v. 40, n. 7, p. 891-8, 2014.

CLARKSON, R.M., *et al.* The effect of surfactant on the dissolution of porcine pulpal tissue by sodium hypochlorite solutions. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1257-60, 2012.

COHENCA, N., HEILBORN, C., JOHNSON, J.D., FLORES, D.S., ITO, I.Y., DA SILVA, L.A. Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 109, n. 1, e42-6, 2010.

COLDERO, L.G., MCHUGH, S., MACKENZIE, D., SAUNDERS, W.P. Reduction in intracanal bacteria during root canal preparation with and without apical enlargement. **Int Endod J.** v. 35, n. 5, p. 437-46, 2002.

COOLIDGE, E. The diagnosis and treatment of conditions resulting from diseased dental pulps. **J Na Dent Assoc.** v. 6, p. 337-349, 1919.

COSTERTON, J.W. **The biofilm primer.** Berlin/New York: Springer; 2007.

DÁHLEN, G., MÖLLER A.J.R. **Microbiology of endodontic infections.** In: Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 1st edn. St Louis, Missouri, USA: Mosby-Year Book, p. 444-75. 1992.

DAMETTO, F.R., FERRAZ, C.C., GOMES, B.P., ZAIA, A.A., TEIXEIRA, F.B., DE SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 99, n. 6, p. 768-72, 2005.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A.E., *et al.* Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. **J Endod.** v. 37, n. 8, p. 1134-8, 2011.

DELANY, G.M., PATTERSON, S.S., MILLER, C.H., NEWTON, C.W. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 53, n. 5, p. 518-23, 1982.

DENG, D.M., BUIJS, M.J., TEN CATE, J.M. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. **Eur J Oral Sci.** v. 112, n. 1, p. 42-7, 2004.

DORNELLES-MORGENTAL, R., GUERREIRO-TANOMARU, J.M., DE FARIA-JÚNIOR, N.B., HUNGARO-DUARTE, M.A., KUGA, M.C., TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 112, n. 3, p. 396-400, 2011.

DOUGHERTY, T.J., *et al.* Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst.** v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

DU, T., WANG, Z., SHEN, Y., MA, J., CAO, Y., HAAPASALO, M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **J Endod.** v. 40, n. 4, p. 509-14, 2014.

DU, T., WANG, Z., SHEN, Y., MA, J., CAO, Y., HAAPASALO, M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **J Endod.** v. 40, n. 4, p. 509-14, 2014.

DUTTA, A., SAUNDERS, W. P. Comparative evolution of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on soft-tissue dissolution. **J Endod.** v. 38, n. 10, p. 1395-8, 2012.

ENDO, M.S., *et al.* Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. **Eur J Dent.** v. 7, n. 3, p. 302-9, 2013.

ESTRELA, C., ESTRELA, C.R., BARBIN, E.L., SPANÓ, J.C., MARCHESAN, M.A., PÉCORÁ, J.D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz Dent J.** v. 13, n. 2, p. 113-7, 2002.

ESTRELA, C., SILVA, J.A., DE ALENCAR, A.H., LELES, C.R., DECURCIO, D.A. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* - a systematic review. **J Appl Oral Sci.** v. 16, n 6, p. 364-8, 2008.

FARINA, A.P., CECCHIN, D., BARBIZAM, J.V., CARLINI-JÚNIOR, B. Influence of endodontic irrigants on bond strength of a self-etching adhesive. **Aust Endod J.** v. 37, n. 1, p. 26-30, 2011.

FERRAZ, C.C., GOMES, B.P., ZAIA, A.A., TEIXEIRA, F.B., SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod.** v. 27, n. 7, p. 452-5, 2001.

FERRAZ, C.C.R., *et al.* *In vitro* assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod.** v. 27, n. 7, p. 452-5, 2001.

FIGDOR, D., DAVIES, J.K., SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol.** v. 18, n. 4, p. 234-239, 2003.

FIMPLE, J.L., *et al.* Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. **J Endod.** v. 34, n. 6, p. 728-34, 2008.

FLYNN, T.R., *et al.* Molecular methods for diagnosis of odontogenic infections. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 70, n. 8, p. 1854-9, 2012.

FONSECA, M.B., *et al.* Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Photomed Laser Surg.** v. 26, n. 3, p. 209-13, 2008.

FOSCHI, F., *et al.* Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*. **Lasers Surg Med.** v. 39, n. 10, p. 782-7, 2007.

FRASER, J.G. Chelating agents: their softening effect on root canal dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology** v. 37, n. 5, p. 803–11, 1974.

GARBEROGLIO, R., BECCE, C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 78, n. 3, p. 359-67, 1994.

GARCEZ, A.S., *et al.* The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? **Lasers Med Sci.** v. 28, n. 1, p. 79-85, 2013.

GARCEZ, A.S., NUÑEZ, S.C., HAMBLIM, M.R., SUZUKI, H., RIBEIRO, M.S. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. **J Endod.** v. 36, n. 9, p. 1463-6, 2010.

GARCEZ, A.S., NUÑEZ, S.C., HAMBLIN, M.R., RIBEIRO, M.S. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **J Endod.** v. 34, n. 2, p. 138-42, 2008.

GARCEZ, A.S., RIBEIRO, M.S., TEGOS, G.P., NUNEZ, S.C., JORGE, A.O., HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Surg Med.** v. 39, n. 1, p. 59–66, 2007.

GHINZELLI, G.C, *et al.* Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis* - an *in vitro* study. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** 2014. [Epub ahead of print].

GOLDMAN, M., GOLDMAN, L.B., CAVALERI, R., BOGIS, J., LIN, P.S. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: Part 2. **J Endod.** v. 8, n. 11, p. 487-92, 1982.

GOMES, B.P., *et al.* Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **J Endod.** v. 34, n. 5, p. 537-40, 2008.

GOMES, B.P., FERRAZ, C.C., VIANNA, M.E., BERBER, V.B., TEIXEIRA, F.B., SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J.** v. 34, n. 6, p. 424-8, 2001.

GOMES, B.P.F.A., DRUCKER, D.B., LILLEY, J.D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **Int Endod J.** v. 27, n. 6, p. 291-8, 1996.

GREGORIO, C., *et al.* Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an *in vivo* study. **J Endod.** v. 36, n. 7, p. 1216-21, 2010.

GREGORIO, C., *et al.* Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an *in vivo* study. **J Endod.** v. 36, n. 7, p. 1216-21, 2010.

GROSSMAN, L.I. Irrigation of root canals. **J Amer Dent Assoc.** v. 30, n. 12, p. 1915-7, 1943.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M., MORGENTAL, R.D., FARIA-JUNIOR, N.B., BERBERT, F.L., TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial effectiveness of peracetic acid and conventional endodontic irrigants. **Braz Dent J.** v. 22, n. 4, p. 285-7, 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M., NASCIMENTO, C.A., FARIA-JÚNIOR, N.B., GRAEFF, M.S., WATANABE, E., TANOMARU-FILHO, M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. **Int Endod J.** v. 47, n. 11, p. 1058-63, 2014.

GURSOY, H, *et al.* Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. **Clin Oral Investig.** v. 17, n. 4, p. 1113-25, 2013

HAAPASALO, H.K., SIRÉN, E.K., WALTIMO, T.M., ØRSTAVIK, D., HAAPASALO, M.P. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. **Int Endod J.** v. 33, n. 2, p. 126-31, 2000.

HAAPASALO, M., *et al.* Irrigation in Endodontics. **Dent Clin N Am.** v. 54, n.2, p. 291–312. 2010.

HAAPASALO, M., QIAN, W., PORTENIER, I., WALTIMO, T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **J Endod.** v. 33, n. 8, p. 917-25, 2007.

HARDEE, M.W., MISERENDINO, L., KOS, W., WALIA, H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. **J Endod.** v. 20, n. 8, p. 377-380, 1994.

HAYASHI, H., SAKAMOTO, M., BENNO, Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. **Microbiol Immunol.** v. 46, n. 8, p. 535-48, 2002.

HOHSCHIEDT, G.L., BÖTTCHER, D.E., FATTURI PAROLO, C.C., MONTAGNER, F., GRECCA, F.S. Response of *E. faecalis* biofilms to different associations of auxiliary substances during root canal preparation: a confocal laser microscopy analysis. **Microsc Res Tech.** v. 76, n. 6, p. 658-62, 2013.

IRALA, L.E., GRAZZIOTIN-SOARES, R., SALLES, A.A., MUNARI, A.Z., PEREIRA, J.S. Dissolution of bovine pulp tissue in solutions consisting of varying NaOCl concentrations and combined with EDTA. **Braz Oral Res.** v. 24, n. 3, p. 271-6, 2010.

ISHIZUKA, T., *et al.* Effect of NaOCl treatment on bonding to root canal dentin using a new evaluation method. **Dent Mater J.** v. 20, n. 1, p. 24-33, 2001.

JETT, B.D., HUYCKE, M.M., GILMORE, M.S. Virulence of *enterococci*. **Clin Microbiol Rev.** v. 7, n. 4, p. 462-78, 1994.

JOHN C., LÖST C., ELAYOUTI A. Ultrasonic monitoring of the effect of sodium hypochlorite on the elasticity of dentine. **Int Endod J.** v. 46, n. 5, p. 477–82, 2013.

KANTZ, W.E., HENRY, C.A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of nonvital teeth in man. **Archs Oral Biol.** 1974; v. 19, n. 1, p. 91–6, 1974.

KAYAOGLU, G., ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 15, n. 5, p. 308-20, 2004.

KHADEMI, A.A., MOHAMMADI, Z., HAVAEE, A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. **Aust Endod J.** v. 32, n. 3, p. 112-5, 2006.

KOMINE, C., TSUJIMOTO, Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **J Endod.** v. 39, n. 3, p. 411-4, 2013.

KONAN, Y.N., BERTON, M., GURNY, R., ALLÉMANN, E. Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. **Eur J Pharm Sci.** v. 18, n. 3-4, p. 241-9, 2003.

KONOPKA, K., GOSLINSKI, T. Photodynamic therapy in dentistry. **J Dent Res.** v. 86, n. 11, p. 1126, 2007.

KOULOURLIDES, T., PHANTUMVANIT, P., MUNKSGAARD, E.C., HOUSCH, T. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. **J Oral Pathol.** v. 3, n. 4, p. 185-96, 1974.

KUGA, M.C., *et al.* Penetration into dentin of sodium hypochlorite associated with acid solutions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 112, n. 12, p. 155-9, 2011.

LANA, P.E., SCELZA, M.F., SILVA, L.E., MATTOS-GUARALDI, A.L., HIRATA JÚNIOR, R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. **Braz Dent J.** v. 20, n. 1, p. 32-6, 2009.

LEE JK, *et al.* Antibacterial efficacy of a human β -defensin-3 peptide on multispecies biofilms. **J Endod.** v. 39, n. 12, p. 1625-9, 2013.

LEONARDO, M.R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos.** São Paulo: Artes Médicas; 2005. 1491 p.

LIN, J., SHEN, Y., HAAPASALO, M.A. Comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel *in vitro* biofilm model. **J Endod.** v. 39, n. 5, p. 658–63, 2013.

LOPES, H.P., SIQUEIRA JR, J.F., ELIAS, C.N. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes, H.P., J.F. Siqueira Jr. **Endodontia: Biologia e Técnica.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2004. p. 535-79. cap 18.

MA, J., WANG, Z., SHEN, Y., HAAPASALO, M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. **J Endod.** v. 37, n. 10, p. 1380-5, 2011.

MACHADO, M.E., *et al.* Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. **Int Endod J.** v.46, n.11, p. 1083-7, 2013.

MARENDING, M., *et al.* Effects of sodium hypochlorite on human root dentine-mechanical, chemical and structural evaluation. **Int Endod J.** v. 40, n. 10, p. 786–93, 2007.

MARLEY, J.T., FERGUSON, D.B., HARTWELL, G.R. Effects of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: short-term results. **J Endod.** v. 27, n. 12, p. 775-778, 2001.

MARTINHO, F.C., *et al.* Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and

cultivable bacteria from primarily infected root canals. **J Endod.** v. 40, n. 5, p. 625-9, 2014.

MEIRE, M.A., DE PRIJCK, K., COENYE, T., NELIS, H.J., DE MOOR, R.J. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. **Int Endod J.** v. 42, n. 4, p. 351-9, 2009.

MEIRE, M.A., *et al.* Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. **Int Endod J.** v. 42, n. 4, p. 351-9, 2009.

MIMS, C., *et al.* Mims' Pathogenesis of Infectious Disease. New York: Academic Press, 1995.

MIRANDA, R.G., SANTOS, E.B., SOUTO, R.M., GUSMAN, H., COLOMBO, A.P. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J.** v. 46, n. 6, p. 499-505, 2013.

MIYABE, M., JUNQUEIRA, J.C., COSTA, A.C., JORGE, A.O., RIBEIRO, M.S., FEIST, I.S. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus spp.* **Braz Oral Res.** v. 25, n. 3, p. 230-4, 2011.

MOAN, J. Properties for optimal PDT sensitizers. **J Photochem Photobiol B.** v. 5, n. (3-4), p. 521-4, 1990.

MOLANDER, A., *et al.* Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J.** v. 31, n. 1, p. 1-7, 1998.

MOREIRA, D.M., *et al.* Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. **J Endod.** v. 35, n. 7, p. 1023-7, 2009.

MORGENTAL, R.D., SINGH, A., SAPPAL, H., KOPPER, P.M., VIERPELISSER, F.V., PETERS, O.A. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. **J Endod.** v. 39, n. 3, p. 406-10, 2013.

MORRIS, M.D., *et al.* Effects of sodium hypochlorite and RC-Prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. **J Endod.** v. 27, n. 7, p. 753-7, 2001.

MUHAMMAD, O.H., CHEVALIER, M., ROCCA, J.P., BRULAT-BOUCHARD, N., MEDIONI, E. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: interaction with endodontic microbial biofilm, an *ex vivo* study. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 11, n. 2, p. 171-81, 2014.

NAIR, P.N., SJÖGREN, U., FIGDOR, D., SUNDQVIST, G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 87, n. 5, p. 617-27, 1999.

NAIR, P.N., HENRY, S., CANO, V., VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 99, n. 2, p. 231-52, 2005.

NG, R., *et al.* Endodontic photodynamic therapy *ex vivo*. **J Endod.** v. 37, n. 2, p. 217-22, 2011.

NIKAIDO, T., *et al.* Bond strengths to endodontically-treated teeth. **Am J Dent.** v. 12, n. 4, p. 177-80, 1999.

NUNES, M.R., *et al.* Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an *in vitro* study. **Photomed Laser Surg.** v. 29, n. 12, p. 803-8, 2011.

ODOR, T.M., WATSON, T.F., PITT FORD, T.R., MCDONALD, F. Pattern of transmission of laser light in teeth. **Int Endod J.** v. 29, n. 4, p. 228-234, 1996

OKINO, L.A., SIQUEIRA, E.L., SANTOS, M., BOMBANA, A.C., FIGUEIREDO, J.A. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. **Int Endod J.** v. 37, n. 1, p. 38-41, 2004.

OLIVEIRA, D.P., BARBIZAM, J.V., TROPE, M., TEIXEIRA, F.B. *In vitro* antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 103, n. 5, p. 702-6, 2007.

ORDINOLA-ZAPATA, R., *et al.* Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. **J Endod.** v. 39, n. 1, p. 115-8, 2013.

ORDINOLA-ZAPATA, R., *et al.* Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. **J Endod.** v. 39, n. 1, p. 115-8, 2013.

ORDINOLA-ZAPATA, R., *et al.* Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **Int Endod J.** v. 45, n. 2, p. 162-8, 2012.

ORDINOLA-ZAPATA, R., *et al.* Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. **Int Endod J.** v. 47, n. 7, p. 659-66, 2014.

ORDINOLA-ZAPATA, R., *et al.* The influence of cone-beam computed tomography and periapical radiographic evaluation on the assessment of periapical bone destruction in dog's teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 112, n. 2, p. 272-9, 2011.

PASTER, B.J., *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol.** v. 183, n. 12, p. 3770-83, 2001.

PASTER, B.J., OLSEN, I., AAS, J.A., DEWHIRST, F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontol 2000.** v. 42, p. 80-7, 2006.

PEAK, J.D., HAYES, S.J., BRYANT, S.T., DUMMER, P.M. The outcome of root canal treatment. A retrospective study within the armed forces (Royal Air Force). **Br Dent J.** v. 190, n. 3, p. 140-144, 2001.

PETERS, O.A., SCHONENBERGER, K., LAIB, A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **Int Endod J.** v. 34, n. 3, p. 221-30, 2001.

PREZA, D., OLSEN, I., AAS, J.A., WILLUMSEN, T., GRINDE, B., PASTER, B.J. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. **J Clin Microbiol.** v. 46, n. 6, p. 2015-21, 2008.

REDMOND, R.W., GAMLIN, J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. **Photochem Photobiol.** v. 70, n. 4, p. 391-475, 1999.

RENOVATO, S.R., *et al.* Effect of calcium hydroxide and endodontic irrigants on fibre post bond strength to root canal dentine. **Int Endod J.** v. 46, n. 8, p. 738–46, 2013.

RETAMOZO, B., SHABAHANG, S., JOHNSON, N., APRECIO, R.M., TORABINEJAD, M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. **J Endod.** v. 36, n. 3, p. 520-3, 2010.

RICUCCI, D., LIN, L.M., SPÅNGBERG, L.S. Wound healing of apical tissues after root canal therapy: a long-term clinical, radiographic, and histopathologic observation study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 108, n. 4, p. 609–621, 2009.

RIGGIO, M.P., *et al.* Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. **Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 103, n. 5, p. 610-7, 2007.

RIOS, A., HE, J., GLICKMAN, G.N., SPEARS, R., SCHNEIDERMAN, E.D., HONEYMAN, A.L. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. **J Endod.** v. 37, n. 6, p. 856-9, 2011.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA JR, F. Comparison of the *in vivo* antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. **J Endod.** v. 37, n. 2, p. 143–50, 2011.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA JR, J.F., SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod.** v. 30, n. 5, p. 315–320, 2004.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA JR., J.F. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. **J Clin Microbiol.** v. 46, n. 11, p. 3599-606, 2008.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA, J.F. JR. Comparison of the *in vivo* antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. **J Endod.** v. 37, n. 2, p. 143-50, 2011.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA, J.F. JR., SANTOS. K.R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod.** v. 30, n. 5, p. 315-20, 2004.

ROSENTHAL, S., SPÅNGBERG, L., SAFAVI, K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 98, n. 4, p. 488-92, 2004.

ROSSI-FEDELE, G., PRICHARD, J.W., STEIER, L., DE FIGUEIREDO, J.A. The effect of surface tension reduction on the clinical performance of sodium hypochlorite in endodontics. **Int Endod J.** v. 46, n. 6, p. 492-8, 2013.

SABRAH, A.H., YASSEN, G.H., GREGORY, R.L. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. **J Endod.** v. 39, n. 11, p. 1385-9, 2013.

SAKAMOTO, M., *et al.* Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. **Oral Microbiol Immunol.** v. 21, n. 2, p. 112-22, 2006.

SANTOS, J.N., *et al.* Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. **J Endod.** v. 32, n. 11, p. 1088-90, 2006.

SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **D Clin N Amer.** v.18, n. 2, p. 269-96, 1974.

SCHILKE, R., LISSON, J.A., BAUSS, O., GEURTSSEN, W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Arch Oral Biol.** v. 45, n. 5, p. 355-61, 2000.

SELTZER, S., FARBER, P.A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 78, n. 5, p. 634-45, 1994.

SHEN, Y., QIAN, W., CHUNG, C., OLSEN, I., HAAPASALO, M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria *in vitro*: a three-dimensional quantitative analysis. **J Endod.** v. 35, n. 7, p. 981-5, 2009.

SHEN, Y., STOJICIC, S., HAAPASALO, M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. **J Endod.** v. 36, n. 11, p. 1820-3, 2010.

SHOKRANEH, A., FARHAD, A.R., FARHADI, N., SAATCHI, M., HASHEMINIA, S.M. Antibacterial effect of triantibiotic mixture versus calcium hydroxide in combination with active agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. **Dent Mater J.** 2014. [Epub ahead of print].

SIGNORETTI, F.G., *et al.* Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. **J Endod.** v. 37, n. 12, p. 1696-700, 2011.

SILVA, L.A., NOVAES, A.B. JR, DE OLIVEIRA, R.R., NELSON-FILHO, P., SANTAMARIA, M. JR, SILVA, R.A. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. **J Endod.** v. 38, n. 3, p. 360-6, 2012.

SIQUEIRA JR, J.F., ALVES, F.R., RÔÇAS, I.N. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. **J Endod.** v. 37, n. 11, p. 1499-03, 2011.

SIQUEIRA JR. J.F., RÔÇAS, I.N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod.** v. 34, n. 11, p. 1291-1301, 2008.

SIQUEIRA JR. J.F., UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J Endod.** v. 3, n. 3, p. 167-9, 1997.

SIQUEIRA JR., J.F., RÔÇAS, I.N. As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. **J Oral Microbiol.** v. 23, n. 5, 2013.

SIQUEIRA, J.F. JR., RÔÇAS, I.N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 – Current Molecular Technologies for microbiological diagnosis. **J Endod.** v. 31, n. 6, p. 411-23, 2005.

SLUTZKY-GOLDBERG, I., HANUT, A., MATALON, S., BAEV, V., SLUTZKY, H. The effect of dentin on the pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite and calcium hydroxide. **J Endod.** v. 39, n. 8, p. 980-3, 2013.

SÓ, M.V.R., *et al.* Pulp tissue dissolution when the use of sodium hypochlorite and EDTA alone or associated. **J Dent Cienc.** v. 26, n. 2, p. 156-60, 2011.

SOARES, J.A., *et al.* Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. **J Endod.** v. 36, n. 5, p. 894-8, 2010.

SOUKOS, N.S., GOODSON, J.M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontol 2000.** v. 55, n. 1, p. 143-66, 2011.

SOUZA M., *et al.* Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1249-52, 2012.

SOUZA, L.C., *et al.* Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **J Endod.** v. 36, n. 2, p. 292-296, 2010.

SPÅNGBERG, L., ENGSTRÖM, B., LANGELAND, K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 36, n. 6, p. 856-71, 1973.

SPÅNGBERG, L., ENGSTRÖM, B., LANGELAND, K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 36, n. 6, p. 856-71, 1973.

STANDAR, K., *et al.* Setup of an *in vitro* test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. **PLoS One.** v. 5, n. 10, p. 131-135, 2010.

STOJICIC, S., AMORIM, H., SHEN, Y., HAAPASALO, M. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. **Int Endod J.** v. 46, n. 7, p. 649-59, 2013.

STOJICIC, S., ZIVKOVIC, S., QIAN, W., ZHANG, H., HAAPASALO, M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. **J Endod.** v. 36, n. 9, p. 1558-62, 2010.

STUART, C.H., *et al.* *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod.** v. 32, n. 2, p. 93-8, 2006.

SUAU, A., *et al.* Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. **Appl Environ Microbiol.** v. 65, n. 11, p. 4799-807, 1999.

SUNDE, P.T., OLSEN, I., DEBELIAN, G.J., TRONSTAD, L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **J Endod.** v. 28, n. 4, p. 304-10, 2002.

SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol.** v. 7, n. 5, p. 257-62, 1992.

SUNDQVIST, G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. Odontological Dissertation n^o 7. University of Umea, Sweden 1976.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod.** v. 18, n. 9, p. 427-430, 1992.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 78, n. 4: p. 522-30, 1994.

SUNDQVIST, G., *et al.* Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

SUNDQVIST, G., FIGDOR, D. Life as endodontopathogen. **Endod Topics.** v. 6, p. 3–28, 2003.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **Int Endod J.** v. 31, n. 5, p. 1998.

TANG, G., SAMARANAYAKE, L.P., YIP, H.K. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. **Oral Dis.** v. 10, n. 6, p. 389-97, 2004.

TENDOLKAR, P.M., BAGHDAYAN, A.S., SHANKAR, N. Pathogenic *Enterococci*: new developments in the 21st century. **Cell Mol Life Sci.** v. 60, n. 12, p. 2622–2636, 2003.

TORABINEJAD, M., HANDYSIDES, R., KHADEMI, A.A., BAKLAND, L.K. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 94, n. 6, p. 658-66, 2002.

TRONSTAD, L., BARNETT, F., CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol.** v. 6, n. 2, p. 73-7, 1990.

VERA, J., *et al.* One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. **J Endod.** v. 38, n. 8, p. 1040-52, 2012.

VIANNA, M.E., GOMES, B.P., BERBER, V.B., ZAIA, A.A., FERRAZ, C.C., DE SOUZA-FILHO, F.J. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 97, n. 1, p. 79-84, 2004.

VIANNA, M.E., HORZ, H.P., GOMES, B.P., CONRADS, G. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **Int Endod J.** v. 39, n. 6, p. 484-92, 2006.

VIOLICH, D.R., CHANDLER, N.P. The smear layer in endodontics - a review. **Int Endod J.** v. 43, n. 1, p. 2-15, 2010.

VIRTEJ, A., MACKENZIE, C.R., RAAB, W.H., PFEFFER, K., BARTHEL, C.R. Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. **J Endod.** v. 33, n. 8, p. 926-9, 2007.

VON DER FEHR, F.R., NYGAARD-OSTBY, B. Effect of EDTAC and sulfuric acid on root canal dentine. **Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology.** v. 16, n. 2, p. 199–205, 1963.

WADE, W.G. Non-culturable bacteria in complex commensal populations. **Adv Appl Microbiol.** v. 54, p. 93-106, 2004.

WAGNER, MH. Avaliação através da microscopia eletrônica de varredura e transmissão da dentina bovina após uso de diferentes protocolos de irrigação. Porto Alegre, 2014. 96p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

WALKER, A. A definite and dependable therapy of pulpless teeth. **J Am Dent Assoc.** v. 23, n. 2, p. 1418-1425, 1936.

WANG Z, SHEN Y, HAAPASALO M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. **J Endod.** v. 38, n. 10, p. 1376-9, 2012.

WHITE, J.G., AMOS, W.B., FORDHAM, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. **J Cell Biol.** v. 105, n. 1, p. 41-8, 1987.

WILLIAMS, J.A., PEARSON, G.J., COLLES, M.J. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. **J Dent.** v. 34, n. 6, p. 363–371, 2006.

WITTGOW JR., W.C., SABISTON JR., C.B. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. **J Endod.** v. 1, n. 5, p. 168–71, 1975.

ZAND, V., *et al.* A comparative Scanning electron microscopic investigation of the smear layer after the use of sodium hypochlorite gel and solution forms as root canal irrigants. **J Endod.** v. 36, n. 7, p. 1234-7, 2010.

ZAND, V., *et al.* Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite on monoculture biofilms of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. **Photomed Laser Surg.** v. 32, n. 5, p. 245-51, 2014.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J Endod.** v. 32, n. 5, p. 389–98, 2006.

ZHANG, K., *et al.* The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the erosion of instrumented radicular dentin. **Dent Mater.** v. 26, n. 1, p. 514–23, 2010.

8. FIGURAS

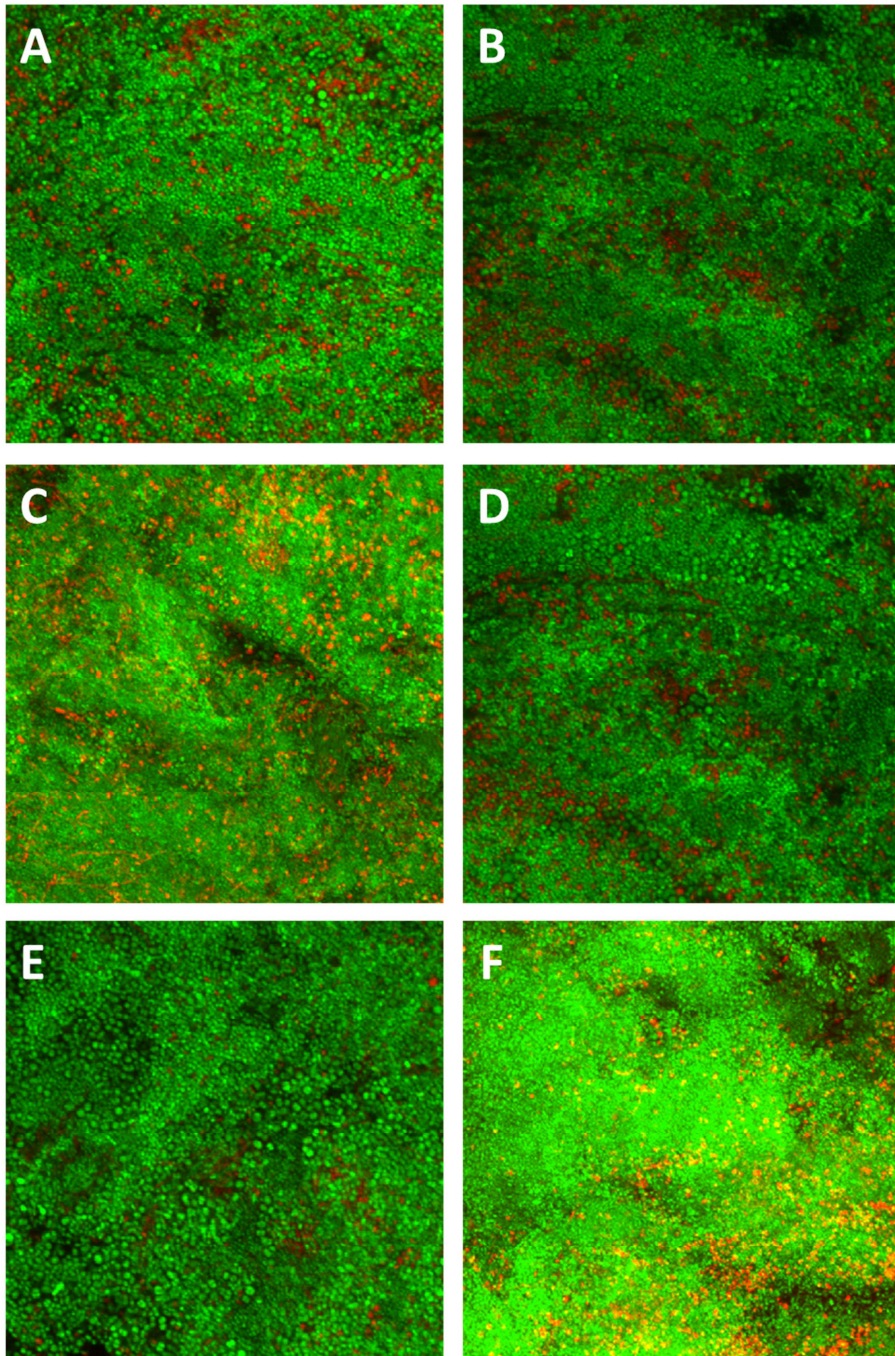


Figura 8.1. - Quadro de imagens de MCL com aumento de 60x referentes ao grupo SORO. Observar predomínio de células viáveis (verde) em todas as imagens.

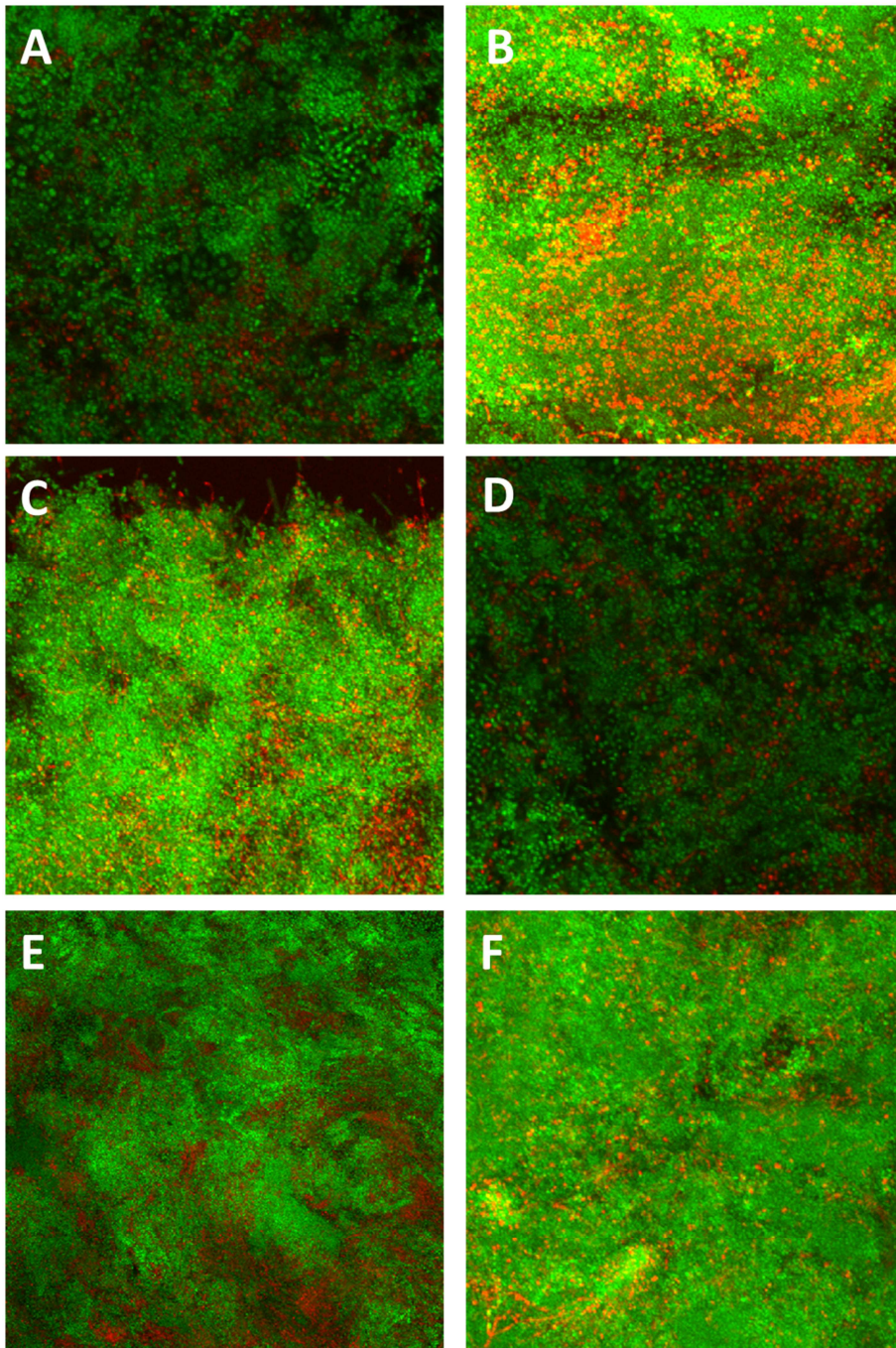


Figura 8.2. - Quadro de imagens de MCL com aumento de 60x referentes ao grupo SORO/PDT. Observar predomínio de células viáveis (verde) em todas as imagens.

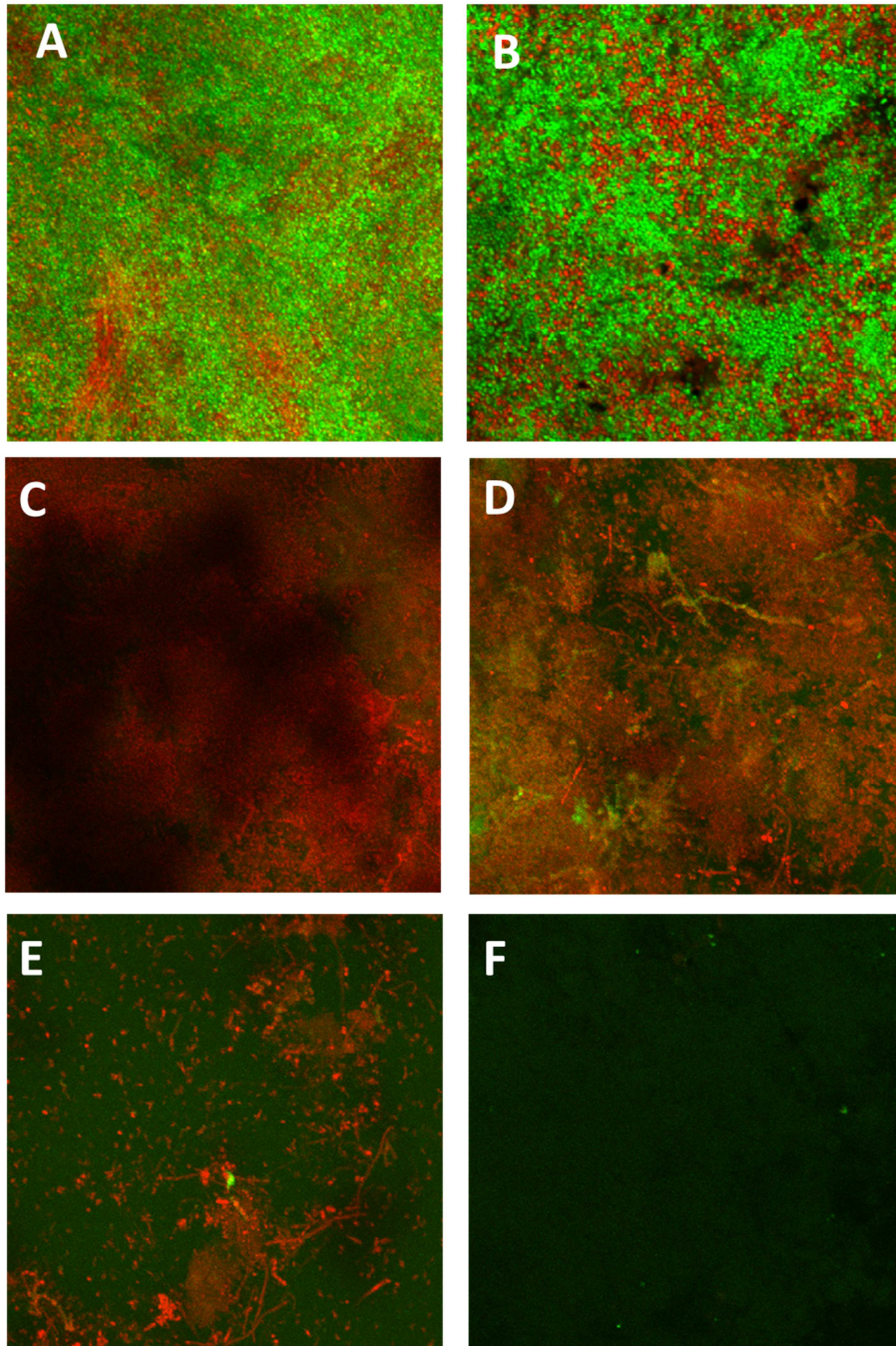


Figura 8.3. - Quadro de imagens de MCL com aumento de 60x referentes ao grupo NaOCl. A e B – Grande quantidade de células bacterianas não-viáveis (vermelho); C e D – Predomínio absoluto de células não-viáveis; E – biofilme parcialmente dissolvido pela ação do NaOCl 2,5% apresentando apenas células bacterianas não-viáveis; F – biofilme completamente dissolvido após 5 minutos de contato com o NaOCl 2,5%.

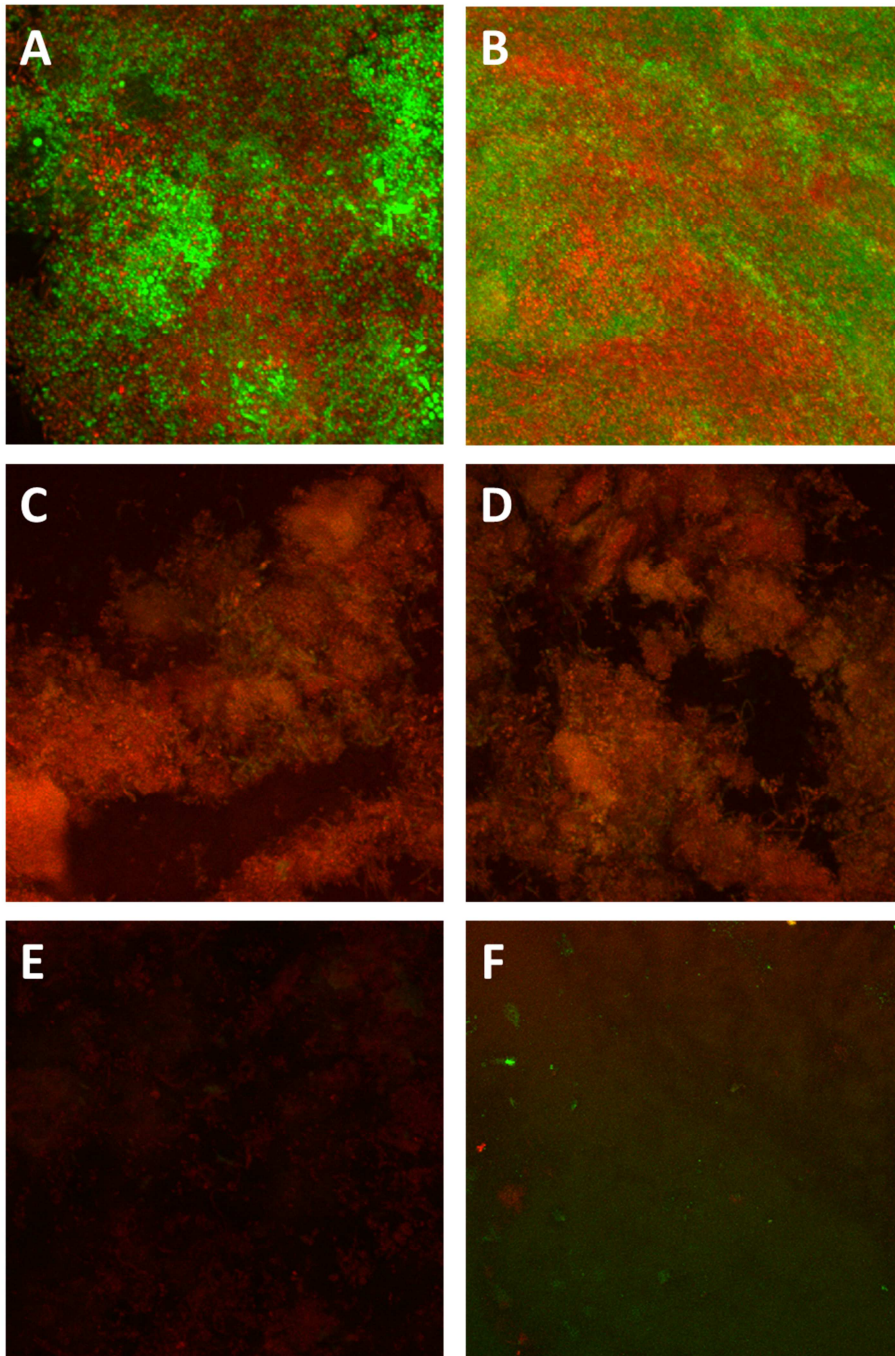


Figura 8.4. - Quadro de imagens de MCL com aumento de 60x referentes ao grupo NaOCl/PDT. A e B – Predomínio de células bacterianas não-viáveis (vermelho); C e D – Presença apenas de células bacterianas não-viáveis e biofilme levemente dissolvido; E – biofilme parcialmente dissolvido pela ação combinada do NaOCl 2,5% e da PDT apresentando apenas células bacterianas não- viáveis; F – biofilme completamente dissolvido após 5 minutos de contato com o NaOCl 2,5% e aplicação da PDT.

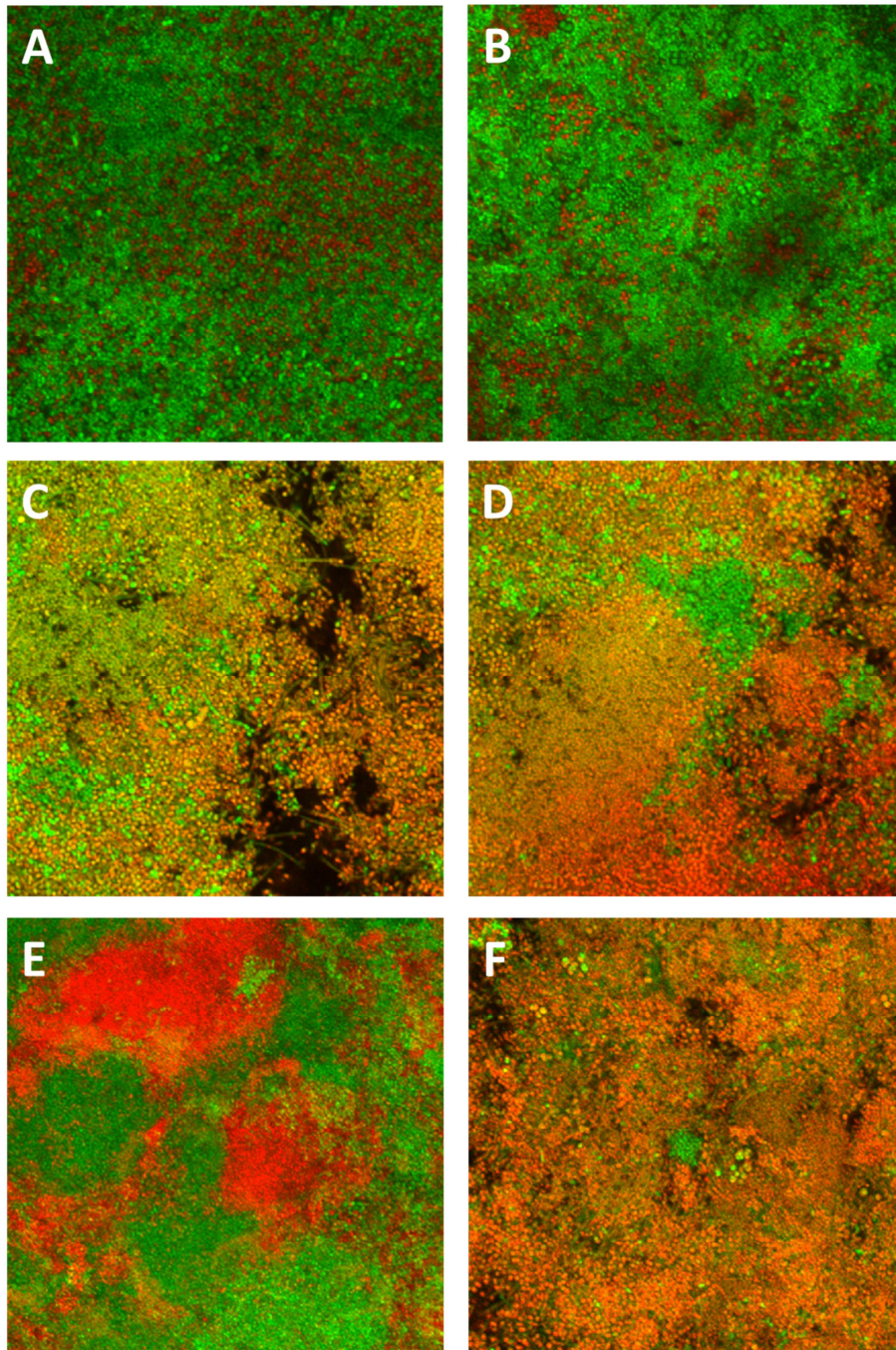


Figura 8.5. - Quadro de imagens de MCL com aumento de 60x referentes ao grupo CHX. A e B – predomínio de células bacterianas viáveis; C, D, E e F – predomínio de células bacterianas não-viáveis (vermelho) após o contato com a solução de CHX 2% por 5 minutos. Observar ausência de dissolução significativa de biofilme por parte da CHX 2%.

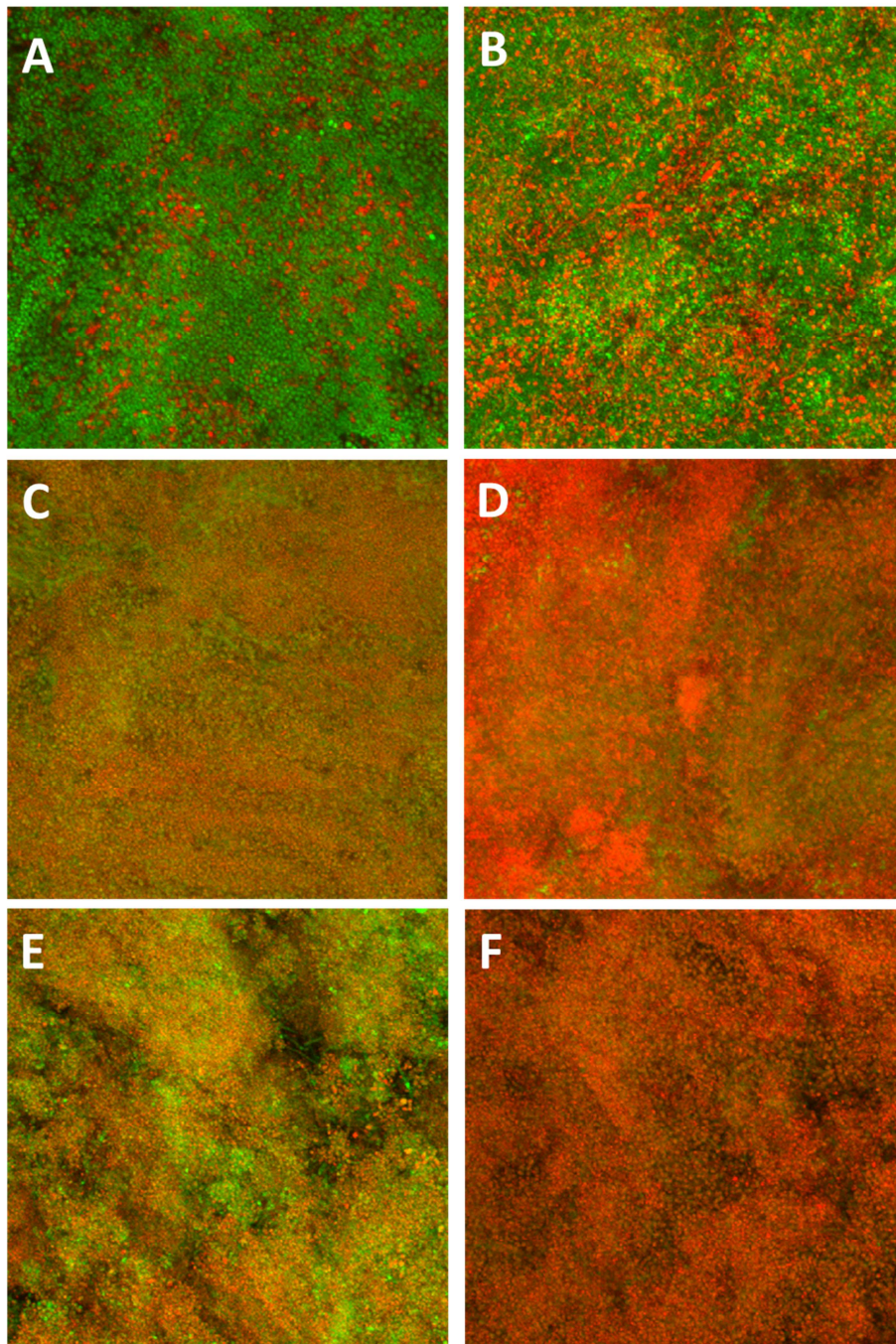


Figura 8.6. - Quadro de imagens de MCL com aumento de 60x referentes ao grupo CHX/PDT. A – predomínio de células bacterianas viáveis (verde); B – quantidades equivalentes de células viáveis e não-viáveis após contato com solução de CHX por 5 minutos seguida da aplicação da PDT; C, D, E e F – predomínio de células bacterianas não-viáveis (vermelho) após o contato com a solução de CHX 2% por 5 minutos. Observar ausência de dissolução significativa de biofilme por parte da CHX 2%. Quadro de imagens de MCL do grupo CHX/PDT

9. ANEXOS

9.1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS



Sistema Pesquisa - Pesquisador: Marcus Vinicius Reis So Realizar

[Fechar](#) [Imprimir](#)

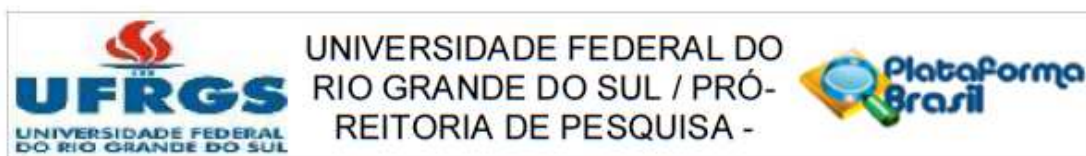
Projeto Nº: 23793

Título: EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A DUAS SOLUÇÕES IRRIGADORAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM ENTEROCOCCUS FAECALIS: ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER, CULTURA MICROBIANA E PCR

COMISSÃO DE PESQUISA DE ODONTOLOGIA: Parecer

Este estudo experimental, in vitro, randomizado e controlado, realizado com mascaramento para os examinadores, terá como objetivo avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica, associada ao hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) e à clorexidina 2% (CHX), na eliminação de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares, através de microscopia confocal a laser, cultura microbiana e PCR em tempo real. Serão selecionadas 44 raízes de dentes humanos portadores de um único canal e, após adequação, as raízes serão esterilizadas em autoclave e inoculadas com *E. faecalis*. Os espécimes referentes aos grupos controle-negativo (n=1) e controle-positivo (n=2) serão submetidos à técnica LIVE/DEAD e analisados através de microscopia confocal a laser para verificar, respectivamente, a técnica de esterilização (MCL1) e a contaminação por *E. faecalis* (MCL2). As demais raízes serão divididas em 6 grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada e o aplicação ou não da terapia fotodinâmica (n=7): Grupo 1 - soro fisiológico 0,9%; Grupo 2 - soro fisiológico 0,9% associado a terapia fotodinâmica; Grupo 3 - hipoclorito de sódio 2,5%; Grupo 4 - hipoclorito de sódio 2,5% associado a terapia fotodinâmica; Grupo 5 - clorexidina 2%; e Grupo 6 - clorexidina 2% associada a terapia fotodinâmica. Previamente ao preparo químico-mecânico será realizada a coleta microbiana para realização da técnica de PCR em tempo real (PCR1) e para cultura microbiana (S1). Os espécimes serão tratados de acordo com o grupo a que pertencem e, feito isso, duas raízes de cada grupo serão preparadas para análise em MCL (MCL3). Nas demais raízes será conduzida nova coleta para PCR em tempo real (PCR2) e para cultura microbiana (S2). Depois disso, as raízes serão armazenadas por 7 dias em BHI e, em seguida, serão realizados novos testes de cultura microbiana (S3), PCR em tempo real (PCR3) e microscopia confocal a laser (MCL3). Os 4 dados serão tabulados e submetidos a análise estatística. O projeto encontra-se bem descrito e possui mérito científico. O parecer é pela aprovação. O projeto deverá ser cadastrado na Plataforma Brasil para análise pelo CEP UFRGS.

9.2. Aprovação do projeto de pesquisa na Plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A DUAS SOLUÇÕES IRRIGADORAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM *Enterococcus faecalis*: ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER, CULTURA MICROBIANA E PCR EM TEMPO REAL

Pesquisador: Marcus Vinicius Reis Só

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 09157313.4.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFRGS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 362.470

Data da Relatoria: 15/08/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de Tese de Doutorado que propõe um estudo *in vitro* para testar diferentes protocolos de desinfecção para utilização durante tratamentos endodônticos, tendo como foco uma bactéria resistente associada a infecções de origem dentária persistentes.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo terá como objetivo avaliar a eficácia da terapia fotodinâmica, associada ao hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) e à clorexidina 2% (CHX), na eliminação de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares, através de microscopia confocal a laser, cultura microbiana e PCR em tempo real. Serão selecionadas 44 raízes de dentes humanos portadores de um único canal e, após adequação, as raízes serão esterilizadas em autoclave e inoculadas com *E. faecalis* e tratadas por diferentes métodos de desinfecção e posteriormente serão armazenadas e após 7 dias, submetidas a nova coleta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A descrição dos riscos está adequada.

Continuação do Parecer: 362.470

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O delineamento da pesquisa está adequado ao objetivo proposto e o estudo tem mérito científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Parecer da COMPESQ, folha de rosto e cálculo do tamanho de amostra foram adequadamente apresentados.

A título de orientação, informamos que o TCLE deve ser lido para o paciente e não entregue para ele mesmo faça a leitura.

Recomendações:

Como a pendência com relação ao termo de doação de dentes foi resolvida, o parecer é pela aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhe-se.

PORTO ALEGRE, 16 de Agosto de 2013

Assinador por:
José Artur Bogo Chies
(Coordenador)

9.3. Termo de consentimento livre e esclarecido

Prezado Sr.(a),

Como é de seu conhecimento, existe a indicação terapêutica para a extração do (s) dente(s) _____, com o propósito de melhorar sua saúde, conforme registro no prontuário. Estamos realizando uma pesquisa com dentes extraídos intitulada: “Eficácia da terapia fotodinâmica associada a duas soluções irrigadoras em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*: análise por microscopia confocal a laser, cultura microbiana e PCR em tempo real”. Tal pesquisa tem por objetivo investigar a eficácia de duas soluções irrigadoras utilizadas para desinfetar os canais radiculares, bem como a desinfecção utilizando laser de baixa potência. Com este trabalho espera-se auxiliar os cirurgiões-dentistas a definir, dentre os protocolos testados, qual o melhor protocolo no combate a infecções endodônticas.

Pelo presente instrumento que atende as exigências legais, o(a) Sr.(a) _____, portador da célula de identidade nº _____ e residente na Rua/Avenida _____

telefone () _____, ciente dos procedimentos à que será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em doar o(s) referido(s) dentes à pesquisa informada. Bem como o armazenamento do(s) mesmo(s) para possível utilização em pesquisa futura. Informamos que este(s) será (ão) utilizado(s) exclusivamente na pesquisa laboratorial a ser conduzida na Faculdade de Odontologia da UFRGS somente após certificação do Comitê de Ética responsável. Caso sejam empregados em pesquisa futura, esta será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo e/ou sobre o órgão doado, poderá solicitar informações ao Prof. Marcus Vinícius Reis Só (pesquisador responsável) no telefone (51) 33085357 ou para o Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFRGS no telefone (51) 3308-3738.

Finalmente, ressaltamos que caso o(a) Sr.(a) não concorde em doar o(s) dente(s) para a pesquisa, não haverá qualquer interferência em seu atendimento odontológico.

Declaro ter lido - ou me foi lido - as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte, voluntariamente, da doação do meu órgão (dente) para o presente estudo.

_____, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do doador ou responsável

Assinatura da testemunha

Assinatura e número do CRO do CD responsável pelo atendimento

ATENÇÃO:

- A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, Sr(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa UFRGS, localizado a Av. Paulo Gama, 110 - 7º andar - Porto Alegre/RS - CEP: 90040-060 - Fone: (51) 3308.4085. E-mail: pro-reitoria@propesq.ufrgs.br.

- Esse termo de consentimento será impresso em duas cópias, sendo uma de propriedade do participante da pesquisa e a outra de propriedade dos pesquisadores.

9.4. Declaração de doação dos dentes bovinos



Santa Maria, 15 de Maio de 2012

Declaração

Declaramos para os devidos fins que o Frigorífico Silva e Comércio LTDA cedeu 44 dentes bovinos para a pesquisa intitulada "EFICÁCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A DUAS SOLUÇÕES IRRIGADORAS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM *Enterococcus faecalis*: ANÁLISE POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER, CULTURA MICROBIANA E PCR EM TEMPO REAL" conduzida pelo pesquisador Ricardo Abreu da Rosa. Os animais foram abatidos por motivos não relacionados ao estudo.

Ariano Stehli Franzen
Supervisor de Garantia de Qualidade
Frigorífico Silva Ind. e Com. Ltda.

FRIGORÍFICO SILVA INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA.
Indústria, comércio, importação e exportação de carne e seus derivados • Matadouro Frigorífico.
BR 392, Km 8 - Passo das Tropas, Cx Postal 473, CEP 97001-970, Santa Maria/RS.
Fone: 55 3026.2525 / Fax: 55 3026.0404. E-mail: frigorificosilva@frigorificosilva.com.br
CNPJ 88.728.027/0001-46.

www.frigorificosilva.com.br