



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

AMJAD ABU HASNA

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA E DA TERAPIA
FOTODINÂMICA SOBRE *Enterococcus faecalis* EM CANAIS
RADICULARES**

2017

AMJAD ABU HASNA

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA E DA TERAPIA FOTODINÂMICA
SOBRE *Enterococcus faecalis* EM CANAIS RADICULARES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Área de Endodontia.

Orientador: Prof.Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo
Coorientadora: Profa.Tit. Marcia Carneiro Valera Garakis

São José dos Campos
2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Abu Hasna, Amjad
EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA E DA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE *Enterococcus faecalis* EM CANAIS RADICULARES / Amjad Abu Hasna. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2017.
Orientador: Carlos Henrique Ribeiro Camargo
Coorientadora: Marcia Carneiro Valera

1. N-acetilcisteína . 2. Terapia fotodinâmica. 3. *Enterococcus faecalis*. 4. MEV. 5. CLSM. I. Camargo, Carlos Henrique Ribeiro, orient. II. Valera, Marcia Carneiro, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (coorientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Universidade São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia

Campus de Bauru

São José dos Campos, 15 de dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Intesar e Naefz, pelo apoio ilimitado, pela força, pelo carinho. Por ser pais perfeitos. Agradeço de todo meu coração.

Aos meus irmãos, Ahmed, Majed e Aboud, os melhores irmãos e amigos, agradeço por tudo.

À minha querida amiga Tati, pela ajuda desde o primeiro momento, por todo apoio, sem você será muito difícil chegar nesse ponto. Agradeço você por tudo, e agradeço por estar ao meu lado sempre.

Às minhas queridas amigas Rayana, e Cassia, por toda ajuda no laboratório, pelos momentos bons que passamos juntos, e por toda força me deram desde o primeiro dia. Agradeço. Também agradeço o amigo Felipe Matos, pela ajuda, força e apoio.

Ao meu irmão-amigo Esteban, por ser um amigo verdadeiro, e um irmão de outra mãe, e por ser uma pessoa de confiança.

Ao meu novo amigo Ricardo, pela amizade verdadeira, e pelos momentos agradáveis, aos colegas na pós-graduação Alessandra, Bruna, Cristian, Diego, Felipe Paiva, Laís, Monique e Thaís.

Ao pessoal da turma do ano passado, Carlos Henrique, Daiana, Fernanda e Claudia.

Às amigas Marina, Debora, e Ingrid pela amizade, carinho, e companhia nesses anos.

Aos meus amigos da graduação Haya, e Moualla.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa da coordenador Prof. Adj. **Alexandre Luiz Souto Borges**. Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora. Agradeço pela oportunidade de ser um discente do programa.

À Prof. adj. **Carlos Henrique Ribeiro Camargo**, pela amizade, apoio e pela orientação.

À Profa. Tit. **Marcia Carneiro Valera**, para ser um exemplo, por todo apoio, e toda ajuda. Pela paciência da senhora comigo agradeço do meu coração.

Aos professores da disciplina da endodontia Profa. Adj. **Ana Paula Martins Gomes**, Prof. Adj. **Cláudio Antonio Talge Carvalho** pela ajuda e apoio.

Agradeço as amigas Tatiane, Cassia, e Rayana, por estarem ao meu lado passo a passo nesse projeto. Sem vocês será missão impossível.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Faculdade de Odontologia em Bauru- USP, Profa. **Flaviana Bombarda de Andrade** pela oportunidade de usar os aparelhos da faculdade, e à colega Gláucia Gonçalves pela ajuda.

**“Nada é impossível para aquele que
tentar”**

Alexander o Grande

**“Nothing is impossible to him who
will try”**

Alexandre The Great

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO	09
2 ARTIGO Abu-Hasna A, Toia CC, Khoury RD, Gonçalves G, De Andrade FB, Camargo CHR, Valera MC. A ação antimicrobiana da N-acetilcisteína e terapia fotodinâmica sobre <i>E. faecalis</i> / The antimicrobial action of n-acetylcysteine and photodynamic therapy over <i>E. faecalis</i>	14
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	37
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE	49
ANEXO	60

Abu Hasna A. Efeitos da N-acetilcisteína e da terapia fotodinâmica sobre *Enterococcus faecalis* em canais radiculares [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a capacidade antimicrobiana da N-Acetilcisteína (NAC) e da terapia fotodinâmica (PDT) utilizando LASER diodo (LD) de baixa intensidade, sobre o *Enterococcus faecalis*, comparados ao uso do hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] como medicação intracanal. Oitenta dentes humanos extraídos tiveram o diâmetro dos canais radiculares padronizados por meio do preparo com lima K#30. As raízes foram contaminadas com *E. faecalis* por 21 dias e divididas em cinco grupos de acordo com a medicação intracanal e/ou tratamento antimicrobiano a ser utilizada: 1) PDT+NAC; 2) NAC; 3) PDT; 4) Ca(OH)₂ e 5) Solução salina. Sendo que 50 dentes foram avaliados por cultura microbiológica (UFC/mL), 10 por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e 20 por microscopia confocal de varredura a LASER (CLSM). Para UFC/mL foram feitas 3 coletas do conteúdo do canal radicular: a) após 21 dias de contaminação (coleta de confirmação - Sc); b) após PBM (S1); c) após 14 dias com as medicações intracanaís (S2). UFC/mL não mostrou diferença estatística entre os grupos de PDT+NAC, NAC e Ca(OH)₂, porém foram significativamente diferentes dos grupos da PDT, e solução salina. A análise ilustrativa por MEV mostrou resultados semelhantes à análise microbiológica (UFC/mL). No CLSM, todos os grupos avaliados foram efetivos contra *E. faecalis*, com a diferenciando significativamente do grupo controle. Concluímos que NAC pode eliminar *E. faecalis* com ou sem PDT, sendo considerado como medicação complementar para aplicação clínica.

Palavras-chave: N-acetilcisteína (NAC). Terapia fotodinâmica. *Enterococcus faecalis*. MEV. CLSM.

Abu Hasna A. *Effects of N-acetylcysteine e photodynamic therapy on Enterococcus faecalis in root canals [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.*

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate in vitro the antimicrobial capacity of N-Acetylcysteine (NAC) e PDT photodynamic therapy using low intensity LASER diode (LD) on Enterococcus faecalis, compared to the use of calcium hydroxide Ca(OH)₂, as intracanal medication. Eighty extracted human teeth had their root canal diameters steardized by preparation with K 30 file. The roots were contaminated with E. faecalis for 21 days and divided into five groups according to the intracanal medication and/or antimicrobial treatment to be used. 1) PDT + NAC; 2) NAC; 3) PDT; 4) Ca(OH)₂; 5) Saline solution. Fifty teeth were evaluated by microbiological culture (CFU/mL), 10 by scanning electron microscopy (SEM), and 20 by confocal LASER scanning microscopy (CLSM). The root canal was collected 3 times a) after 21 days of contamination (confirmation collection) (Sc); b) after biomechanical preparation S1; c) after 14 days with intracanal medications. CFU/mL showed no statistical difference between the PDT+NAC, NAC e Ca(OH)₂ groups, but were significantly different from the PDT groups, and saline. The illustrative SEM analysis showed similar results to the analysis (CFU / mL). In CLSM, all evaluated groups were effective against E. faecalis, with a significant difference with the control group. We conclude that NAC can eliminate E. faecalis with or without PDT, being considered as a complementary medication in clinical practice.

Keywords: N-acetylcysteine (NAC). Photodynamic therapy. Enterococcus faecalis. SEM. CLSM.

1 INTRODUÇÃO

O maior desafio enfrentado durante a terapia endodôntica é a completa desinfecção do sistema de canais radiculares (SCR) (Babaji et al., 2016). Muitos estudos relatam a eliminação completa dos micro-organismos como algo inatingível (Gomes et al., 2004; Sjogren et al., 1990), devido a presença de micro-organismos que permanecem no interior dos túbulos dentinários e em todo o SCR (Nair et al., 2005), devido a sua complexa anatomia do SCR, que dificulta a limpeza e a permanência destes micro-organismos.

Assim que as bactérias alcançam o SCR, elas se organizam em comunidades conhecidas como biofilmes (Høiby et al., 2011), constituídos principalmente por organismos anaeróbios estritos e alguns anaeróbios facultativos como *E. faecalis*, sendo que estes estão frequentemente envolvidos em infecções persistentes (Wang et al., 2012).

E. faecalis é uma bactéria anaeróbia facultativa, Gram-Positiva, responsável por 80-90% das infecções causadas por Enterococos. Este microrganismo desempenha um papel essencial nos casos de infecções endodônticas persistentes. Uma vez que invadem profundamente os túbulos dentinários, sobrevivem mesmo com falta de nutrientes, além de suportar pH extremo devido a presença da bomba de prótons na sua membrana citoplasmática (Dammachke et al., 2013; Kakinuma, 1987), resistindo assim à medicação intracanal (Bazvand et al., 2014). Ademais, *E. faecalis* é o microrganismo mais presente em infecções secundárias e persistentes do SCR, com frequência de 32% a 77% (Peciulienė et al., 2001; Rôças et al., 2004).

A dificuldade de eliminação total desta bactéria e a sua sobrevivência se devem a sua capacidade de adaptação a ambientes adversos, como os existentes em dentes tratados endodonticamente (Hancock et al., 2001; Distel et al., 2002).

Além disto, *E. faecalis* se organiza em biofilme, principalmente devido à sua capacidade de aderência, resistência aos medicamentos e características físicas importantes de bactérias formadoras de biofilmes (Love, 2001; Podbielski et al., 2003).

Os biofilmes são comunidades complexas de micro-organismos, incorporados numa matriz de polissacáridos e proteínas formando uma camada viscosa (Quah et al., 2012). As bactérias organizadas em biofilme estabelecem um *habitat* para crescimento, com diversidade metabólica, e proteção contra micro-organismos e agentes antimicrobianos, aumentando assim sua patogenicidade (Fletcher, 1991). Estudos mostram que bactérias organizadas em biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos como clorexidina (CLX) e hipoclorito de sódio (NaOCl) (Clegg et al., 2006). Dada a prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas persistentes, e sua organização em biofilmes é importante agir contra esta bactéria para aumentar as taxas de sucesso do retratamento endodôntico (Sedgley et al., 2006; Siqueira, Rôças, 2004; Molander et al., 1998).

O sucesso do tratamento endodôntico (TE) depende fundamentalmente da limpeza e modelagem do canal radicular para a eliminação da microbiota presente em canais infectados, uma vez que o tecido necrótico e infectado é removido (Law, Messer, 2004; Peters et al., 2002; Gomes et al., 2001; Siqueira et al., 2000). A eliminação dos micro-organismos e seus subprodutos do SCR é um dos principais objetivos e, ao mesmo tempo, o maior desafio da TE (Bystrom et al., 1985).

Apesar dos progressos significativos alcançados com a instrumentação rotatória, a eficácia do preparo biomecânico (PBM) é ainda limitada, pela anatomia complexa e variável do canal radicular, o que resulta em regiões sem acesso ao preparo, que favorecem a retenção de bactérias e detritos (Gomes et al., 2004).

Embora o PBM utilizando NaOCl em diferentes concentrações seja capaz de eliminar micro-organismos da luz do canal, os mesmos permaneciam no interior dos túbulos dentinários, sendo assim é importante a utilização da medicação intracanal para complementar a atividade antimicrobiana do preparo utilizando como solução irrigadora o NaOCl. Dentre as medicações intracanaís mais utilizado devido seus efeitos, especialmente sua ação antimicrobiana relacionada à liberação de íons hidroxila em ambiente aquoso (Siqueira et al., 2000).

No entanto, a ação antibacteriana do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pode ser alterada ou inativada em contato com a dentina e/ou exsudatos periapicais (Wu et al., 2014; Stuart et al., 2006). Além disso *E. faecalis* foi resistente ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$, a um pH de 11,1 (Evans et al., 2002). Sendo assim, é importante a pesquisa sobre antimicrobianos que possam ter maior atividade no interior dos canais radiculares

A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante potente, e um agente mucolítico amplamente utilizado no tratamento médico de bronquite crônica e sobredose de acetaminofeno (Stey et al., 2000). O seu principal mecanismo de ação antimicrobiana consiste na diminuição da formação de biofilme (Marchese, 2003; Pérez-Giraldo et al., 1997; Schwandt et al., 2004), redução da produção da matriz de polissacarídeo extracelular, interrompendo biofilmes maduros e reduzindo a aderência de bactérias nas superfícies (Marchese, 2003; Olofsson et al., 2003). No entanto, a atividade antimicrobiana contra biofilmes parece depender do tipo da bactéria (del Prado et al., 2010; Marchese, 2003; Pérez-Giraldo et al., 1997). A NAC é muito eficaz contra certos bacilos Gram-negativos, e alguns cocos Gram-positivos (Aslam, Darouiche, 2011), como *E. faecalis* (Ulusoy et al., 2016).

Segundo Quah et al. (2012), a NAC tem ação bactericida matando completamente *E. faecalis* tanto na forma de biofilme quanto na forma

planctónica, sendo uma promissora substância para uso como medicação intracanal, especialmente em infecções secundárias com predominância de *E. faecalis*.

O termo fotodinâmico corresponde ao estudo dos efeitos da ativação da luz sobre tecidos vivos. Empregando-se o mesmo princípio, a PDT pode ser descrita como um tratamento que utiliza fontes de luz para estimular um agente de foto-sensibilização, em presença de oxigênio. A PDT, ou desinfecção foto-ativada, usa a luz com comprimento de onda específico para estimular um corante não tóxico fotoativo, chamado de foto-sensibilizador (Lee et al., 2004).

Com o rápido desenvolvimento da PDT, novos LASERS , com uma vasta variedade de características, estão disponíveis e são utilizados em diversas áreas da Odontologia, incluindo a Endodontia (Siddiqui et al., 2013). Sendo que o LASER de alta potência atua nos tecidos de acordo com a produção de calor e, dependendo da dose de irradiação selecionada, caso os parâmetros não sejam devidamente estudados, experimentados e selecionados, pode causar danos, tais como liquefação de cimento, reabsorção radicular e necrose periapical (Fransson et al., 2013).

Já, o LASER de baixa potência pode ser utilizado em PDT, uma vez que produz um feixe monocromático com um comprimento de onda específico. LASERS de diodo com comprimentos de onda que variam entre 625 e 805 nm foram efetivos na utilização em PDT para eliminar *E. faecalis* de canais radiculares (Siddiqui et al., 2013).

A ação antibacteriana ocorre pois o PDT atua no corante fotosensibilizador, que reage com o oxigênio molecular seguido de eventos oxidativos causando danos às moléculas bacterianas essenciais como proteínas, lipídios da membrana, ácidos nucleicos, levando o morte da bactéria (Souza et al., 2010; Konopka, Goslinski, 2007).

Vários estudos recentes mostram que o LASER diodo usado em PDT, com comprimento da onda de 660 nm (Hoedke et al., 2017) e com comprimento de onda de 600-660 nm (Trindade et al., 2017), são efetivos na desinfecção de canais radiculares (Schulte-Lünzum et al., 2017), com efeito bactericida satisfatório, sem qualquer efeito secundário térmico aos tecidos de suporte dos dentes.

O LASER de diodo é útil para procedimentos de tratamentos em tecidos orais, por poder ser utilizado por contato ou a uma distância bem próxima ao local de aplicação, evitando danos, o que o torna muito mais seguro do que outras fontes de LASER (Genovese et al., 2010; Desiate et al., 2009; Saetti et al., 2008). Além disso, a energia de luz, a partir do diodo, é altamente absorvida pelos tecidos moles e fracamente absorvida pelos dentes e ossos (Aras et al., 2010).

Diante dos desafios que encontramos na prática endodôntica, torna-se necessária a busca por técnicas e medicamentos de atuação direta e local, que provoquem a inativação dos micro-organismos, preferencialmente proporcionando mínimos efeitos citotóxicos, que possam inibir e/ou prejudicar a reparação dos tecidos periapicais. Sendo assim mesmo importante avaliar a NAC e a PDT como antimicrobianos sobre *E. faecalis*.

Acredita-se que a NAC associada a PDT, promoverá atividade antimicrobiana intracanal contra *E. faecalis*, podendo ser um promissor componente para ser utilizado como medicação intracanal, aumentando assim o índice de sucesso da terapia endodôntica.

2 ARTIGO - Abu-Hasna A, Khoury RD, Toia CC, Gonçalves GB, De Andrade FB, Camargo CHR, Valera MC. A ação antimicrobiana da N-acetilcisteína e terapia fotodinâmica sobre *E. faecalis* no sistema dos canais radiculares / The antimicrobial activity of N-acetylcysteine and photodynamic therapy on *E. faecalis* in root canal system *

RESUMO

INTRODUÇÃO: O hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] tenha sido usado como medicamento endodôntico comum para eliminar o possível microorganismo persistente, ainda não é capaz de eliminar *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) nos túbulos dentinários. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antimicrobiana de N-acetilcisteína (NAC) e terapia fotodinâmica (PDT) sobre *E. faecalis* em canais radiculares. **MÉTODOS:** Oitenta dentes humanos foram utilizados para cinco grupos de tratamento, PDT+NAC, NAC, PDT, Ca(OH)₂ e soro fisiológico (grupo controle) sendo 50 dentes foram utilizados para avaliar sua ação antimicrobiana nos biofilmes de *E. faecalis* por análise de unidade formadora de colônias (UFC/mL) (n=10 para o grupo) e Trinta dentes foram utilizados para avaliação por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). O teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's foram usados para analisar os dados obtidos estatisticamente. **RESULTADOS:** análise UFC/mL mostrou que PDT+NAC, NAC e Ca(OH)₂ foram bactericidas e eliminaram o *E. faecalis*. A PDT sozinho mostrou baixa ação antimicrobiana, estatisticamente igual salina. No CLSM, todos os grupos foram efetivos sobre a *E. faecalis*, exceto o grupo controle. **CONCLUSÕES:** NAC foi bactericida contra biofilmes de *E. faecalis*, com/sem estimulação da PDT.

Palavras-chaves: N-acetilcisteína. terapia fotodinâmica. *E. faecalis*. SEM. CLSM.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Calcium hydroxide [Ca(OH)₂] is the most widely used intracanal medication aiming to eliminate persistent microorganisms. However, previous studies have shown the resistance of *E. faecalis* against Ca(OH)₂. The

aim of this study was to evaluate the antimicrobial action of N-acetylcysteine (NAC) and Photodynamic therapy (PDT) on *E. faecalis* in root canal system. **METHODS:** Eighty human teeth were used for five treatment groups, PDT+NAC, NAC, PDT, Ca(OH)₂, and saline (control group), fifty teeth of them were used to evaluate the antimicrobial action of the treatment groups over *E. faecalis* biofilms by microbiological culture analysis (n=10 for group) and thirty teeth were used for evaluation by means of scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's were used to analyze the obtained data statistically. **RESULTS:** CFU/mL analysis showed that PDT+NAC, NAC and Ca(OH)₂ were bactericidal and they eliminated the *E. faecalis*. PDT showed low antimicrobial action, statistically saline-like. In CLSM, all the groups were effective over *E. faecalis* except for the control group. **CONCLUSIONS:** NAC was bactericidal against *E. faecalis* biofilms, with/without PDT stimulation.

Keywords: N-acetylcysteine. Photodynamic therapy. *E. faecalis*. SEM. CLSM.

THE ANTIMICROBIAL ACTION OF N-ACETYLCYSTEINE AND PHOTODYNAMIC THERAPY OVER *E. faecalis* IN ROOT CANAL SYSTEM

INTRODUCTION

Microorganisms are responsible for pulp and peri-radicular infections [1]. The complete disinfection of a root canal is the major challenge during the root canal treatment (RCT) [2]. Therefore, canal disinfection associated with apical and coronal sealing should be the aim of new studies to achieve RCT success [3]. However, many studies relate total elimination of microorganisms as unachievable [4,5] due to their presence inside of dentinal tubules [6]; canal anatomy complexity [7] which limits the action of irrigating solutions (IS) and intracanal medication (IM) [8,9].

*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *International journal of Antimicrobial Agents*
Submetido em: 06/12/2017.

E. faecalis is a facultative anaerobic Gram-positive bacteria that provides an essential role in persistent endodontic infection, as it is the most found microorganism in secondary root canal infection, with 32%-66% frequency [10]. Its capacity to form biofilms and its resistance towards a wide spectrum of IM, once it can survive in the alkaline pH [11], turns the elimination of this microorganism one of the biggest challenge in the treatment of endodontic infections [12]. Until now, neither IS nor IM are capable to completely eliminating the *E. faecalis* inside of canal [13].

Calcium hydroxide [Ca(OH)₂] is described as an effective IM over wide spectrum of microorganisms. Furthermore, Ca(OH)₂ when added to other IM can increase the antimicrobial efficacy of them [14].

N-acetylcysteine (NAC) is a derivative of amino acid l-cysteine, which acts as an antioxidant and antimicrobial medication [15]. Its principal antimicrobial mechanism consists of preventing biofilm formation [16,17] by reducing extracellular polysaccharide matrix production, disrupting mature biofilms, and reducing bacterial adherence to surfaces [16,18]. Furthermore, NAC is very effective over Gram-negative bacillus and some types of Gram-positive cocci [19], like *E. faecalis* [20]. NAC is not an antibiotic, but has antimicrobial properties and the ability to reduce biofilm formation, because of the possible suppression of extracellular matrix synthesis [21,22]. Thus, it has been recommended as an alternative therapeutic agent of Ca(OH)₂ [12].

In addition, photodynamic therapy (PDT) using low-energy light with photosensitizer also became as new effective technique in RCT to eliminate microorganisms without causing tissue damage [23]. The potential bacteriostatic effect of PDT can be used to obtain additional canal cleaning after the biomechanical preparation (BMP). Its effect was widely studied over *E. faecalis* [23–25] as a promising technique, which can increase the RCT success [23].

In front of all the challenges faced in endodontic practice, it becomes necessary to look out for new techniques and medications, that inactivates microorganisms with minimal cytotoxic effects. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial actions of NAC and PDT over *E. faecalis* biofilms.

MATERIALS AND METHODS

The present study was performed under approval of the human Ethics Committee of São Paulo State University, São José dos Campos, Brazil. Eighty freshly extracted single rooted human teeth were selected and stored in deionized water until the moment of use, where fifty teeth were prepared for microbiological culture analysis and thirty were prepared for scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis.

Microbiological culture analysis

Preparation of specimens.

Fifty extracted single rooted human teeth were selected based on dimensional and morphological similarities. The crowns were cross-cut with a carborundum disc and the specimens length was standardized to 16 ± 0.5 mm. To standardize the specimens' diameter, they were instrumented to K-file #30 (Dentsply Ind. Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brazil) and irrigated with 3 mL of NaOCl 1% through each instrument change. Then, the canals were filled with trisodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 17% (Inodon, Porto Alegre, RS, Brazil) for 3 minutes followed by a 10 mL final irrigation with saline solution. The apical regions of teeth were sealed with light-cured composite resin (Z-100. 3M, Sumaré, SP, Brazil) and the outer surfaces of the roots were

sealed with an epoxy adhesive layer, except for the cervical opening region. The specimens were randomly distributed into 5 different 24-wells cell culture plates with ten specimens in each one, and were fixed with chemically activated acrylic resin. All materials used in the present study were sterilized by gamma radiation with cobalt 60 (20 KGy for 6 hours) [26].

Contamination of specimens.

Initially, *E.faecalis* (ATCC 29212) suspension was prepared containing 10^6 cells/mL confirmed by a spectrophotometer reading (AJX-1900, Micronal). Then, 5 μ L of *E.faecalis* suspension was inoculated into each root canal followed by 10 μ L of brain heart infusion (BHI) broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltda., Mumbai, India). Then, a sterile cotton pellet was soaked in the culture medium and placed in the cervical opening of each specimen. All specimens were stored in an incubator at 37 ± 1 °C in in relative humidity. BHI broth was added to root canals every two-days totalizing 21 days.

Sample collection.

For microbiological culture, sterile paper points (size #25; Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) were introduced into the full length of the canal, and retained in position for 60 seconds. In order to confirm the specimens contamination, immediately before instrumentation, an initial sample of confirmation (SC) was collected from the root canal to serve as the baseline.

Immediately after, the paper point was transferred to sterile Eppendorf tubes containing 1000 μL of sterile saline solution [14]. The root canals were instrumented with RECIPROC system file R40 (VDW - Germany), adapted to an electric motor (VDW) in reciprocation movement. Instrumentation was performed along the total length of the canals associated to irrigation of 5 mL of sterile saline solution for each third, totaling 15mL. After instrumentation, a new sample collection (**S1**) was performed in the same standard way as previously described. Then, the specimens were divided in five groups according to the IM protocol: 1) PDT+NAC paste; 2) NAC paste; 3) PDT; 4) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ paste and 5) Saline solution.

PDT+NAC. First, PDT was performed using 0.005% methylene blue as a photosensitizer and a diode LASER (DL) (660 nm wavelength) with a power of 40 mW (MMOptics Ltda, São Carlos, Brazil). The photosensitizer was placed into the canals for 5 minutes. The optical tip of the DL (0.40 mm diameter and 16 ± 0.5 mm active surface length) was placed into the canal and the DL was activated for 2 minutes without interval, using a helical movement from apical to cervical. A density of approximately $120.0 \text{ J}/\text{Cm}/\text{Cm}^2$ was applied into each canal. Subsequently, the photosensitizer rinsed out using 5 mL of saline and the canals were dried with sterile #40 paper points [27]. After PDT protocol, NAC powder (SIGMA-ALDRICH Co, USA), was manipulated with sterile saline solution (1:1 proportion, 1g of powder and 1mL of saline), over a sterile glass plate by a spatula obtaining toothpaste consistency. Then, the paste was inserted in the canal by K-file #30

NAC. NAC paste was obtained in the same standard way as previously described.

PDT. PDT protocol was applied in the same standard way as previously

described.

Ca(OH)₂ group, the powder of Ca(OH)₂ (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Paraná, Brazil) was manipulated with saline as same as previously described in NAC group.

Saline Solution. To serve as control group, the specimens were filled with 100µL of saline.

All specimens were stored at 37°C for 14 days. The medications were then removed with 10 mL of saline, and a new sample was collected with paper point #45 (S2).

Culture Procedure.

To determine the antimicrobial activity, serial dilutions were made, and 100 µL aliquots were seeded into duplicate petri dishes containing BHI agar. Then, they were incubated at 37°C for 48 h for later counting of colony-forming units/mL (CFU/mL).

SEM and CLSM

Specimens preparation and contamination.

Thirty extracted single rooted human teeth were selected. The crown and the apical 4±0.5 mm of the root were cross-cut. A root segment with a length of 12±0.5 mm was standardized from this apical section in a cutting machine. Next, the BMP method described previously with the microbiological culture analysis was applied again. *E. faecalis* suspension was prepared again as explained with microbiological culture analysis protocol. The specimens were

individually inserted into microtubes with 1 mL of sterilized BHI broth and transferred to an ultrasonic bath for 15 min to allow the culture medium to penetrate into the dentinal tubules [28]. The BHI broth was contaminated with *E. faecalis* suspension, and 1 mL of the contaminated BHI broth was added into the microtubes by a pipette and the centrifugation protocol was performed according to [29], where specimens were centrifuged at four velocities (1400, 2000, 3600, 5600 rpm) twice for each one, for 5 minutes at 25°C. For each centrifugation, the contaminated BHI broth was renewed. Finally, a sterile BHI broth was placed in the microtubes, and then stored at $37\pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours. In the 2nd day, the BHI broth was changed for a new sterilized one and another centrifugation (3600g) was performed. This protocol was repeated for the next 2-days [28].

Treatment protocol.

All specimens were contaminated at the 5th day. Then, the specimens were divided in five groups according to the IM protocol as previously described and the treatments were performed in the same standard way as applied for each different group in microbiological culture analysis. The specimens were sectioned in longitudinal direction with a diamond disc to obtain two halves. Next, the specimens were immersed in EDTA 17% for 5 min, to remove the smear layer, and then rinsed of with 10 mL of saline solution.

SEM.

Two specimens of each group were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 minutes. Then, they were dehydrated by increasing concentrations of ethanol

(60, 70, 80, and 100) and stored at 37°C for 24 hours to dehydrate them. Next, they were metalized by 12nm gold layer by means of a metallizer (EMITECH SC7620 USA). The presence of bacteria in the dentinal tubules was observed by SEM (Inspect S50 FEI, Czech Republic) at a magnification of 5000–10000x operating at 7–8 kV.

CLSM.

To evaluate bacterial penetration and viability in dentinal tubules, 4 specimens of each group were cleaved for halves, and then stained using SYTO 9 and propidium iodide technique (Live/Dead BacLight Viability Kit; Molecular Probes, Eugene, OR). The samples were examined on an inverted Leica TCS-SPE confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany) using a 40X magnification oil lens. The images were obtained by using 23 sections of 1 µm step size in a format of 1024x1024 pixels. Eight images were taken of each specimen half (cervical and apical thirds). Four confocal “stacks” of random areas were obtained for each sample with a 40x oil lens. The images were collected by Leica application Suite-Advanced fluorescence program (LAS AF, Leica Mannheim, Germany), and then analyzed with Leica LAS AF Lite software. The quantification of bacterial viability was performed with the bioImageL TM v21 software 4 for the bacterial count (green/live and red/dead).

Statistical analysis

For (CFU/mL) data, and CLSM bacteria counts were presented as a percentage of LIVE/DEAD bacteria, were all analyzed by the non-parametric

Kruskal-Wallis and Dunn's test at 5% significance level in the software XLSTAT (XLSTAT, ©Addinsoft SARL, USA).

RESULTS

Microbiological Culture Analysis

The results of microbiological culture analysis showed that all specimens were contaminated, which was confirmed by SC. Table 1 shows the mean number of CFU/mL of all groups after instrumentation procedure (S1) and after IM (S2).

In S1, there was a significant reduction of *E. faecalis* in all groups comparing to the SC, showing that the instrumentation procedure was effective in reducing the number of cultivable bacteria. In S2, there was a significant reduction of *E. faecalis* comparing to S1 except for control group, in which was noted a microbial growth.

Comparing the groups among each other in S2 after different treatments, no statistical difference was observed between the PDT+NAC, NAC, and Ca(OH)₂ groups. Those groups differed statistically from PDT and Saline solution groups, which presented similar results (Table 1).

The groups PDT+NAC, NAC, and Ca(OH)₂ presented a reduced number of cultivable bacteria being statistically different when compared to PDT and Saline solution groups ($p < 0.0001$).

SEM analysis

SEM results showed no bacterial growth of *E. faecalis* after treatment in PDT+NAC and NAC groups. However, Ca(OH)₂ group showed bacterial

biofilm. Further, PDT and Saline solution group showed a heterogeneous pattern of surface coverage by viable colonies and bacteria (Fig.1).

CLSM analysis

The higher median percentage value of dead cells of *E. faecalis* was found in the PDT+NAC group (72.23%), followed by Ca(OH)₂, PDT, and NAC, which presented 69.28%, 61.4% and 61.19%, respectively (Fig.2). However, no statistical difference was observed between these groups ($p > 0.05$).

Red fluorescence was seen to predominate in the PDT+NAC treated specimens (Fig 3). In the control group, 54.93% of *E. faecalis* remained alive after treatment (Fig.2), as shown by green fluorescence (Fig 3).

Comparing the percentage of viable bacteria in the apical third of root canals, it was observed that PDT (38.17%) and Ca(OH)₂ (28.84%) groups presented the smallest percentage value of viable bacteria with statistical significant difference when compared to Saline solution (73,80%) ($p < 0.0021$), but no differences were observed comparing to the all other groups.

Evaluating the cervical third, the Ca(OH)₂ (17,76%), NAC (30.25%), PDT (27.23%) and PDT+NAC (36.97%) groups presented a smaller percentage value of viable bacteria being statistically different when compared to Saline solution group (69.17%).

The antimicrobial activity was also evaluated regarding the different depths of dentinal tubules. The superficial portion showed that PDT (26.08%), Ca(OH)₂ (19.96%) and NAC (34,72%) groups presented the smallest percentage value of viable bacteria with statistical significant difference when compared to Saline solution (64.73%) ($p < 0.0007$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$). And the deep portion showed that all groups, PDT (40.08%), Ca(OH)₂ (29.63%), NAC (43.07%) and

PDT+NAC (41.45%) presented low percentage of viable bacteria differing statistically when compared to Saline solution group (78.01%).

DISCUSSION

E. faecalis has been shown to be one of the most prevalent species associated with endodontic failure [30]. In persistent root canal infections, *E. faecalis* binds to dentinal tubule by adhering to collagen, which is the main organic component of dentine [31]. Due to its capacity to penetrate and adhere to the inside of dentinal tubules and root canal ramifications, the biomechanical preparation is not sufficient to eradicate this microorganism from the root canal system [4]. Several studies have been evaluating the antimicrobial activity of different IM to eliminate persistent bacteria after biomechanical preparation [14,32].

In the present study, it was proposed the use of NAC as IM, associated or not with PDT on intracanal biofilm of *E. faecalis*. After 21 days of *E. faecalis* inoculation it was possible to observe the bacterial growth of *E. faecalis* in all groups through SC.

Data obtained by microbiological culture analysis after instrumentation, showed a great reduction of CFU/mL compared to SC, but none of the groups were completely free of *E. faecalis*. This result is in accordance with previous study, which also demonstrates the limited effectiveness of biomechanical preparation [33].

After IM period, the microbiological analysis by CFU/mL showed that PDT+NAC, NAC, and Ca(OH)₂ similarly presented the best results regarding the bactericidal action, without statistical difference among them. However,

Ulusoy et al. [20], verified that $\text{Ca}(\text{OH})_2$ had a higher antimicrobial action over *E. faecalis*.

In addition, the data obtained by CLSM analysis showed similar results when compared to the data obtained by culturing procedure, except for the fact that in CLSM, the PDT group was also able to eliminate *E. faecalis* enough to be statistically similar to the other groups. The control group showed the worst result in both analysis.

The results comparing the antimicrobial activity in different depths of dentinal tubules showed that in deep portion all experimental groups PDT, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NAC and PDT+NAC presented better results when compared to Saline solution group. The CLSM analysis in cervical third demonstrated all groups had a better performance when compared to saline solution group. Differently, when it comes to apical third, solely PDT and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ differed statistically from the control saline solution group.

Quah et.al [12] studied the effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and NAC over *E. faecalis* on dentin disks examined by CLSM and showed that NAC was more effective than $\text{Ca}(\text{OH})_2$. However, in that case, the specimens were exposed to IM for 7 days. Thus, further investigations are needed regarding the adequate time for IM exposure.

Data obtained by SEM analysis showed no bacterial growth of *E. faecalis* after treatment in PDT+NAC and NAC groups. However, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ group showed bacterial colony in a planktonic form. In addition, it was possible to clearly notice bacterial colonies in both planktonic and biofilm forms, in both PDT and Saline solution groups. Ulusoy et al [20], revealed that NAC and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ groups presented a heterogeneous pattern of surface coverage by viable colonies sub 5000 \times , original magnification with SEM.

The present study has confirmed the antimicrobial activity of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as IM [34]. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ was evaluated in the present study because despite its

widespread use as IM, there are some conflicting studies regarding its effectiveness against *E. faecalis* [35,36].

Pinar et al. [37] recommended NAC as an alternative therapeutic agent of Ca(OH)_2 , as the NAC was highly effective against several microorganisms including *E. faecalis* (37) in both the planktonic and biofilm forms [12]. NAC is an important antioxidant which contains Thiol and has antimicrobial action over a wide microorganisms spectrum [16,17]. Its antimicrobial activity is possibly due to thiol reactions (-SH) with the bacteria proteins which induces irreversible protein damage, and also due to inhibition of cysteine use in bacteria [16]. Besides that, in some biofilms, NAC is capable to reduce extracellular matrix production, reducing the bacteria adhesion on surfaces, thus inhibiting the biofilms formation [18].

Several methodologies have been used to evaluate the antimicrobial activity of different IM and thus the findings of different studies should be carefully interpreted. Possibly, different methodologies explain the different results between the analysis performed in the present study. Bacteriological sampling with paper points is limited since the microorganisms attached to dentinal tubules can not be sampled. Therefore, the present study also evaluated the antimicrobial activity by CLSM because the immunofluorescence technique is effective for detecting bacterial viability in dentinal tubules [28].

In conclusion, the antimicrobial activity of NAC was similar to Ca(OH)_2 regardless the use of PDT. Thus, the use of NAC as IM is promising since this medication has been shown to be effective against both the planktonic and biofilm forms of *E. faecalis*. Further investigations are also needed to evaluate the effectiveness of NAC and Ca(OH)_2 associations and not only on *E. faecalis*, but also on Gram-positive bacteria and its endotoxins.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

- [1] Saha S, Nair R, Asrani H. Comparative Evaluation of Propolis, Metronidazole with Chlorhexidine, Calcium Hydroxide and Curcuma Longa Extract as Intracanal Medicament Against *E.faecalis*- An Invitro Study. *J Clin Diagn Res* 2015;9:ZC19–21. doi:10.7860/JCDR/2015/14093.6734.
- [2] Babaji P, Jagtap K, Lau H, Bansal N, Thajuraj S, Sondhi P. Comparative evaluation of antimicrobial effect of herbal root canal irrigants (*Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica*, *Aloe vera*) with sodium hypochlorite: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent* 2016;6:196–199. doi:10.4103/2231-0762.183104.
- [3] Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39:249–281. doi:10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x.
- [4] Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71–76. doi:10.1046/j.0902-0055.2003.00116.x.
- [5] Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498–504. doi:10.1016/S0099-2399(07)80180-4.
- [6] Nair PNR, 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* 2005;99:231–252. doi:10.1016/j.tripleo.2004.10.005.

- [7] Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod* 1984;10:477–483. doi:10.1016/S0099-2399(84)80204-6.
- [8] Yilmaz M, Yilmaz S, Dumanı A, Kuden C, Yoldas O. Effects of seven different irrigation techniques on debris and the smear layer: a scanning electron microscopy study. *Niger J Clin Pract* 2017;20:328–334. doi:10.4103/1119-3077.180061.
- [9] Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci* 2014;22:356–365. doi:10.1590/1678-775720140032.
- [10] Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315–320. doi:10.1097/00004770-200405000-00004.
- [11] Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dent Traumatol* 1985;1:170–175. doi:10.1111/j.1600-9657.1985.tb00652.x.
- [12] Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2012;38:81–85. doi:10.1016/j.joen.2011.10.004.
- [13] Flach N, Böttcher DE, Parolo CCF, Firmino LB, Malt M, Lammers ML, et al. Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An in vitro study. *Scanning* 2016;38:57–62. doi:10.1002/sca.21241.
- [14] Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, et al. Action of propolis and medications against *Escherichia coli*

and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:e70–4. doi:10.1016/j.tripleo.2010.01.029.

[15] Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medici TC, Tramèr MR. The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *Eur Respir J* 2000;16:253–262.

[16] Marchese A. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2003;22:95–100. doi:10.1016/S0924-8579(03)00232-2.

[17] Pérez-Giraldo C, Rodríguez-Benito A, Morán FJ, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:643–646. doi:10.1093/jac/39.5.643.

[18] Olofsson A-C, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:4814–4822.

[19] Aslam S, Darouiche RO. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. *Int J Artif Organs* 2011;34:752–758. doi:10.5301/ijao.5000024.

[20] Ulusoy AT, Kalyoncuoğlu E, Reis A, Cehreli ZC. Antibacterial effect of N-acetylcysteine and taurolidine on planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis*. *Dent Traumatol* 2016;32:212–218. doi:10.1111/edt.12237.

[21] Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* 2010;10:140. doi:10.1186/1471-2180-10-140.

[22] Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014;18:2942–2948.

- [23] Kaiwar A, Usha HL, Meena N, Ashwini P, Murthy CS. The efficiency of root canal disinfection using a diode laser: in vitro study. *Indian J Dent Res* 2013;24:14–18. doi:10.4103/0970-9290.114916.
- [24] Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, et al. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. *Int Endod J* 2017. doi:10.1111/iej.12763.
- [25] Asnaashari M, Mojahedi SM, Asadi Z, Azari-Marhabi S, Maleki A. A comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810 nm and LED lamp 630 nm) against *Enterococcus faecalis* in extracted human anterior teeth. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016;13:233–237. doi:10.1016/j.pdpdt.2015.07.171.
- [26] Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun* 1983;41:190–196.
- [27] Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F, Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci* 2012;27:615–620. doi:10.1007/s10103-011-0998-7.
- [28] Andrade FB de, Arias MPC, Maliza AGA, Duarte MAH, Graeff MSZ, Amoroso-Silva PA, et al. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci* 2015;23:591–598. doi:10.1590/1678-775720140261.
- [29] 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* 2011;37:1380–1385. doi:10.1016/j.joen.2011.06.018.
- [30] Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral*

Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2004;97:85–94. doi:10.1016/S1079-2104(03)00353-6.

[31] Love RM. Enterococcus faecalis--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399–405.

[32] Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004;37:311–319. doi:10.1111/j.0143-2885.2004.00799.x.

[33] Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod* 2015;41:824–830. doi:10.1016/j.joen.2015.01.031.

[34] Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD de, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Jorge AOC, et al. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *J Appl Oral Sci* 2011;19:106–112. doi:10.1590/S1678-77572011000200005.

[35] Siqueira JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22:674–676. doi:10.1016/S0099-2399(96)80062-8.

[36] Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod* 2001;27:401–403.

[37] Pinar Karapinar S, Ulum YZA, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol* 2016;68:48–54. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.03.017.

Table.1 The mean and homogenous groups of *E.faecalis* (CFU/mL) in samples (confirmation, 1st, and 2nd).

Groups Samples	Sample of confirmation Sc	1 st Sample S1	2 nd Sample S2	Homogeneous Groups*
PDT+NAC	49.52 * 10 ⁵	1230	0	A
NAC	85.66 * 10 ³	1040	0.2	A
PDT	27.00 * 10 ⁴	330	25.4	B
Ca(OH) ₂	43.12 * 10 ³	492.6	0.5	A
Saline solution	39.18 * 10 ⁵	505.2	415.9	B

*Different letters mean statistically significant differences (p<0.05)

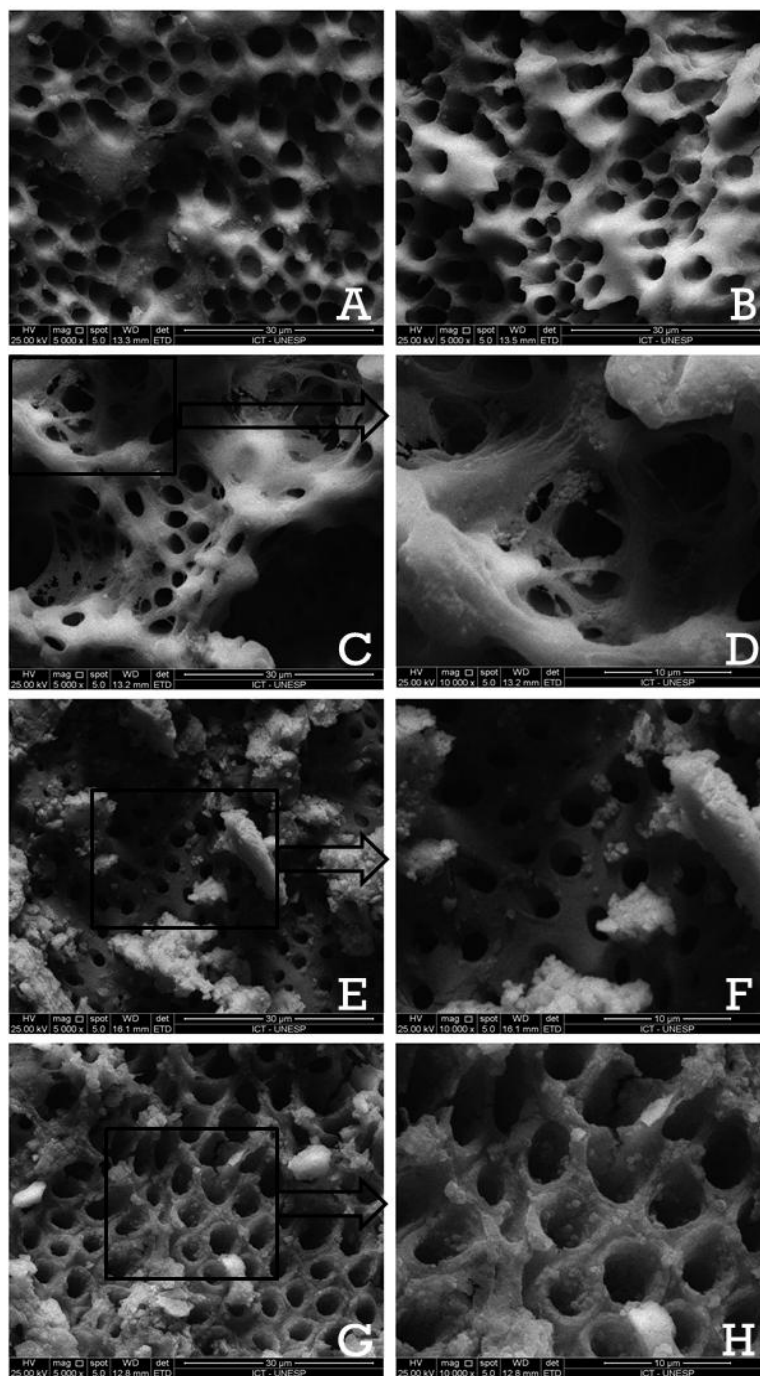
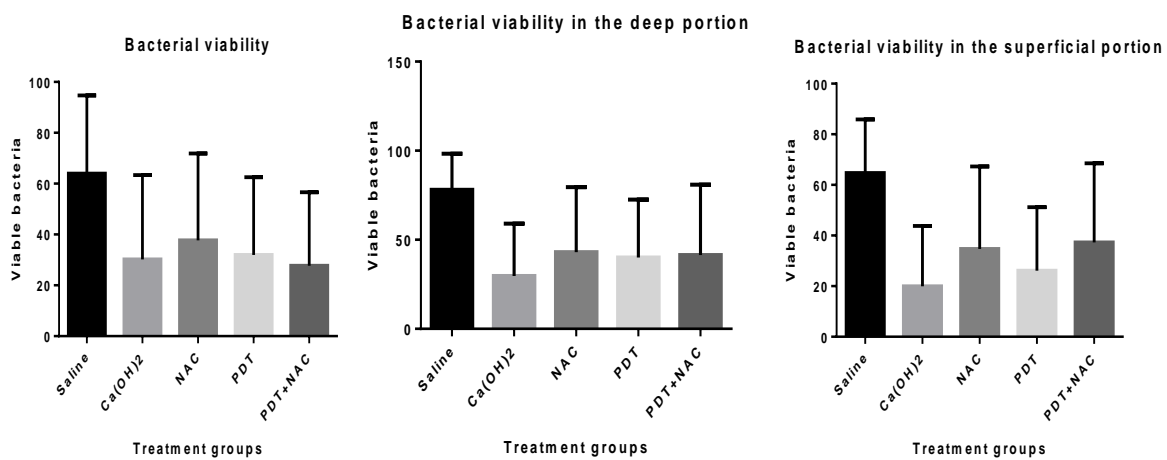


Figure.1 Representative photomicrography of canal walls after treatment : A) PDT+NAC: absence of *E.faecalis* in canal walls and dentinal tubules (5000X); B) NAC: absence of *E.faecalis* in canal walls and dentinal tubules (original magnification, 5000X); C) Ca(OH)₂: presence of *E. faecalis* (original magnification, 5000X); D) Presence confirmation of *E.faecalis* in Ca(OH)₂ group (original magnification, 10000X); E) PDT: presence of *E. faecalis* (original magnification, 5000X); F) Presence confirmation of *E.faecalis* in PDT group (original magnification, 10000X); G) control group show *E.faecalis* presence in dentinal tubules entrance (original magnification, 5000X); H) Presence confirmation of *E.faecalis* in control group (original magnification, 10000X).

Figure.2 The statistical difference among treatment groups concerning the mean of alive bacteria inside of dentinal



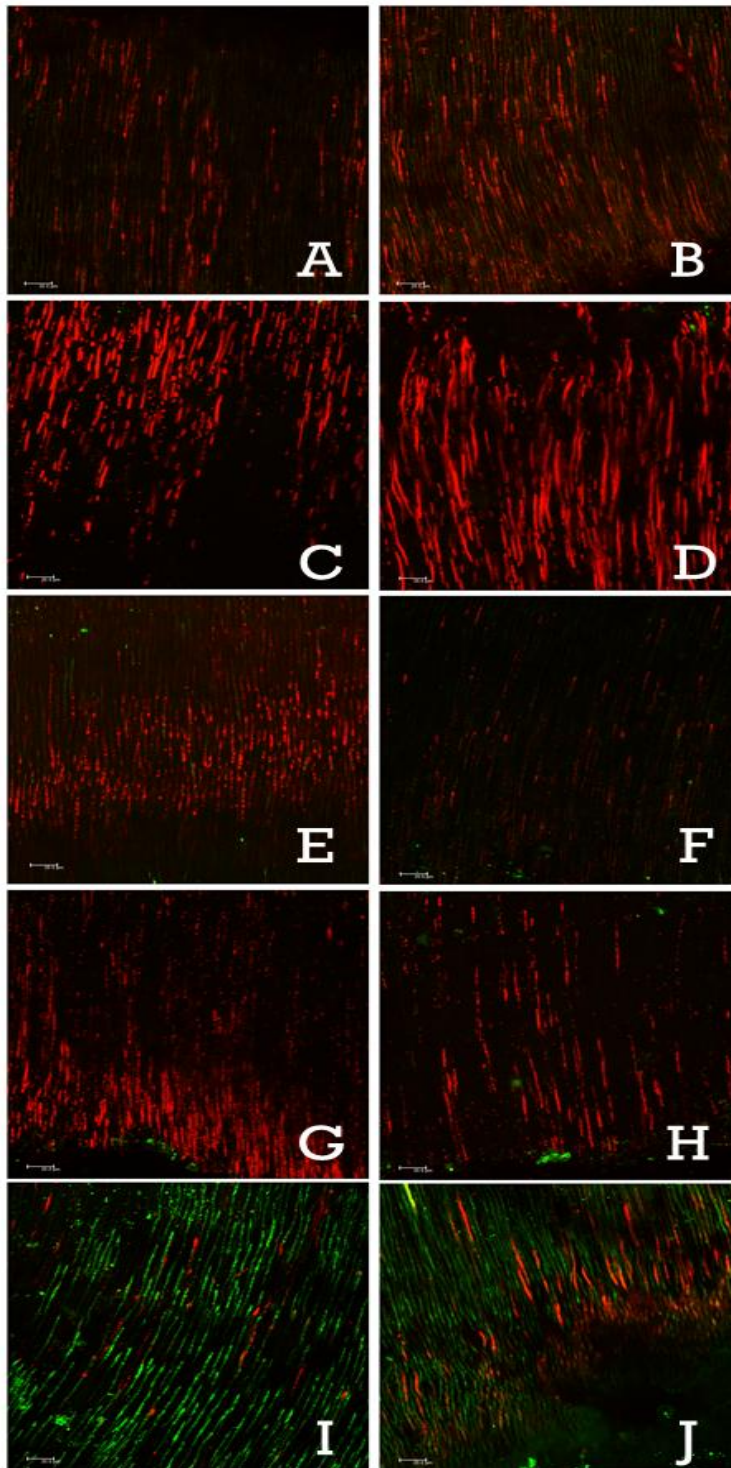


Figure 3. CLSM of *E. faecalis* infected dentinal tubules after treatment: Illustrative images of dentinal tubules by CLSM after treatment with PDT+NAC cervical third (A), PDT+NAC apical third (B), NAC cervical third (C), NAC apical third (D), PDT cervical third (E), PDT apical third (F), Ca(OH)₂ cervical third (G), Ca(OH)₂ apical third (H), saline solution cervical third (I), saline solution apical third (J).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste estudo, foram utilizados dois protocolos diferentes, mas complementares, para realizar três testes, a fim de obter resultados mais confiáveis, para avaliar a ação antimicrobiana da pasta NAC com ou sem PDT (LASER diodo da baixa intensidade associado ao corante azul de metileno) em dentes humanos extraídos (*in vitro*). A primeira metodologia utilizada permite avaliar a atividade antimicrobiana intracanal por meio de teste de cultura microbiologia por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), referente ao conteúdo coletado do canal radicular.

Muitos estudos que avaliam a ação antimicrobiana dos medicamentos intracanaís baseadas na metodologia de cultura relatam inabilidade de várias espécies orais de crescer em condições laboratórios artificiais (Siqueira e Rôças 2004).

No experimento de cultura, os resultados mostraram efeito antimicrobiano semelhante nos grupos de PDT+NAC NAC e Ca(OH)_2 . Verificou-se que o PDT aumentou o poder antimicrobiano da pasta NAC, no entanto, o grupo da PDT apresentou ação antimicrobiana muito baixa, comparando com os outros grupos. Além disso, não houve diferença estatisticamente entre o grupo PDT e o grupo de controle negativo (solução salina).

Palaniswamy et al. (2016), ao avaliarem a ação antimicrobiana da NAC sobre biofilmes de *E. faecalis*, concluíram que a NAC tem ação antimicrobiana semelhante ao CLX 2% como medicação intracanal, porém a combinação dos dois mostrou uma maior ação antimicrobiana. Além disso, em um estudo mais recente, Choi et al. 2017, sugeriram usar a NAC como medicação intracanal pela alta eficácia contra vários micro-organismos, incluindo *E. faecalis*. Nossos

resultados, mostraram que a NAC apresentou poder antimicrobiano alto contra biofilmes de *E. faecalis*. Esses resultados são semelhantes a outros estudos que relatam a NAC como agente antimicrobiano eficaz (Ulusoy et al. 2016; Silveira et al. 2013; Quah et al. 2012).

Além disto, no presente estudo, utilizou-se biofilmes incubados por 21 dias, que possuem maior resistência aos antimicrobianos do que as bactérias planctônicas e biofilmes incubadas por duas semanas ou menos (Shen et al., 2011) comprovando que realmente a NAC é eficaz contra *E. faecalis*.

Eroshenko et al. 2017, que avaliaram a ação antimicrobiana da NAC sobre vários micro-organismos, tanto gram-positivos quanto gram-negativos, concluiu-se que o crescimento e a formação do biofilme destes micro-organismos foram significativamente inibidos pela NAC. Ainda, a formação de biofilme e o crescimento da cultura mista de *P. acnes* e *S. epidermidis* foram significativamente desacelerados com a NAC (12,5 mg/ml), o que sugere a NAC como um agente alternativo promissor para a prevenção de infecções associadas ao biofilme. Além disso, Quah et al. 2012 acreditam que a NAC tem uma ação antimicrobiana contra as ambas formas de *E. faecalis*, tanto a planctônica quanto no biofilme. O seu principal mecanismo de ação antimicrobiana consiste na diminuição da formação de biofilme (Marchese, 2003; Pérez-Giraldo et al., 1997; Schwandt et al., 2004), redução da produção da matriz de polissacarídeo extracelular, interrompendo biofilmes maduros e reduzindo a aderência de bactérias nas superfícies (Marchese, 2003; Olofsson et al., 2003).

Embora no presente estudo e no estudo de Ulusoy et al. 2016 ao se utilizar NAC sozinha, a ação antimicrobiana tenha sido satisfatória, ambos estudos não mostraram poder antimicrobiano superior do NAC em relação ao Ca(OH)_2 .

O Ca(OH)_2 é amplamente utilizado na desinfecção dos canais radiculares devido a sua ação antimicrobiana, capacidade solvente de tecidos e indução de

mineralização (Salgado et al., 2009). A atividade antimicrobiana do mesmo está associada a seu alto pH (Salgado et al., 2009), que é dependente da disponibilidade de íons hidroxila na pasta (Siqueira, Lopes, 1999). Em seu estudo, Valera et al. (2016) verificaram que Ca(OH)_2 como medicação intracanal eliminou 100% de *E. faecalis*. No presente estudo também se verificou a efetividade deste medicamento, com 61.19% de eliminação de *E. faecalis*.

Verificou-se que PDT não mostrou bons resultados, o que está de acordo com os resultados de Benvindo et al. 2008 que avaliaram o efeito antimicrobiano do LASER, com diferentes intensidades, com ou sem corante azul de metileno. Verificaram ausência de efeito antimicrobiano do LASER, tanto com fotosensibilizador quanto sem, sobre dois tipos diferentes de micro-organismos Gram-Positivo e Gram-Negativo.

Embora a maioria das pesquisas demonstre resultados que convergem ao relação aos efeitos bactericidas (Hoedke et al., 2017; Trindade et al., 2017; Schulte-Lünzum et al., 2017), o grupo tratado com PDT não apresentou poder antimicrobiano, evidenciando não haver qualquer efeito bactericida ou bacteriostático nos parâmetros utilizados, o que concorda com outro estudo recente (Rosa et al. 2017)

A PDT pode ser descrita como um tratamento que utiliza fontes de luz para estimular um agente de foto-sensibilização, em presença de oxigênio. A PDT, ou desinfecção foto-ativada, usa a luz com comprimento de onda específico para estimular um corante não tóxico fotoativo, chamado de foto-sensibilizador (Lee et al., 2004). Entretanto, verificou-se que a associação ao PDT+NAC foi mais eficaz na luz do canal e na cultura bacteriana. No presente estudo, não foi possível comparar o efeito antimicrobiano da NAC+PDT, devido à ausência de tal estudo na literatura com resultados anteriores.

No presente estudo, no grupo controle (solução salina), houve uma baixa redução de micro-organismos. Esta redução se deve exclusivamente ao PBM, com abundante irrigação dos canais radiculares, comprovando que a solução salina não apresenta atividade antimicrobiana (Byström e Sundqvist 1983).

Quando se avaliou os tratamentos propostos por CLSM, verificou-se semelhanças em todos grupos, sendo que na análise mais profunda, numericamente Ca(OH)_2 foi superior. No entanto Quah et al., 2012, concluíram que a NAC mostrou uma contagem menor de bactéria viva comparada ao Ca(OH)_2 , mostrando maior ação antimicrobiana. Nossos resultados foram diferentes, com um poder antimicrobiano igual em todos os grupos de tratamento, exceto o grupo controle. Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento, o que mostra que o PDT contribui para a redução microbiana direta sobre as bactérias na luz do canal.

Sendo assim, pelo presente estudo verificou-se que:

- A pasta da NAC associada ou não ao PDT mostrou resultados semelhantes da pasta de Ca(OH)_2 na análise microbiológica;
- A PDT sozinho apresentou resultados semelhantes ao grupo controle negativo na análise microbiológica, mas foi semelhante aos grupos NAC+PDT, NAC e Ca(OH)_2 no CLSM.

REFERÊNCIAS*

Aras MH, Göregen M, Güngörmüş M, Akgül HM. Comparison of diode LASER e Er:YAG LASERS in the treatment of ankyloglossia. *Photomed Laser Surg.* 2010 Apr;28(2):173-7. doi: 10.1089/pho.2009.2498. PubMed PMID: 19743963.

Arias MPC. Influência de agitação ultrassônica na ação antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio e própolis [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo - USP; 2013.

Aslam S, Darouiche RO. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections. *The International Journal of Artificial Organs* 2011;34(9): 752–8. doi:10.5301/ijao.5000024. PMID: PMC3251652.

Babaji P, Jagtap K, Lau H, Bansal N, Thajuraj S. Comparative evaluation of antimicrobial effect of herbal root canal irrigants (*Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica*, *Aloe vera*) with sodium hypochlorite: an in vitro study. *J Int Soc Pre Community Dent.* 2016;6(3):196–9. doi:10.4103/2231-0762.183104. PMID: PMC4916791

Bazvand L, Aminozarbian MG, Farhad A, Noormohammadi H, Hasheminia SM. Antibacterial effect of triantibiotic mixture, chlorhexidine gel, e two natural materials Propolis e *Aloe vera* against *Enterococcus faecalis*: an ex vivo study. *Dent Res J (Isfahan).* 2014 Jul;11(4):469-74. PubMed PMID: 25225560.

Benvindo RG, Braun G, De Carvalho AR, Bertolini GRF. Effects of photodynamic therapy of a sole low-power LASER irradiation on bacteria in vitro. *Fisioter Pesqui.* 2008;15(1): S3-7. doi 10.1590/S1809-29502008000100009.

Borzini L, Condò R., De Dominicis P, Casaglia A, Cerroni L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents e Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. *ODJ* 2016, 10: 692–703.

Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol e calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985 Oct;1(5):170-5. PubMed PMID: 3865763.

Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1983;55(3):307–12. PubMed PMID: 6572884.

Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):471-3. PubMed PMID: 15917691.

Choi YS, Kim C, Moon JH, Lee JY. Removal e killing of multispecies endodontic biofilms by N-acetylcysteine. *Braz J Microbiol.* 2017 Sep 2. pii: S1517-8382(16)30347-1. doi: 10.1016/j.bjm.2017.04.003. PubMed PMID: 28916389.

Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006 May;32(5):434-7. PubMed PMID: 16631843.

Dammaschke T, Jung N, Harks I, Schafer E. The effect of different root canal medicaments on the elimination of *Enterococcus faecalis* ex vivo. *EurJD* 2013 7(4): 442–8. doi: 10.4103/1305-7456.120683. PMCID: PMC4053669.

Desiate A, Cantore S, Tullo D, Profeta G, Grassi FR, Ballini A. 980 nm diode LASERS in oral e facial practice: current state of the science e art. *Inter. J. Med. Sci.* 2009; 6(6): 358–64. PMCID: PMC2786991.

Del Prado G, Ruiz V, Naves P, Rodríguez-Cerrato V, Soriano F, del Carmen Ponte M. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains e effects of human serum albumin, ibuprofen, N-acetyl-l-cysteine, amoxicillin, erythromycin, e levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Aug;67(4):311-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.03.016. PubMed PMID: 20638597.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002 Oct;28(10):689-93. PubMed PMID: 12398165.

Eroshenko D, Polyudova T, Korobov V. N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion e biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. *Microb Pathog.* 2017 Apr;105:145-52. doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.030. Epub 2017 Feb 22. PubMed PMID: 28237766.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):221-8. PubMed PMID: 11985673.

Fletcher M. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv Microb Physiol*. 1991;32:53-85. Review. PubMed PMID: 1882729.

Fransson H, Larsson KM, Wolf E. Efficacy of LASERS as an adjunct to chemo-mechanical disinfection of infected root canals: a systematic review. *Int endod*. 2013; 46(4): 296–307. PMID: 23095058.

Genovese WJ, dos Santos M T B R, Faloppa F, de Souza Merli, LA. The use of surgical diode LASER in oral hemangioma: a case report. *Photomed Laser Surg* 2010; 28(1): 147–51.

Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, e Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):852-5. Epub 2007 Apr 2. PubMed PMID: 17804328.

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite e chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2001 Sep;34(6):424-8. PubMed PMID: 11556507.

Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Apr;19(2):71-6. PubMed PMID: 14871344.

Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007 Aug;33(8):917-25. Epub 2007 Jun 22. PubMed PMID: 17878075.

Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch, J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral surg oral med oral patho oral radiol endod*. 2001; 91(5): 579–86. Doi 10.5402/2012/390526. PubMed PMID: 11346739.

Harrison JW, He RE. The effect of dilution e organic matter on the anti-bacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 1981; 7(3): 128–32.

Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, et al. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. *Int Endod J*. 2017 Mar 9. doi: 10.1111/iej.12763. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28276583.

- Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PØ, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011 Apr;3(2):55-65. doi: 10.4248/IJOS11026. Review. PubMed PMID: 21485309. PubMed Central PMCID: PMC3469878.
- Kakinuma Y. Lowering of cytoplasmic pH is essential for growth of *Streptococcus faecalis* at high pH. *J Bacteriol.* 1987 Sep;169(9):4403-5. PubMed PMID: 3114241. PubMed Central PMCID: PMC213763.
- Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod.* 2008 Jul;34(7):850-4. doi: 10.1016/j.joen.2008.04.006. PubMed PMID: 18570994.
- Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007 Aug;86(8):694-707. Erratum in: *J Dent Res.* 2007 Nov;86(11):1126. PubMed PMID: 17652195.
- Law A, Messer H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod.* 2004 Oct;30(10):689-94. PubMed PMID: 15448460.
- Lee MT, Bird PS, Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for LASERS in endodontics. *Aust Endod J.* 2004 Dec;30(3):93-8. PubMed PMID: 15633797.
- Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001 Jul;34(5):399-405. PubMed PMID: 11482724.
- Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod.* 1984 Oct;10(10):477-83. PubMed PMID: 6593410.
- Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L, Debbia EA, Schito GC. Effect of fosfomycin alone e in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2003 Oct;22 Suppl 2:95-100. PubMed PMID: 14527779.
- McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod.* 1975 Jul;1(7):238-42. PubMed PMID: 1061799.
- Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod j.* 1998, 31(1): 1-7. doi: 10.4103/1305-7456.130591.

Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J*. 2006 Apr;39(4):249-81. PubMed PMID: 16584489.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human meibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb;99(2):231-52. PubMed PMID: 15660098.

Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, e bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Aug;69(8):4814-22. PubMed PMID: 12902275 PubMed Central PMCID: PMC169071.

Palaniswamy U, Lakkam SR, Arya S, Aravelli S. Effectiveness of N-acetyl cysteine, 2% chlorhexidine, e their combination as intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Conserv Dent*. 2016 Jan-Feb;19(1):17-20. doi: 10.4103/0972-0707.173186. PubMed PMID: 26957787. PubMed Central PMCID: PMC4760006.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts e enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J*. 2001 Sep;34(6):429-34. PubMed PMID: 11556508.

Pérez-Giraldo C, Rodríguez-Benito A, Morán FJ, Hurtado C, Blanco MT. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 1997 May;39(5):643-6. PubMed PMID: 9184365.

Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation e dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J*. 2002 Jan;35(1):13-21. PubMed PMID: 11858203.

Podbielski A, Spahr A, Haller B. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide e chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. *J Endod* 2003, 29(5): 340–45. Doi 10.1097/00004770-200305000-00006.

Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth e eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2012 Jan;38(1):81-5. doi: 10.1016/j.joen.2011.10.004. Epub 2011 Nov 21. PubMed PMID: 22152626.

Rosa RAD, Santini MF, Figueiredo JAP, Visioli F, Pereira JR, Vivan RR, et al. Effectiveness of photodynamic therapy associated with

irrigants over two biofilm models. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017; 20:169-74. doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.10.003. PubMed PMID: 29032227.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004 May;30(5):315-20. PubMed PMID: 15107642.

Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review e meta-analysis. *J Appl Oral Sci.* 2014, 22(5), pp. 356–365. doi:10.1590/1678-775720140032. PMCID: PMC4245746.

Saetti R, Silvestrini M, Cutrone C, Narne S. Treatment of congenital subglottic hemangiomas: our experience compared with reports in the literature. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134(8): 848–51.

Salgado RJ, Moura-Netto C, Yamazaki AK, Cardoso LN, de Moura AA, Prokopowitsch I. Comparison of different irrigants on calcium hydroxide medication removal: microscopic cleanliness evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Apr;107(4):580-4. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.12.008. Epub 2009 Feb 6. PubMed PMID: 19201223.

Schulte-Lünzum R, Gutknecht N, Conrads G, Franzen R. The Impact of a 940 nm Diode LASER with Radial Firing Tip e Bare End Fiber Tip on *Enterococcus faecalis* in the Root Canal Wall Dentin of Bovine Teeth: An In Vitro Study. *Photomed Laser Surg.* 2017;35(7):357-63. doi: 10.1089/pho.2016.4249. PMID: 28294701.

Schwandt LQ, Van Weissenbruch R, Stokroos I, Van der Mei HC, Busscher HJ, Albers FW. Prevention of biofilm formation by dairy products e N-acetylcystein on voice prostheses in an artificial throat. *Acta Otolaryngol.* 2004 Aug;124(6):726-31. PubMed PMID: 15515498.

Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction e culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod.* 2006 Mar;32(3):173-7. PubMed PMID: 16500220.

Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.* 2011 May;37(5):657-61. doi: 10.1016/j.joen.2011.02.007. Epub 2011 Mar 23. PubMed PMID: 21496666.

Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature

review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 Dec;10(4):632-43. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.07.006. Epub 2013 Aug 14. PubMed PMID: 24192536.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999 Sep;32(5):361-9. PubMed PMID: 10551109.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jan;97(1):85-94. PubMed PMID: 14716262.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation e irrigation with 1%, 2.5%, e 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000 Jun;26(6):331-4. PubMed PMID: 11199749.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*. 1990 Oct;16(10):498-504. PubMed PMID: 2084204.

Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):292-6. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.041. Epub 2009 Dec 6. PubMed PMID: 20113793.

Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medici TC, and Tramèr MR. The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *The Euro Respir J*. 2000; 16(2): 253–62.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure e current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006 Feb;32(2):93-8. PubMed PMID: 16427453.

Trindade AC, de Figueiredo JAP, de Oliveira SD, Barth Junior VC, Gallo SW, Follmann C, et al. Histopathological, Microbiological, e Radiographic Analysis of Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Study in Rats' Molars. *Photomed Laser Surg*. 2017 Mar 9. doi: 10.1089/pho.2016.4102. PMID: 28294706.

Ulusoy AT, Kalyoncuoğlu E, Reis A, Cehreli ZC. Antibacterial effect of N-acetylcysteine e taurolidine on planktonic e biofilm forms of *Enterococcus*

faecalis. *Dent Traumatol*. 2016 Jun;32(3):212-8. doi: 10.1111/edt.12237. Epub 2015 Oct 29. PubMed PMID: 26515652.

Valera MC, Oliveira SA, Maekawa LE, Cardoso FG, Chung A, Silva SF, et al. Action of Chlorhexidine, Zingiber officinale, e Calcium Hydroxide on Ceida albicans, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, e Endotoxin in the Root Canals. *J Contemp Dent Pract*. 2016 Feb 1;17(2):114-8. PubMed PMID: 27206998.

Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of Enterococcus faecalis in saliva e filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2012 Mar;4(1):19-23. doi: 10.1038/ijos.2012.17. Epub 2012 Mar 16. PubMed PMID: 22422085; PubMed Central PMCID: PMC3412659.

Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against Enterococcus faecalis biofilm. *J Endod*. 2014 Feb;40(2):285-90. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.022. Epub 2013 Oct 1. PubMed PMID: 24461420.

Yilmaz M, Yilmaz S, Dumanı A, Kuden C, Yoldas O. Effects of seven different irrigation techniques on debris e the smear layer: a scanning electron microscopy study. *Niger j Clin Pract*. 2017;20(3): 328–34.

Zancan RF, Vivian RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Erade FB, Ponce JB, et al. Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *J Endod*. 2016; 42(12): 1822–28.

APÊNDICE A- Detalhamento metodológico

- **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA INTRACANAL (UFC/mL)**

Foram utilizados 50 dentes humanos uniradiculares, com um canal único, recém-extraídos, por motivos ortodônticos ou doença periodontal, de umas clínicas particulares no estado São Paulo, os dentes foram distribuídos aleatoriamente por 5 grupos de tratamento, com 10 dentes de cada um grupo.

a- Preparo das raízes

A seleção dos dentes foi baseada nas dimensões e similaridades morfológicas da raiz. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, padronizando o comprimento dos espécimes em $16 \pm 0,5$ mm e realizado o desbridamento foraminal com lima K #15.

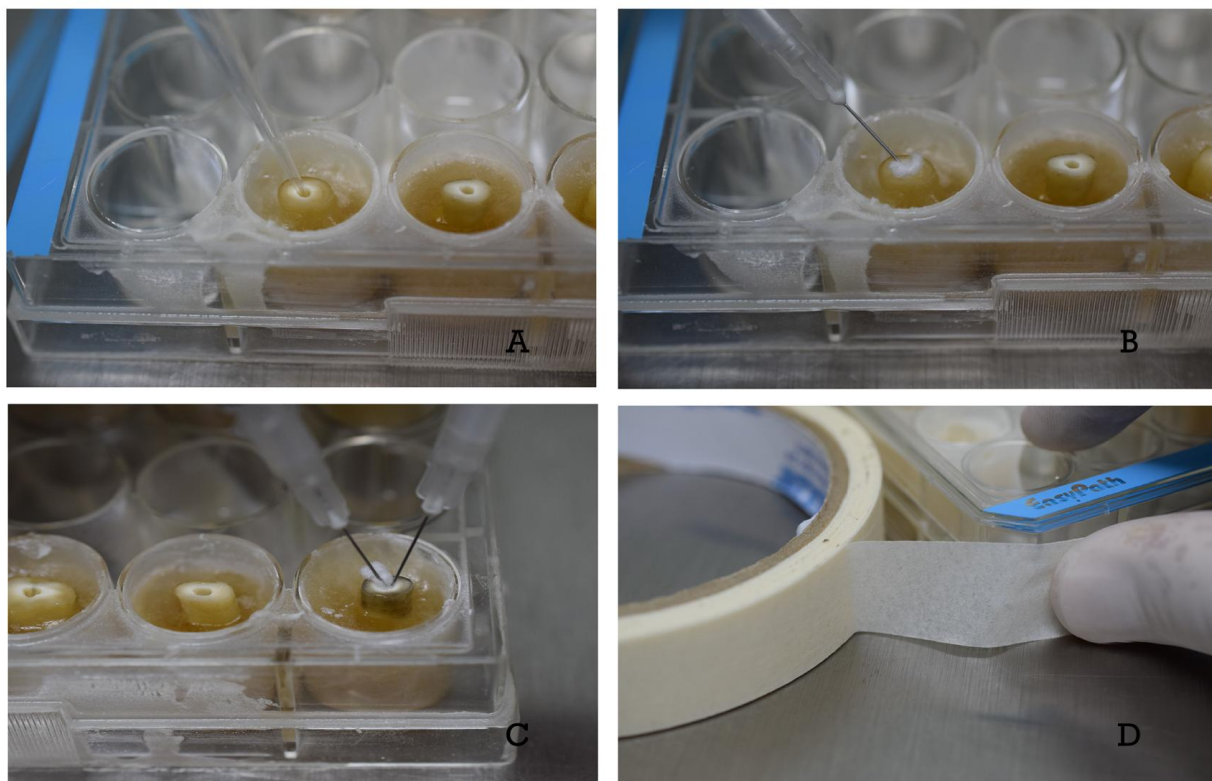
A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima tipo Kerr n° 30 (Dentsply Ind. Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Os canais foram irrigados com 3 mL de solução salina fisiológica a cada troca de instrumento. Após o preparo inicial, os canais foram preenchidos com ácido Etilenodiaminotetracético trisódico (EDTA) (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) por 3 minutos e irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica. Em seguida, foi realizado vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Saint Paul, USA) e as raízes impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular de 24 poços (TPP, Switzerland), com 10 dentes em cada e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor - Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil). As placas foram tampadas e embaladas. Estas placas e todos os materiais utilizados foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas) (Maekawa et al., 2011).

b- Formação do Biofilme nos Canais Radiculares

O microrganismo *E. faecalis* (ATCC 29212), qual foi semeado em placas de Petri contendo caldo infuso-cérebro-coração (BHI) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em solução salina fisiológica estéril e epirogênica contendo 10^6 céls/mL com leitura em espectrofotômetro. Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), todos os canais radiculares foram contaminados primeiramente com 5 μL da suspensão de *E. faecalis* e colocação de 10 μL de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão epirogênica embebida em caldo BHI. As amostras foram armazenadas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com uma atmosfera úmida durante 21 dias, numa incubadora, e 20 mL de caldo BHI foram adicionados nos canais radiculares cada 2 dias. (Figura.1)

Figura.1 A sequência de contaminação (A= contaminar com 10 μ L da suspensão de *E. faecalis* e colocação de 10 μ L de caldo BHI, B= fechar com bolinha de algodão, C= trocar o meio a cada 2 dias, D= tampar a placa).



Após o período de contaminação (21 dias), foi realizada coleta de todas as amostras dos espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares (coleta de confirmação).

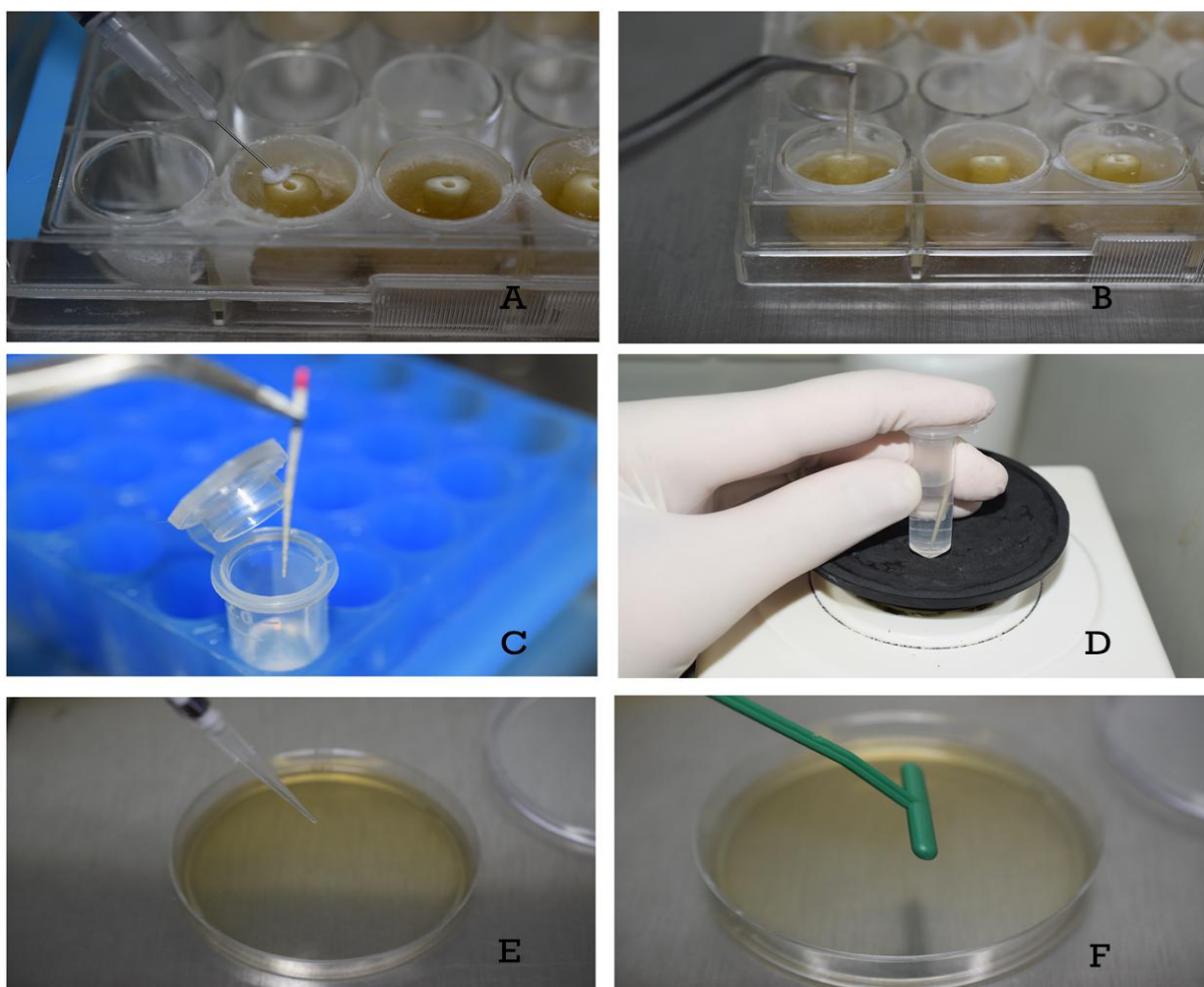
c- Coletas do conteúdo do canal radicular

Todas as coletas dos canais radiculares (Figura 2) foram realizadas da mesma forma: os canais foram preenchidos com solução fisiológica epirogênica e foram agitadas com auxílio da seringa de 1 ml, e os conteúdos foram coletadas com cones de papel, os quais foram transferidos para tubos tipo *ependorf* contendo 900 μ L de solução fisiológica epirogênica. Para todas

as amostras coletadas, foram realizados testes microbiológicos com contagem de UFC/mL para verificar presença de micro-organismos.

Foram realizadas então 3 coletas: **Primeira Coleta:** foi realizada imediatamente após 21 dias de formação de biofilmes e serviu para verificar a contaminação dos canais radiculares; **Segunda Coleta:** foi realizada imediatamente após a instrumentação; **Terceira Coleta:** foi realizada após 14 dias de instrumentação e de utilização dos diferentes protocolos de tratamento.

Figura.2 A sequência de Coleta de confirmação (A= tirar bolinha de algodão, B= coletar com cone de papel, C= colocar o cone no eppendorf 1, D= agitar o eppendorf, E= despejar 100 μ l do conteúdo de eppendorf para plaquiar, F= passar a alça).



d- PBM dos Canais Radiculares

Foi realizado o preparo dos canais com a técnica mecanizada recíproca com limas do sistema Reciproc (VDW - Germany), R40. Os canais foram irrigados a cada terço do canal com 5mL da solução salina totalizando 15 mL e em seguida foi realizada a segunda coleta, imediatamente após a instrumentação para análise UFC/mL.

e- Avaliação da atividade antimicrobiana das medicações intracanal

As raízes receberam os seguintes tratamentos;

- NAC - Somente NAC (pasta de NAC com solução salina).
- PDT - LASER Diodo.
- PDT + NAC: NAC (pasta de NAC com solução salina) mais o LASER diodo.
- Ca(OH)₂: pasta de hidróxido de cálcio e solução salina.
- Grupo controle: (Canais preenchidos com Solução salina).

f- Protocolos de tratamento:

- **NAC - Protocolo da NAC**

A concentração foi utilizada da NAC, é (1 g de pó, manipulada com 1 ml da solução salina), e a pasta foi inserida com auxílio de lima k#30.

- **PDT - Protocolo de LASER Diodo**

A PDT foi realizada utilizando 0,005% de azul de metileno como um fotossensibilizador e um LASER de diodo (660 nm de comprimento de onda) com potência de 40 mW (MMOptics Ltda, São Carlos, Brasil). O fotossensibilizador foi colocado nos canais por 5 minutos. A ponta óptica do LASER (0,40 mm de diâmetro e $16 \pm 0,5$ mm de comprimento da superfície ativa) foi colocada no canal e o LASER foi ativado por 2 minutos sem intervalo, com um movimento helicoidal de apical para cervical. Uma intensidade total de aproximadamente 120,0 J/Cm/Cm² foi aplicada em cada canal. Posteriormente, os canais foram enxugados utilizando 5 mL de solução salina, e depois foram secados com cones de papel esterilizados #40.

- **PDT+NAC**

Neste grupo foram aplicados dois protocolos de tratamento, a PDT com o mesmo tipo usado no grupo b, e com mesma potência e comprimento de onda foi aplicado, E depois foi aplicada a pasta da NAC, com a concentração usada no primeiro grupo.

- **Grupo Ca(OH)₂**

Foi usada neste grupo, uma pasta de hidróxido de cálcio e a solução salina com concentração de uma pasta de consistência apropriada para ser aplicada como medicação intracanal (1:1), como um grupo controle positivo, para avaliar a deferência entre este grupo e as outras onde serão usados outros protocolos de tratamento.

- **Grupo controle**

Como é grupo negativo não foi aplicada nenhuma medicação intracanal, somente solução salina.

- **ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) E MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CLSM)**

Foram utilizados 30 dentes para realizar os testes de MEV e CLSM de acordo com Arias 2013.

a- Preparo dos blocos

Os dentes foram seccionados com disco de carborundum, padronizando o comprimento dos espécimes em $12 \pm 0,5$ mm. Após, foi feito o desbridamento inicial com lima K #15, 20, 25, e 30. Para maior descontaminação dos espécimes, esses foram submetidos a um banho ultrassônico, imersos em NaOCl 1%, seguido com EDTA 17%, finalizado com soro fisiológico, 10 minutos para cada um. Após as raízes foram impermeabilizadas externamente com uma camada dupla de esmalte de unha vermelho, com tempo de secagem de 24 horas, para então serem autoclavados dentro de um microtubo de 2mL, contendo soro fisiológico estéril, para manter as amostras hidratadas.

b- Contaminação dos blocos

Os blocos foram inseridos em microtubos contendo 1ml de meio de cultura BHI e submetidos a um banho ultrassônico durante 15 minutos para que os espécimes se mantenham hidratados e para que o meio de cultura alcance máxima penetração nos túbulos dentinários.

Em seguida, foi realizada a contaminação com o *E. faecalis*, por um período de 5 dias, realizando trocas periódicas de forma asséptica, em ambiente estéril, trocando o meio de cultura por um meio novo, além de ciclos de centrifugação. Iniciando com a execução de culturas a partir de cepa congelada, primeiramente para tubos de ensaio com 3 ml de meio de cultura de BHI. Estes ficarão incubadas na estufa $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A partir desta cultura reativada, um frasco com meio de cultura, de volume maior para condução do experimento, foi contaminado, e aguardado na estufa por 24 horas.

No primeiro dia, a suspensão de *E. faecalis* foi padronizada a uma concentração de 3×10^8 UFC/mL, e armazenada na estufa por 7 horas, para que o microrganismo esteja na fase de crescimento exponencial durante a contaminação dos blocos. Enquanto isto, o caldo BHI, que foi usado no banho ultrassônico, foi removido do microtubo e descartado, e depois de 7 horas, 1 ml da suspensão foi inserido no interior do tubo de eppendorf. Os microtubos de eppendorf foram levados a centrifugação em quatro velocidades (1400g, 2000g, 3600g, 5600g), por duas vezes em cada uma destas, por 5 minutos, a 25°C .

Entre cada centrifugação, a suspensão de *E. faecalis* foi renovada, e ao finalizar a centrifugação, foi colocado nos microtubos, contendo os espécimes, uma solução estéril do BHI, para então serem incubados na estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas. Decorridas as 24 horas, foi trocado o caldo BHI por um novo esterilizado, e realizada outra centrifugação, porém apenas com a velocidade de 3600g, por 5 minutos, a 25°C .

No terceiro dia, foi repetido o protocolo do primeiro dia, e no quarto dia foi repetido o protocolo do segundo dia. Assim, no quinto dia os espécimes foram contaminados. (Figura 3)

Figura 3 A sequência das centrifugações (A= banho ultrassónico das amostras, B= as amostras com BHI, C= centrifugação com velocidade 1400g, D= centrifugação com velocidade 2000g, E= centrifugação com velocidade 3600g, F= centrifugação com velocidade 5600g)



c- Grupos de tratamento

Os espécimes receberam 5 grupos de tratamento, de modo que foram preenchidos com a pasta da NAC, NAC e o LASER, e Ca(OH)₂, e grupo LASER. Foi utilizado o protocolo explicado anteriormente. Após, os espécimes

foram imersos em microtubos contém 1 ml de água destilada, e aguardados em estufa $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após, os espécimes foram irrigados com soro fisiológico esterilizado para remover a medicação intracanal, e seccionados longitudinalmente por meio de disco diamantado de precisão em máquina de corte sob refrigeração, e depois o *smear layer* foi removida com os dentes emersos em EDTA 17% por 5 minutos, e depois os espécimes foram lavados com 500 μL de soro fisiológico esterilizado.

d- Análise da MEV

Utilizou-se 10 espécimes de dentina semicilíndricas (dois de cada grupo), que foram fixados em 4% de paraformaldeído. Os espécimes foram desidratados por concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90, 100%), secos usando um secador de ponto crítico, e por pulverização catódica revestido com ouro-paládio num evaporador de vácuo. A presença de bactérias nos túbulos dentinários foi observada por MEV com uma ampliação de 5000-10000 \times operando em 7-8 kV).

e- Análise por CLSM

Foram utilizados 20 espécimes de dentina semicilíndricas (quatro de cada grupo), os espécimes foram corados por 10 minutos com 30 μL do Kit para viabilidade bacteriana LIVE/DEAD[®] BacLight Bacterial Viability Kit L-7012 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), onde os corantes foram misturados numa proporção de 1:1. As bactérias que apresentaram membranas celulares intactas foram tingidas em verde, enquanto que as bactérias com membranas danificadas foram coradas de vermelho. Em cada espécime foram avaliadas

áreas aleatórias utilizando o CLSM (Leica TCS-SPECLSM, Leica Microsystems Inc., Heidelberg, Alemanha) usando uma lente de 40X.

ANEXO – Parecer do comitê de ética

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA (NAC) E TERAPIA FOTODINÂMICA NA INATIVAÇÃO DE BIOFILMES EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM ENTEROCOCCUS FAECALIS

Pesquisador: Amjad Abu Hasna

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 68960517.2.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa: Estou encaminhando o relatório final, para apreciação do CEP-ICT-CSJC-UNESP.

Data do Envio: 31/10/2017

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.398.364

Apresentação da Notificação:

adequada

Objetivo da Notificação:

relatório científico final

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

estão corretos

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

a notificação esta dentro dos padrões exigidos pelo comitê

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se aplica

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



Continuação do Parecer: 2.398.364

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não Há

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer da relatora.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Final	relatoriofinal.doc	31/10/2017 11:12:24	Amjad Abu Hasna	Postado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 24 de Novembro de 2017

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador)