

FRANCINE CRISTINA SILVA ROSA

**EFICÁCIA DA INSTRUMENTAÇÃO ASSOCIADA À TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA E MEDICAÇÃO
INTRACANAL NA ELIMINAÇÃO DE BIOFILMES E NA
NEUTRALIZAÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS
RADICULARES**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
DOUTOR, pelo Programa de Pós-
Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL,
Área Biopatologia Bucal**

FRANCINE CRISTINA SILVA ROSA

**EFICÁCIA DA INSTRUMENTAÇÃO ASSOCIADA À TERAPIA
FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA E MEDICAÇÃO
INTRACANAL NA ELIMINAÇÃO DE BIOFILMES E NA
NEUTRALIZAÇÃO DE ENDOTOXINAS EM CANAIS
RADICULARES**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em
BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal

Orientadora: Prof.^a Adj. Cristiane Yumi Koga Ito

São José dos Campos

2008

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Rosa, Francine Cristina Silva

Eficácia da instrumentação associada á Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares/ Francine Cristina Silva Rosa. __ São José dos Campos: [s.n.]; 2008.

175f.: il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientadora: Profª Adj Cristiane Yumi Koga Ito.

1. Microbiologia. 2. Terapia Fotodinâmica para desinfecção de canais radiculares. I. Koga-Ito, Cristiane Yumi. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 26/05/2008

Assinatura :

E-mail: franmicro@ufba.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rosa FCS. Eficácia da instrumentação associada á Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2008.

São José dos Campos, 26 de maio de 2008.

Banca examinadora

1. Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP
2. Prof. Tit. Antônio Olavo Cardoso Jorge
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP
3. Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP
4. Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves
Departamento de Odontologia
Universidade de Taubaté – UNITAU
5. Prof. Adj. Rubens Guimarães Filho
Departamento de Odontologia
Universidade de Taubaté – UNITAU

Dedico esta tese à Deus

“O senhor é meu pastor, nada me faltará.
Em verdes prados ele me faz repousar.
Conduz-me junto às águas refrescantes,
restaura as forças de minha alma.
Pelos caminhos retos ele me leva,
por amor de seu nome.” (Salmos 22, 1-3)

Uma oração especial, realizada incansavelmente com fé. Divulgá-la nesta
tese foi minha promessa pela graça alcançada...

A vós, S. José, recorremos em nossa tribulação e, depois de ter implorado o auxílio de Vossa Santíssima Esposa, cheios de confiança solicitamos também o Vosso patrocínio. Por este laço sagrado de caridade que Vos uniu à Virgem I maculada Mãe de Deus, e pelo amor paternal que tivestes ao Menino Jesus, ardentemente Vos suplicamos que lanceis um olhar benigno para a herança que Jesus Cristo conquistou com seu Sangue, e nos socorrais em nossas necessidades com o Vosso auxílio e poder. Protegei, ó Guarda providente da Divina Família, a raça eleita de Jesus Cristo. Afastai para longe de nós, ó Pai amantíssimo, a peste do erro e do vício. Assisti-nos do alto do céu, ó nosso fortíssimo sustentáculo, na luta contra o poder das trevas; e assim como outrora salvastes da morte a vida ameaçada do Menino Jesus, assim também defendei agora a Santa Igreja de Deus contra as ciladas de seus inimigos e contra toda adversidade. Amparai a cada um de nós com o Vosso constante patrocínio a fim de que, a Vosso exemplo e sustentados por Vosso auxílio, possamos viver virtuosamente, morrer piedosamente e obter no céu a eterna bem-aventurança.

A mém.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Paulo Villela Santos Junior, e do Vice Diretor Prof. Dr. José Roberto Rodrigues pela excelência técnica, científica e estrutural disponibilizada na realização do meu curso de Doutorado.

Ao Programa de Biopatologia Bucal, na pessoa da Coordenadora Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito, pelo inestimável apoio científico, administrativo e principalmente pela disponibilidade quando solicitei compreensão e ajuda para dar continuidade a jornada do meu curso de Doutorado.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, na grandiosidade e seriedade em tudo que executa. Para mim será sempre um privilégio ter sido parte do corpo docente deste conceituado Departamento. À todos professores, alunos e funcionários meu agradecimento e amizade.

A Prof. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito, minha orientadora, minha admiração e respeito pela profissional, pessoa, mãe e amiga que é. Quando simplesmente deveria ser professora, foi mestre, compartilhando comigo seus conhecimentos e experiências; quando deveria ser mestre, foi amiga e em amizade me compreendeu e me incentivou a seguir meu caminho. À esta grande mulher, minha maior expressão de agradecimento, que sempre será pouco diante do muito que me foi oferecido. Conhecer-te foi uma honra e ter sua amizade, uma dádiva de Deus.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, meu orientador de coração, agradeço por todo incentivo, apoio, compreensão e principalmente por ter me escolhido para compartilhar sua sabedoria, mesmo sabendo que este vôo dependeria de minhas próprias asas. Não só como amigo irei guardar-lhe do lado direito do peito, mas como grande mestre, pai na construção de minha ciência acadêmica, guardar-lhe-ei dentro do coração.

A Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, minha orientadora de coração, pessoa admirável que se disponibilizou com tanta doçura a compartilhar seus conhecimentos e me auxiliar na realização dos experimentos. Sua atenção e amizade foram essenciais para o êxito desta tese. O mais importante desta história é a amizade que nasceu entre nós. À você, meu mais sincero agradecimento e votos de felicidade na sua maternidade.

A Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha pela compreensão e apoio nas dificuldades durante toda a etapa do meu Doutorado, principalmente como coordenadora do programa. Seu carinho e amizade repercutiram na realização de mais este sonho em minha vida. Terminar o doutorado na UNESP-SJ dos Campos não era mais um sonho simplesmente, mas uma questão de honra.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, excelência Institucional, que apesar dos imensos desafios na consolidação das pesquisas em nosso país, consegue com muito apreço reconhecer e apoiar bons projetos no Estado de São Paulo. Agradeço o apoio financeiro imprescindível na realização desta tese.

A Empresa Brasileira de Radiação, pela disponibilidade em esterilizar os materiais utilizados nesse trabalho. Aproveito a oportunidade para ressaltar a importância do apoio de empresas sérias no apoio à ciência nesse nosso país... a

A Secretaria da Pós-Graduação, por conduzirem da melhor forma possível todos os passos para a realização do curso de Pós-graduação. Obrigada pelo apoio, por não medirem esforços para que mesmo de tão longe fosse possível o cumprimento de todas etapas burocráticas e também pela amizade.

A Silvia Scarpel, minha admiração pela seriedade e eficiência em tudo que faz. Levarei sempre comigo a lembrança de uma pessoa que faz a diferença para tornar os momentos conturbados do trabalho mais agradáveis por sua gentileza, prestatividade e acima de tudo, amizade.

A Profa. Lúcia e seu marido Prof. Daniel, da disciplina de Microbiologia na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, por todo amparo no momento mais difícil do meu curso de Doutorado, compartilhando comigo o laboratório de Microbiologia e materiais na realização do meu experimento. Jamais esquecerei tamanha atenção. Agradeço também pelo apoio e amizade em todos os momentos.

Ao Prof. Egberto Munin, da Universidade do Vale do Paraíba, pela assistência prestada nos assuntos relacionados ao equipamento laser. Agradeço a colaboração sempre que lhe foi solicitada.

A Secretaria da Saúde da Prefeitura Municipal de Vitória da Conquista, na pessoa da Sra. Luciana, coordenadora do posto de saúde

Panorama, por ter cedido o consultório e equipamentos para realização do experimento desta tese.

A Clínica Odontológica Max Dente, em Vitória da Conquista, por ter permitido a utilização de consultório e equipamentos para realização do experimento desta tese.

Ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, na pessoa da Diretora Dioneire Amparo dos Anjos e do Coordenador Acadêmico Adriano Maia, primeiramente pela oportunidade de pertencer ao quadro de docentes deste Instituto e pelo apoio prestado em todos os momentos em que foi necessária minha ausência para realização do meu curso de Doutorado.

Ao Prof. Antonio Carlos Ricardo Braga Junior, meu amigo e colega de trabalho no IMS/CAT-UFBA, agradeço imensamente sua inestimável ajuda na realização da estatística da minha tese. Admiro muito sua inteligência e prestatividade, mas acima de tudo a capacidade de fazer com que nos sintamos amigos em todos os momentos.

Ao Prof. Lucas Miranda Marques, meu amigo e colega de disciplina no IMS/CAT-UFBA, pela compreensão e apoio nas minhas ausências. Sua amizade foi essencial para que eu pudesse concluir meus experimentos enquanto assumia todas as minhas aulas.

Aos Professores do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, pelo apoio na concretização do meu sonho de terminar o curso de Doutorado na UNESP de São José dos Campos-SP. Agradeço imensamente a amizade e torcida constante.

A Lo-Ruana, Ana Paula e Noli pela colaboração auxiliando-me nos experimentos desta tese. Não esquecerei jamais a responsabilidade, seriedade e principalmente a amizade de todas vocês. Deus colocou anjos em minha vida, e vocês com certeza são um deles. Agradeço-lhes de todo meu coração.

Aos colegas de Pós-graduação Marta, Edna, Thaís, Graziela, Edson, Rose, Claudencil, Patrícia, Sílvia, Marcelo, Bruno, Flávio, Cristina, Fernando e Rogério por todo companheirismo nos momentos mais árduos e nos momentos felizes. Também por todo apoio, carinho e amizade. A convivência com todos vocês foi uma ótima fase da minha vida e tudo que é bom, dura o suficiente para se tornar inesquecível.

Ao Sérgio, técnico do laboratório de Microbiologia da UNESP de São José dos Campos-SP, por toda cooperação e amizade.

Aos amigos da Radiologia, Evelise, Jefferson, Lawrence, Carol, Milton e sua esposa Janaína, Patrícia, Gustavo, Sandra, David, Prof. Tit. Luiz César e Profa. Mari Eli pela sincera amizade e torcida. Sei que sou "agregada", como vocês mesmo gostam de me chamar, mas me sinto parte desta linda família chamada Radiologia UNESP- SJC. A vocês meu coração.

Aos meus familiares D. Leontina, S. Lasaro, Kátia, Andréia, César, Sérgio, Anselmo e sobrinhos Bruno, Victória e Rúbia, meus mais sinceros agradecimentos pela vibrante torcida em todas as fases do meu doutorado. O carinho de todos vocês foi especialmente importante na conquista deste meu sonho.

A minha irmã Priscila, fiel torcedora que me apoiou bastante nesta caminhada. Obrigada não apenas pela força, alegria e emoção compartilhada em todas as fases da minha vida, mas pelo amor incondicional. Você representa meu sentido de família e família é o bem mais precioso que temos.

Aos meus pais João e Fátima, primeiramente por me ensinarem o valor do amor em toda sua essência. Com eles eu aprendi que o amor é o sentimento mais importante na busca por todas as coisas. Agradeço por terem abdicado de tantos sonhos pela minha formação. Jamais esquecerei de todos obstáculos que me ajudaram a extrapolar na busca pelos meus ideais. A vocês, meus pais, devo minha vida e lhes dou meu coração. A vocês minha eterna gratidão.

Ao meu marido Luciano, minha homenagem mais especial, pela forma mais amável de ajuda que alguém pode receber na concretização de um sonho. A você que nunca mediu esforços para proporcionar a realização da minha tese de doutorado, que me compreendeu, me apoiou em todos momentos, foi companheiro, compartilhou alegrias e sofrimentos, chorou e sorriu ao meu lado, ficou sozinho a quilômetros de distância... a você, MEU AMADO, toda minha gratidão. Tudo foi possível pela imensidão do nosso amor.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	17
RESUMO.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Considerações microbiológicas das infecções endodônticas....	24
2.2 Aspectos endodônticos na eliminação microbiana.....	38
2.3 A importância da medicação intracanal no sucesso do tratamento endodôntico.....	41
2.4 Irradiação laser e aplicação na prática endodôntica.....	46
2.4.1 Terapia Fotodinâmica e atividade antimicrobiana em canais radiculares.....	53
3 PROPOSIÇÃO.....	61
4 MATERIAL E MÉTODO.....	62
4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	62
4.2 Preparo dos espécimes.....	62
4.3 Distribuição dos espécimes.....	65
4.4 Contaminação intracanal dos espécimes.....	66
4.5 Coleta do conteúdo do canal radicular.....	67
4.6 Tratamento dos espécimes com instrumentação, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal.....	69
4.7 Quantificação de endotoxinas.....	72
4.8 Análise estatística.....	75
5 RESULTADOS.....	77

5.1 Análise da efetividade antimicrobiana.....	77
5.2 Análise da neutralização de endotoxina	108
6 DISCUSSÃO.....	120
7 CONCLUSÕES.....	147
8 REFERÊNCIAS.....	148
Apêndice A.....	165
Apêndice B.....	166
Apêndice C.....	167
Apêndice D.....	168
Apêndice E.....	169
Apêndice F.....	170
Apêndice G.....	171
Apêndice H.....	172
Anexo A.....	173
Anexo B.....	174
<i>ABSTRACT</i>	175

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da distribuição de alguns tipos de lasers em seus respectivos espectros (nm) ⁶⁹	47
Figura 2 -	Ilustração do espécime preparado, a partir da secção da coroa dentária.....	63
Figura 3 -	Foto dos espécimes fixados em placa de cultura de célula de 24 poços.....	64
Figura 4 -	Fluxograma esquematizando as coletas nos grupos experimentais.....	69
Figura 5 -	(A) aparelho de emissão de irradiação laser Twin Laser-MM Optics; (B) painel de controle registrando o protocolo da irradiação utilizado no estudo; (C) foto mostrando o espécime preenchido com corante; (D) foto mostrando a inserção da fibra óptica no interior do canal radicular do espécime.....	71
Figura 6 -	Esquematização da montagem da placa de cultura de célula de 96 poços para realização do teste cinético cromogênico.....	73
Figura 7 -	(A) Leitor cinético cromogênico QCL; (B) leitor cinético cromogênico QCL acoplado ao microcomputador.....	74

Figura 8 -	(A) Foto do reagente LAL; (B) foto da distribuição do reagente LAL nos poços da placa contendo amostras dos espécimes.....	74
Figura 9 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste dos espécimes contaminados com <i>Candida albicans</i>	79
Figura 10 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=0,5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com <i>Candida albicans</i>	81
Figura 11 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com <i>Enterococcus faecalis</i>	83
Figura 12 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com <i>Enterococcus faecalis</i>	85

Figura 13 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste dos espécimes contaminados com <i>Escherichia coli</i>	88
Figura 14 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com <i>Escherichia coli</i>	89
Figura 15 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de <i>Candida albicans</i> nas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados.....	92
Figura 16 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de <i>Candida albicans</i> nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados..	94
Figura 17 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de <i>Candida albicans</i> nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.....	96

Figura 18 -	Gráfico demonstrando os resultados para <i>Enterococcus faecalis</i> obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.....	98
Figura 19 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de <i>Enterococcus faecalis</i> nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.....	100
Figura 20 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de <i>Enterococcus faecalis</i> nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.....	102
Figura 21 -	Gráfico demonstrando os resultados para <i>Escherichia coli</i> obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.....	104

Figura 22 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de <i>Escherichia coli</i> nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.....	106
Figura 23 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de <i>Escherichia coli</i> nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.....	108
Figura 24 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com <i>Escherichia coli</i>	111
Figura 25 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com <i>Escherichia coli</i>	112

Figura 26 -	Resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.....	115
Figura 27 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.....	116
Figura 28 -	Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	=	porcentagem
λ	=	comprimento de onda
\pm	=	mais ou menos
®	=	marca registrada
°C	=	graus Celsius
AsGaAl	=	arseneto – Gálio – Alumínio
ATCC	=	American Type Culture Collection
cel./mL	=	células por mililitro
CO ₂	=	dióxido de carbono
D.O.	=	densidade óptica
EBV	=	vírus Epstein-Barr
EMBRARAD	=	Empresa Brasileira de Radiação
Endo-PTC	=	peróxido de Uréia, tween 80 e carbowax associados
Er:YAG	=	érbio-Ítrio-Arsênio-Gálio
ErCr:YSGG	=	érbio-Crômio-Ítrio-Escândio-Gálio-Garnet
UE/mL	=	Unidade de endotoxina por mL
g	=	grama
h	=	hora
HeNe	=	hélio-Neônio
HIV	=	vírus da imunodeficiência humana
Ho:YAG	=	hólmio-Ítrio-Arsênio-Gálio
IL	=	interleucina
LAL	=	lisado de amebócito de limulus
LPS	=	lipopolissacarídeo
min	=	minuto

mL	=	mililitro
mm	=	milímetro
mV	=	milivolt
mW	=	miliwatts
n°	=	número
Nd:YAG	=	neodímio-Ítrio-Arsênio-Gálio
nm	=	nanômetro
PDT	=	Photodynamic Therapy, terapia fotodinâmica
pH	=	potencial de hidrogênio iônico
PMN	=	Polimorfonuclear
QCL	=	teste cinético cromogênico
spp.	=	espécie
TNF	=	fator de necrose tumoral
UFC/g	=	unidade formadora de colônia por grama
UFC/mL	=	unidade formadora de colônia por mililitro
UTI	=	unidade de terapia intensiva
W	=	watts
µL	=	microlitro
µm	=	micrômetro

Rosa FCS. Eficácia da instrumentação associada à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

RESUMO

O uso de radiação laser como método de desinfecção intracanal diante de microrganismos persistentes à terapia convencional e endotoxinas, que representam um dos principais agentes etiológicos envolvidos na patogênese das lesões periapicais, tem sido estudada atualmente. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficácia da instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser de baixa potência e corante azuleno, na eliminação de biofilmes intracanal monoespécies de *Candida albicans* ATCC 18804, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e de biofilmes multiespécies desses microrganismos associados, e na neutralização de endotoxinas do sistema de canais radiculares. Foi também objetivo deste estudo analisar a efetividade da medicação intracanal de clorexidina gel 2%, associada à polimixina B, sobre microrganismos e endotoxinas remanescentes do tratamento com instrumentação e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Foram utilizadas 80 raízes de dentes humanos unirradiculados padronizadas em 16mm e devidamente preparadas. Os espécimes foram contaminados e incubados por 14, 21 ou 28 dias respectivamente para *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e os microrganismos associados. No grupo contaminado com *Escherichia coli* foi também verificada a neutralização de endotoxinas. Após período de incubação, foi realizada uma coleta do conteúdo intracanal que foi semeada em meio de cultura seletivo para cada espécie. Os dentes foram instrumentados (Kerr 35-80) e, a seguir, a associação do corante azuleno 25% com Endo-PTC foi inserida no interior do canal e os espécimes foram irradiados com laser AsGaAl por 3 minutos. Subseqüentemente foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular, sendo uma imediatamente após a instrumentação e Terapia Fotodinâmica e outra após 7 dias. Em seguida, os canais receberam como medicação intracanal, uma associação de polimixina B com clorexidina gel 2% por 14 dias. Nos grupos contaminados por *Escherichia coli* foram também verificadas a neutralização de endotoxina pelo teste cinético cromogênico. Foram inseridos grupos controle que foram instrumentados, entretanto não receberam tratamento com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, mas receberam medicação intracanal. Os dados pareados de mesma unidade amostral, obtidos na análise microbiológica (UFC/mL) e na análise de neutralização de endotoxina (EU/mL), foram submetidos ao teste estatístico de Wilcoxon (5%) e os dados não pareados ao teste de Mann-Whitney (5%). Concluiu-se que foi verificada efetividade da instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* no caso dos biofilmes intracanal monoespécie, entretanto não foi verificada efetividade da instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente aos microrganismos e neutralização de endotoxinas no caso dos biofilmes intracanal multiespécies. Foi possível concluir também que a utilização da medicação intracanal de clorexidina gel 2% associada a polimixina B não promoveu total neutralização de endotoxina de *Escherichia coli* em biofilmes intracanal monoespécie e multiespécie, mas apresentou significativa efetividade sobre os microrganismos estudados.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia Fotodinâmica; Endodontia; laser; desinfecção

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são os principais agentes etiológicos das infecções endodônticas, sejam pulpareas ou periapicais, sendo o controle e eliminação desses microrganismos de extrema importância durante todo tratamento endodôntico^{2, 3, 25, 27, 70 e 134}. Além disso, é também objetivo do tratamento a prevenção da reinfecção do canal radicular^{8, 66 e 91}.

As bactérias presentes nos canais radiculares podem colonizar os túbulos dentinários e canais acessórios, dificultando a eliminação pela instrumentação e pelo uso de soluções irrigadoras^{27 e 51}. Além disso, bactérias remanescentes dentro do sistema de canais radiculares não são acessíveis à defesa do hospedeiro ou à administração sistêmica de agentes antimicrobianos^{27 e 51}.

Desde o final do século XIX, com os achados científicos sobre as infecções pulpareas, tornou-se indispensável a realização do preparo químico-mecânico, a fim de promover a eliminação de microrganismos, seus subprodutos e tecidos necrosados, auxiliados por solução química irrigadora que, além de maximizar a remoção destes detritos, também promove ação antimicrobiana^{101 e 104}. Entretanto, apesar do conhecimento sobre efetividade antimicrobiana de diversas soluções irrigadoras¹⁰¹, alguns estudos têm demonstrado que existem inúmeros casos de insucesso do processo de limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares^{8, 27, 85 e 87}.

Assim, embora os procedimentos de limpeza, saponificação e instrumentação dos canais radiculares sejam efetivamente importantes na eliminação dos microrganismos que infectam

os canais, a total eliminação dos microrganismos e seus produtos é ainda muito difícil na maioria dos casos^{8 e 27}, principalmente pela colonização de espécies como *Candida albicans* que, juntamente com outros microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, têm sido consideradas espécies mais resistentes das infecções endodônticas, possíveis causadores de falhas em alguns tratamentos^{8, 27, 38, 51, 87, 89 e 110}.

Observa-se na literatura, que *Enterococcus faecalis* está presente em pequena porcentagem na infecção endodôntica inicial, estando mais associado a falhas no tratamento de dentes com canais obturados^{25, 52, 63, 110, 126 e 134}. Os estudos evidenciam também a alta prevalência de isolados de *Enterococcus faecalis* em dentes comprometidos endodonticamente com lesões periradiculares associadas, sugerindo ser uma das espécies envolvida na patogênese das lesões recorrentes^{27, 51 e 134}.

Na atualidade, a presença de bactérias Gram-negativas nas infecções endodônticas é também preocupante. Essas bactérias apresentam endotoxinas na membrana externa da parede celular, que são complexos lipopolissacarídicos (LPS) com potente ação citotóxica, liberadas durante sua duplicação ou morte celular, representando o principal fator de virulência dessas bactérias⁸³. Estudos têm sugerido que as endotoxinas são os principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da inflamação pulpar e periapical^{46 e 77}.

Observa-se que já existe a preocupação em implementar técnicas e substâncias em endodontia, que tenham atividade na neutralização de endotoxinas, além dos outros requisitos, como boa atividade antimicrobiana e biocompatibilidade^{59, 99, 112 e 124}. É fato notório que existe na especialidade da Endodontia, uma premente necessidade de utilização de métodos terapêuticos que possam aumentar a eficácia do procedimento endodôntico em todas suas fases, diminuindo etapas clínicas, períodos de tempo de trabalho, possibilitando qualidade maior no tratamento⁸².

Nessa busca, encontra-se respaldo os novos protocolos de medicação intracanal, cujo objetivo está vinculado a eliminação de microrganismos do sistema de canal radicular promovendo aumento do sucesso da terapia endodôntica. A medicação intracanal também tem sido empregada com intuito de redução do processo inflamatório, minimização de algias e como auxiliar no processo de reparação dos tecidos acometidos⁵³.

O protocolo que ainda mais se utiliza como medicação intracanal é à base de hidróxido de cálcio, seja o composto utilizado como fórmula única ou associado a outros medicamentos^{8, 30, 36 53, 70, 90 e 126}. Entretanto, observa-se uma crescente preocupação com a utilização de medicações alternativas ao hidróxido de cálcio que sejam efetivas sobre microrganismos alcalino-resistentes, fungos, vírus e outros que estão emergindo como patógenos potenciais, e que ainda demonstrem atividade sobre endotoxina de bactérias Gram-negativas^{30, 37, 53 e 90}. Estudos atuais mencionam também a importância da medicação intracanal na neutralização de endotoxinas⁷⁰.

O uso da clorexidina na endodontia é proposto na forma de solução irrigante e como medicação intracanal, por sua atividade comprovada sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas³⁶. Outro fato importante, é que poucos são os estudos que demonstram preocupação em investigar a capacidade de medicamentos, como a polimixina B, que sejam capazes de surtir efeitos na inativação de endotoxina, uma propriedade de relevância em uma medicação intracanal.

Talvez de todas as inovações tecnológicas passíveis de aplicação na terapia endodôntica, a utilização do laser associado à terapia convencional seja a mais promissora das novidades neste tipo de tratamento⁹⁶.

Estudos recentes viabilizam a aplicação do laser na endodontia como método coadjuvante na remoção de restos dentinários⁵,

96, 106 e 107, na redução de algias pós-tratamento endodôntico³⁵, no aumento da permeabilidade dentinária, na estimulação da reparação do tecido periapical e, sobretudo como um importante aliado na desinfecção do complexo sistema de canais radiculares^{24, 32, 96, 92, 106, 107 e 122}.

Na Endodontia, a utilização do laser associado a um corante com características fotossensibilizadoras, chamada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana ou PDT (Photodynamic Therapy), tem sido recentemente explorada em diferentes estudos^{33, 66 e 122}. O interesse pela utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Endodontia está relacionada principalmente pelo efeito antimicrobiano comprovadamente constatado desta terapia, por não promover resistência microbiana, ser uma técnica de fácil aplicação, indolor, além de somar a todas essas características, os efeitos benéficos oriundos da terapia com laser, como bioestimulação, analgesia e seu aspecto antiinflamatório, importantes condições para o sucesso de todas as fases do tratamento endodôntico^{5, 31, 35, 61, 96, 106 e 122}. Na cavidade bucal, a eficiência, o baixo custo, ausência de efeitos sistêmicos e de aumento da resistência microbiana aos medicamentos, indica esta terapia como uma importante alternativa terapêutica às formas convencionais de tratamento^{34, 39, 96 e 106}.

O estudo do efeito da radiação laser intracanal na desinfecção dos túbulos dentinários é oportuno, sendo necessário o desenvolvimento de modelos experimentais que permitam a demonstração dos efeitos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, diante de microrganismos persistentes à terapia convencional, assim como os efeitos desta terapia na neutralização de endotoxinas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura é concordante quando o assunto é evidenciar que os agentes microbianos são essenciais na propagação e perpetuação de doenças infecciosas pulpares e periapicais, embora fatores químicos e físicos possam também induzir processos inflamatórios endodônticos^{2, 8, 25, 27, 32, 36, 37, 49, 51, 53, 57, 63, 70, 81, 82, 91, 96, 110, 112, 121 e 134}. Os microrganismos e seus subprodutos são considerados agentes etiológicos de várias doenças pulpares e periapicais, sendo de grande importância todos os aspectos do tratamento endodôntico que envolvam eliminação dos microrganismos, assim como o estudo dos agentes infecciosos envolvidos no processo infeccioso do canal radicular. Os estudos desses contribuem para a validação das técnicas endodônticas, melhorando o desempenho do tratamento, aumentando possibilidades de sucesso no emprego das técnicas^{2, 3, 8, 25, 66, 70, 91 e 134}.

2.1 Considerações microbiológicas das infecções endodônticas

Os microrganismos podem alcançar túbulos dentinários expostos por lesões cáries, por superfícies dentárias desgastadas e por trincas de esmalte relacionadas a traumas dentários. Dentre os acessos microbianos aos túbulos dentinários, pode-se incluir também exposição dos canais acessórios e do forame apical na doença periodontal, procedimentos restauradores, via hematogênica (anacorese) e exposição pulpar direta. Além destes o comprometimento do selamento oclusal, restaurações inadequadas de dentes previamente tratados, assim como a

extensão periapical de uma lesão que se origina no dente adjacente infectado, podem ser vias de acesso ao sistema de canais radiculares^{9, 84, 100}.

Embora tenha sido identificadas mais de 500 espécies microbianas de isolados da cavidade bucal, apenas um número aproximado de 150 espécies já foram relatadas de amostras provenientes do sistema de canais radiculares, sendo que individualmente os canais radiculares são colonizados por cerca de 5 a 7 espécies diferentes³⁷. Destas, algumas espécies sobrepõe-se a outras quanto à capacidade de sobreviverem e multiplicarem-se neste ambiente³⁷. As espécies microbianas que colonizam o sistema de canais radiculares são variáveis e dependem de fatores como: nutrição, baixo potencial de óxido redução, pH, temperatura, interações positivas e negativas entre os microrganismos, além dos mecanismos de defesa do hospedeiro e presença de agentes antimicrobianos e inibidores. Outros fatores como presença de polpa necrótica e interações bacterianas estão também relacionados com a predominância de determinadas espécies na infecção do canal radicular⁸¹.

Na infecção endodôntica inicial, a presença de fatores nutricionais como carboidratos, glicoproteínas, aminoácidos e proteínas favorecem colonização de microbiota sacarolítica, cujos gêneros *Prevotella*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* são freqüentemente associados e encontrados neste período e subseqüentemente, com o esgotamento de nutrientes como carboidratos e glicoproteínas, ocorre transição para microbiota proteolítica. O aumento da fermentação de aminoácidos e peptídeos para a obtenção de energia favorece a colonização de espécies como *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium* e *Fusobacterium nucleatum*. Com o cessar das fontes nutricionais existentes nos fluidos teciduais, bactérias que hidrolisam proteínas, como *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. e *Actinomyces* ssp., assumem importante posição nas infecções mistas fornecendo peptídeos utilizados por espécies dos gêneros *Eubacterium* e

Fusobacterium, que não possuem a capacidade de clivagem de proteínas⁹.

Nas infecções endodônticas primárias a presença de espécies distintas colonizando o sistema de canais radiculares determina a característica polimicrobiana desta condição, com predomínio de anaeróbios Gram-negativos. Nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, o processo infeccioso, com o envolvimento de poucas espécies, não exhibe as mesmas características das infecções primárias. Nestes casos, de infecções endodônticas secundárias, há colonização predominante de anaeróbios Gram-positivos^{23, 53, 110}.

A demanda de oxigênio também determina a composição da microbiota endodôntica. Estudos sobre a dinâmica das infecções endodônticas mostram que existe uma relativa proporção de microrganismos facultativos na fase inicial, em que o oxigênio está presente em grande quantidade nos tecidos. Com o início da necrose tecidual, a tensão de oxigênio é reduzida pela ausência da microcirculação e ocorre uma proporcional diminuição de bactérias anaeróbias facultativas com um concomitante aumento das anaeróbias estritas. Este fato deve-se principalmente pelo aumento da consumação de oxigênio, criando condições restritas do mesmo, sustentando o crescimento da microbiota anaeróbia estrita^{25 e 70}.

Embora o favorecimento das espécies anaeróbias estritas seja fato consolidado na dinâmica da infecção endodôntica, estudos na literatura mencionam que bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes, inclusive à atividade dos antimicrobianos, do que os anaeróbios estritos, o que favorece a persistência desses, mesmo após terapia endodôntica^{9 e 121}. Os microrganismos anaeróbios facultativos, como *Enterococcus* spp., podem permanecer em fase latente, com uma baixa taxa metabólica por um período de tempo, mas mudanças ambientais, como uma infiltração coronária, podem levar a ativação destes microrganismos e conseqüente proliferação dos mesmos⁹. Justamente por todas características e fatores de resistência que

permitem envolvimento de *Enterococcus* spp. com os casos mais complicados, é que os estudos em Endodontia se preocupam em empregar a espécie na avaliação de seus métodos^{2, 25, 27, 28, 36, 51, 60, 63, 68, 70, 74, 85, 91, 95, 121 e 134}.

Um grande corpo de evidências científicas indica que da espécie *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* é freqüente nos casos de infecções endodônticas persistentes e secundárias, e aquelas associadas com falhas no tratamento^{25, 63, 84, 110, 126 e 134}. A presença de *Enterococcus faecalis* influencia também o prognóstico do tratamento endodôntico, sendo sempre associada a prognósticos pouco favoráveis^{2, 27, 29, 30, 63, 68, 85, 91, 106, 110, 123 e 134}. Os estudos evidenciam também a alta prevalência de isolados de *Enterococcus faecalis* em dentes comprometidos endodonticamente com lesões periradiculares associadas, sugerindo ser a espécie envolvida na patogênese das lesões recorrentes^{27, 52 e 134}. Johnson et al.⁵¹ mencionaram em seus estudos que praticamente todos casos radiograficamente identificados com periodontite apical possuem isolados de *Enterococcus faecalis*.

Observa-se na literatura, que *Enterococcus faecalis* parece estar presente em pequena porcentagem na infecção endodôntica inicial e em grande parte relacionado também com falhas no tratamento de dentes com canais obturados^{25, 51, 63, 110, 126 e 134}. Segundo Al-Hezaimi et al.², *Enterococcus faecalis* permanecem viáveis, mantendo a capacidade de invasão dos túbulos dentinários e capacidade de adesão ao colágeno na presença de soro humano, sendo estes importantes fatores de virulência para a sobrevivência no sistema de canais. Vivacqua-Gomes et al.¹²¹, em estudo sobre recuperação de *Enterococcus faecalis* após tratamento endodôntico em única ou múltiplas sessões, além de observarem que não existe diferença na contagem da espécie entre os tipos de tratamento, relatou que mesmo após 60 dias de selamento do canal *Enterococcus faecalis* continua viável no interior dos túbulos dentinários. Além destes aspectos, a resistência a diversos medicamentos antimicrobianos usados no tratamento endodôntico e a resistência ao

hidróxido de cálcio por suas características alcalino-tolerantes, são fundamentais no favorecimento da sobrevivência de *Enterococcus faecalis* pós-tratamento endodôntico^{2, 27, 110 e 121}.

Enterococcus faecalis são cocos Gram-positivos, que podem ser encontrados isolados, em pares, ou formando pequenas cadeias. São bactérias anaeróbias facultativas, possuindo habilidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio. A espécie *Enterococcus* vive em vasta quantidade (10^5 - 10^8 UFC/g de fezes) no intestino humano e nas circunstâncias normais não causam dano ao hospedeiro. Estão presentes no aparelho genital feminino e na cavidade bucal de alguns indivíduos¹¹⁰. São microrganismos resistentes por sobreviverem em condições ambientais extremas, incluindo elevada alcalinidade ($\text{pH} > 9,6$) e concentração de salinidade. São resistentes aos sais biliares, detergentes, metais pesados, etanol, ácidos e a dessecação¹¹⁰. Segundo Johnson et al.⁵¹, *Enterococcus faecalis* apresenta elevada taxa de sobrevivência, podendo manter-se viável no sistema de canais radiculares por até 12 meses. Vivaqua-Gomes et al.¹²¹ menciona que a espécie pode ser detectada até 700 μm no interior dos túbulos dentinários após 70 dias de incubação.

Mesmo sendo membros da microbiota normal do trato intestinal, são também encontrados nas mucosas de outros tratos, embora em menor concentração¹¹⁷. As concentrações de amostras desta bactéria nas mucosas podem variar em função da influência de alguns fatores como antibióticoterapia, cirurgias, imunocomprometimento entre outros. No caso da cavidade bucal. Stuart et al.¹¹⁰ comentam que a presença de *Enterococcus faecalis* apresenta-se aumentada em amostras bucais dos pacientes em tratamento endodôntico inicial, no meio do tratamento e aqueles em situação de retratamento, quando comparados com os indivíduos que não estão sendo submetidos ao tratamento endodôntico^{63 e 110}. Quando presentes, a possibilidade de infecções com *Enterococcus faecalis* surgem quando são translocados para órgãos ou locais sensíveis¹¹⁷. Segundo Stuart et al.¹¹⁰, estas bactérias podem se

translocar do sistema de canal radicular para os nódulos linfáticos, sugerindo esta como uma provável rota da patogênese de infecção oportunistas nos pacientes.

Na literatura observa-se que em diversos estudos clínicos, a fase de preparo químico-mecânico, assim como a utilização de agentes antimicrobianos intracanal não são totalmente efetivas na eliminação de *Enterococcus faecalis* do canal radicular²⁷. Por estas características, nota-se que a eliminação total dos microrganismos do sistema de canais radiculares é um procedimento de dificuldade extrema, embora seja impreterivelmente necessário para o sucesso do tratamento^{51 e 68}.

Recentemente, as investigações por métodos moleculares têm sido utilizadas, com muita frequência, na determinação concisa da microbiota relacionada com infecções endodônticas. Por estas técnicas têm-se observado a grande prevalência do envolvimento de *Enterococcus faecalis* com infecções endodônticas, principalmente nos casos identificados com falhas no tratamento^{2, 106 e 134}.

Alguns produtos de *Enterococcus faecalis* são postulados como seus principais fatores de virulência. As evidências são maiores com relação a citolisina e substância agregativa. Quanto a citolisina, uma exoproteína com atividade lítica para eritrócitos e outras células humanas, é produzida por 60% das amostras clínicas patogênicas e sua presença está associada com as infecções mais graves. A substância agregativa é uma proteína de superfície que promove a agregação das células de *Enterococcus faecalis* durante a conjugação propiciando a transferência de plasmídios¹¹⁷. Estas bactérias apresentam outros fatores de virulência incluindo ácidos lipoteicóicos que auxiliam em sua relação com o processo da infecção endodôntica¹¹⁰. Alguns estudos na literatura mostram que para o processo de aderência na célula hospedeira, há expressão de proteínas que competem com outras células bacterianas, e com a resposta imunológica do hospedeiro^{27, 30 e 110}. A associação de seus fatores de virulência, e sua resistência aos antimicrobianos contribuem de forma peculiar em sua habilidade de provocar doenças¹¹⁰.

Nos diversos estudos em endodontia é notável a preocupação de técnicas, materiais e substâncias antimicrobianas que sejam efetivas frente a *Enterococcus faecalis*^{2, 27, 29, 30, 63, 68, 85, 91, 106, 110, 123, 126 e 134}. Observa-se na literatura o cuidado que os autores demonstram em instituir soluções irrigantes que aumentam a eliminação microbiana do canal radicular e que facilitem a remoção de resíduos teciduais, materiais obturadores com melhor capacidade de vedamento e com características antimicrobianas, a melhora dos medicamentos utilizados como curativo de demora, a associação destes medicamentos na tentativa de potencializar a atividade destes medicamentos, e o aprimoramento de técnicas visando o aumento da eliminação antimicrobiana do canal radicular^{2, 25, 27, 33, 51, 68, 110 e 134}. Em todos estes estudos, a efetividade sobre *Enterococcus faecalis* é fator determinante do sucesso seja da técnica, seja das substâncias estudadas.

O envolvimento dos fungos em doenças endodônticas, principalmente *Candida albicans*, são relatados^{1, 3 e 38}. Os fungos têm sido detectados em infecções dos canais radiculares, embora o número destas células nos canais radiculares seja geralmente menor que o de células bacterianas. Gomes et al.³⁷ em estudo sobre a microbiota dos canais radiculares, atentam para o aumento da prevalência de microrganismos pouco comuns em infecções endodônticas em isolados dos canais radiculares, como *Candida* spp., citomegalovírus humano e vírus Epstein-Barr (EBV).

Nas últimas décadas, a incidência de *Candida albicans* em infecção endodôntica teve maior atenção, sendo observada em infecções endodônticas primárias e refratárias⁸⁹. Nos casos de lesões periapicais persistentes ao tratamento endodôntico que após período de proervação, são chamadas de lesões refratárias, e apresentam uma microbiota diferente daquela dos dentes com necrose pulpar e lesão periapical não tratados, também pode-se evidenciar a presença de fungos¹⁰⁰.

Na cavidade bucal, a espécie *Candida albicans* é predominante, constituindo, 60 a 70% do total de isolamentos deste sítio. Estas estão relacionadas com dois tipos de infecção sendo a mais comum a candidose oral, que se apresenta como uma invasão subepitelial com formação de pseudomembrana. Uma variedade de condições de imunocomprometimento está associada com tratamento do câncer, diabetes, transplante de órgãos, nascimento prematuro, várias imunodeficiências de células T, incluindo infecção por HIV, e uso de corticosteróides que interferem na regulação imunológica favorecendo a manifestação da virulência dos fungos. *Candida albicans* é um fungo de grande versatilidade, que pode adaptar-se a diferenças nas condições de pH, mudanças de expressões gênicas em resposta ao meio ambiente, aderência a várias superfícies, produção de enzimas degradativas e mudanças morfológicas para invasão tecidual^{89 e 76}.

A espécie *Candida albicans*, juntamente com outros microrganismos como *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, tem sido considerada espécie resistente nas infecções endodônticas e possível causadora de falhas nos tratamentos^{8, 27, 38, 51, 87, 89 e 110}. Esta resistência tem sido atribuída aos fatores de virulência de *Candida albicans* como dimorfismo, adesinas, produção de enzimas fosfolipases e proteinases¹¹⁷. Segundo Muni et al.⁷⁶, a formação de tubo germinativo é um fator importante de virulência de *Candida albicans*. Radcliffe et al.⁸⁷ relataram que existem poucas informações a respeito da persistência e sobrevivência dos microrganismos após o término do tratamento endodôntico. Segundo estes autores, *Candida albicans* está associada com casos clínicos de persistência da infecção endodôntica e com casos de falhas no tratamento. Tem-se estendido às espécies de *Candida*, significativa persistência nas infecções periapicais. Entretanto, o mais significativo é que quando a espécie está presente, dificilmente há uma resposta efetiva à limpeza convencional, um procedimento que elimina, em grande parte, os outros microrganismos^{87 e 89}.

Na literatura, os autores mencionaram isolados de *Candida albicans* em torno de 21% das amostras provenientes de canais radiculares e alguns observaram microrganismos com características de leveduras em canais de dentes obturados relacionados com falhas^{1, 3, 87 e 101}. Fungos na forma de levedura foram encontrados ao longo da parede do canal radicular, em 40% dos casos como uma célula simples esférica e oval, geralmente com quatro a seis μm de diâmetro^{87, 89 e 100}.

O aumento no interesse em relacionar *Candida albicans* com as infecções endodônticas, particularmente em infecções secundárias e persistentes associadas com falhas da terapia endodôntica, está mais voltado ao fato de que *Candida albicans* foi comprovadamente resistente a algumas medicações e substâncias químicas comumente empregadas na endodontia, incluindo hidróxido de cálcio associado a diferentes veículos¹⁰¹.

A presença de fungos relacionados as infecções endodônticas podem ocorrer em casos em que não houve tratamento, mas os fatores exatos que afetam a colonização dos canais radiculares por espécies fúngicas, ainda não estão totalmente elucidados^{3, 89 e 100}. Existem especulações de que, entre as possibilidades, a colonização por fungos possa ocorrer devido contaminação durante o tratamento, possibilidade de diferenças na susceptibilidade da microbiota em infecções do canal radicular com a utilização de diferentes medicações intracanal empregadas no tratamento endodôntico e, ainda, administração de antibióticos sistêmicos, o que poderia facilitar o seu crescimento¹⁰⁰. Sugere-se que a redução de cepas específicas de bactérias intracanal durante o tratamento endodôntico permite o sobre crescimento de fungos e diminuição dos nutrientes no ambiente³. Adicionalmente, os fungos também podem ter acesso ao interior do canal via cavidade bucal, como resultado de ausência ou ineficiência da assepsia da técnica durante o tratamento, ou ainda por exposição do canal ao meio bucal diante de uma abertura coronária^{3, 70, 87 e 89}.

Os casos de aumento da resistência de *Candida albicans* aos agentes antifúngicos e antimicrobianos nos últimos anos é um dos fatores que podem estar relacionados à presença de fungos nos canais radiculares^{20, 58 e 76}. Estudos têm demonstrado que hidróxido de cálcio, substância de atividade antimicrobiana de eficácia comprovada em endodontia, não é totalmente efetivo frente a *Candida albicans* e outros microrganismos, particularmente relacionados com casos de insucesso na terapia endodôntica. Este fato justifica o aparecimento de estudos que lançam mão da associação de medicações para tratamento endodôntico, assim como a associação de técnicas^{2, 3, 8, 38, 70, 89, 101, 106, 109, 115 e 126}.

As características referentes a infectividade de *Candida albicans* no canal radicular desperta para a real necessidade de estudos que avaliem o potencial antimicrobiano das inúmeras técnicas e medicações que vem despontando como viáveis de utilização na terapia endodôntica.

A colonização de bacilo Gram-negativo na cavidade bucal tem sido bastante associada a pacientes imunocomprometidos, sendo que a boca pode constituir foco para infecções sistêmicas relacionadas a essas bactérias e para infecções locais como mucosite e infecções endodônticas⁵⁵.

Bactérias anaeróbias Gram-negativas são predominantes na colonização polimicrobiana do sistema de canais radiculares nas infecções endodônticas primárias^{23, 53 e 110}. Essas bactérias são freqüentemente isoladas de canais radiculares ou lesões periapicais, cuja presença está relacionada com sintomatologia clínica e presença de exudação purulenta⁴⁹.

Dentre as bactérias Gram-negativas envolvidas com infecções endodônticas destaca-se *Escherichia coli*, por seus fatores de virulência tão bem estabelecidos. Várias estruturas celulares desta bactéria, como flagelos e cápsulas conhecidos respectivamente como antígenos H e antígenos K, e a molécula de lipopolissacarídeo (LPS) que contém antígeno O representam as estruturas imunogênicas relacionadas

com a virulência da espécie. O lipídio A e o peptídeoglicano são também fatores de virulência associados à febre e manifestações clínicas gerais¹¹⁷.

O lipopolissacarídeo, também conhecido como endotoxina, é uma estrutura encontrada na parede de todas bactérias Gram-negativas, são compostas por polissacarídeos (açúcares polimerizados), lipídios (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas, estabelecendo a nomenclatura de lipopolissacarídeo (LPS) pela ênfase de sua estrutura química. Lipídio A é uma região da molécula de endotoxina responsável por seus efeitos tóxicos. Em 1993, Raetz publicou uma breve revisão sobre a síntese do lipídio A, e classificou as endotoxinas como lipídios extraordinários^{81 e 82}.

Outro importante fator de virulência de bactérias Gram-negativas é a habilidade de secretar proteases, que podem contribuir na patologia da lesão pela degradação da matriz proteica prejudicando a integridade tecidual. Algumas enzimas podem até degradar componentes do sistema de defesa do hospedeiro como anticorpos, citocinas, entre outros⁵⁴.

Quanto à importância de bactérias Gram-negativas no processo de infecção em endodontia, está relacionada principalmente com a liberação de endotoxina. As bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, são comumente encontradas na cavidade bucal. Quando ocorre morte dessas bactérias, as células sofrem rompimento e há liberação de endotoxinas^{93 e 99}.

Essas bactérias podem alcançar a região intracanal principalmente quando a polpa dentária fica exposta à cavidade bucal por processos cariosos ou traumas coronários⁵⁹. Muitos estudos que relacionam a endotoxina na infecção pulpar e periapical demonstram que são provenientes de bactérias Gram-negativas viáveis que podem se fixar no canal radicular e quando morrem por ação da medicação intracanal, liberam endotoxina promovendo respostas dos tecidos periapicais^{59, 81, 82, 93, 82, 93, 99, 112 e 124}. Além disso, podem ser liberadas durante o tratamento

endodôntico como resultado da morte de bactérias Gram-negativas durante a instrumentação⁹³.

As endotoxinas são portanto, importantes no envolvimento, progressão e patogenicidade, principalmente de lesões periradiculares¹²⁴. São agentes biológicos potentes, oriundos da membrana celular de bactérias Gram-negativas, liberados na função de mediador imunológico em conjunção de um rompimento celular^{93 e 124}. Em geral, são responsáveis por patogenicidade local e generalizada, reações inflamatórias primárias na pele, efeitos hemodinâmicos e vasculares, aborto, imunotolerância, entre outros⁹³.

Dr. Herbert Schilder obteve seu maior reconhecimento quando realizou o primeiro e clássico artigo sobre o envolvimento da endotoxina com os problemas endodônticos na edição inaugural do “Journal of Endodontics”⁴⁷. Foi o primeiro a detectar e quantificar os níveis de endotoxina em dentes com problemas endodônticos, associando pioneiramente endotoxina e problemas endodônticos. Schilder e colaboradores especularam que bactérias Gram-negativas apresentavam um significativo envolvimento com a patogênese das doenças endodônticas⁴⁷. A partir dos postulados de Schilder sobre o envolvimento de endotoxina de bactérias Gram-negativas com problemas endodônticos, foi possível o despontamento de diversos estudos na literatura com o objetivo de detalhamento nesta relação buscando, entre outras, respostas para alguns aspectos até então pouco explorada na endodontia^{59, 81, 93, 99, 112 e 124}.

Estudos recentes têm mostrado que a endotoxina é um rápido e potente agente no desenvolvimento de lesão periradicular^{59, 81, 93, 99, 112 e 124}. Tem sido relacionada com a estimulação de produção de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, que estimula atividade osteoclástica em fibroblastos pulpares, particularmente na presença de metil-mercaptana, produzido por anaeróbios Gram-negativos¹²⁴. Induz a expressão gênica receptora de IL-10 em fibroblastos pulpares, que está relacionada com a inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8. Além

disso, a IL-10 tem vantagem no processo de cura por diminuir a resposta inflamatória depois de injúria pulpar^{112 e 124}. Também apresentam efeitos biológicos importantes com quimiotaxia para neutrófilos, ativação do sistema complemento, indução de febre, alterações estruturais, funcionais e metabólicas em muitos organismos e células^{59 e 81}.

Jacinto et al.⁴⁹ relataram que endotoxinas são potentes antígenos que podem estimular a produção de anticorpos mesmo em pequenas concentrações. Segundo Schein e Schilder⁹³, a ação destrutiva da endotoxina é imediata com ativação do sistema complemento. Subseqüentemente, há uma quebra do fragmento C5 do complemento, que está relacionado com o aumento da permeabilidade vascular, causam vasodilatação e quimiotaxia para leucócitos PMN e macrófagos. Os autores observaram que há uma correlação positiva entre o aumento do nível de endotoxina com os sintomas clínicos. Segundo os estudos, a liberação de histamina e substâncias polipeptídicas vasoativas, depois da inoculação de endotoxina, estão extremamente relacionadas com produção da dor^{112 e 124}.

Recentemente, grande quantidade de IL-1 e TNF- α foram detectados de pulpites e associados aos casos de reabsorção óssea com presença de endotoxina acumulada em áreas de infecções⁴⁶.

Williamson et al.¹²⁴, relataram que o processo da penetração de endotoxina no sistema de canais radiculares, e seu acesso no tecido periradicular, é importante para uma melhor compreensão sobre as maneiras pelas quais os canais podem contaminar-se ou recontaminar-se por bactérias.

Além de todos esses fatores, a endotoxina de bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, provê uma barreira a muitas moléculas e contribui para a resistência a drogas observadas nessas bactérias⁵⁵.

Uma observação de importância foi feita nos estudos de Leonardo et al.⁵⁹ e Tanomaru et al.¹¹², onde mencionaram que os tratamentos endodônticos de dentes com necrose pulpar e lesão

periradicular crônica, devem ser baseados não somente na eliminação de microrganismos, mas também na inativação dos efeitos tóxicos dos lipopolissacarídeos. Segundo estes autores, a preparação biomecânica do canal radicular somente reduz potencialmente a microbiota, não eliminando totalmente os microrganismos do sistema de canais, além de também não agir efetivamente sobre endotoxinas. Este fato favorece a necessidade do uso da medicação intracanal e aprimoramento de técnicas.

Na Odontologia, observa-se a preocupação de estudos sobre medicamentos ou substâncias com potencial de inativação de endotoxina bacteriana^{59, 99, 112 e 124}.

Embora estudos na literatura analisem a relação entre endotoxina e a infecção endodôntica^{59, 99, 112 e 124}, poucos resultados importantes foram constatados sobre técnicas e substâncias verdadeiramente eficazes na inativação de endotoxina, fator de apreço na constatação da efetividade quanto ao uso na terapia endodôntica.

O conceito de infecção do canal como biofilme é pouco explorado na literatura, embora seja de conhecimento que os canais infectados possuem uma microbiota complexa distribuída na forma de comunidades isoladas no lúmen do canal, como agregados densos aderidos às paredes dentinárias podendo penetrar nos túbulos dentinários em profundidades variáveis acima de 300µm^{36, 37, 53 e 96}. O biofilme é um termo que pode ser definido como um agregado microbiano complexo, onde células associadas estão envolvidas por matrix extracelular polissacarídica^{96 e 130}.

Quando a comunidade de microrganismos torna-se irreversivelmente aderidas a determinadas superfícies, o biofilme formado exibe propriedades fenotípicas distintas e tende a ser mais resistentes a ação de agente antimicrobianos^{34, 96, 130 e 132}. Segundo Zanin et al.¹³⁰⁻¹³², as características que diferem um biofilme de sua contrapartida planctônica estão relacionadas com a presença de polímeros extracelulares, composição da parede celular, taxa de atividade

metabólica e expressão gênica. Soukos et al.¹⁰⁵ mencionaram que as principais hipóteses sobre a reduzida susceptibilidade do biofilme aos agentes antimicrobianos é a dificuldade de penetração, possibilidade de inativação do agente e existência de microrganismos com crescimento lento ou em estado de repouso.

Existem evidências de que o biofilme tende a resistir também as forças mecânicas de remoção, além de serem resistentes às defesas específicas e não específicas do hospedeiro. Os mecanismos de resistência relacionados incluem barreira de difusão química e física contra a penetração de agentes antimicrobianos, força de coesão entre as células e emergência de biofilmes fenótipos específicos quando aderidos à superfícies^{105 e 132}.

Nota-se clara tendência dos estudos na literatura em testar técnicas, materiais e medicamentos sobre diferentes formas de biofilmes^{42, 72, 75, 125 e 130}, ao invés do emprego de microrganismos na forma planctônica. Nestes estudos é comum o emprego de biofilmes monoespécies e multiespécies para observação das características nestes tipos distintos de comunidades microbianas biofilmes^{42, 72, 75, 125 e 130}.

As infecções endodônticas são caracteristicamente oriundas da interação de uma comunidade microbiana organizada em forma de biofilme para que ocorra o estabelecimento da infecção e para a determinação da intensidade das manifestações clínicas, assim como outras infecções persistentes também relacionadas com a presença de biofilmes^{37, 49, 53, 102 e 105}.

2.2 Aspectos endodônticos na eliminação microbiana

Estudos têm reportado a importância do tratamento endodôntico com vistas a eliminação da colonização microbiana do

sistema de canais radiculares, principalmente pelo fato dos microrganismos serem apontados como os agentes etiológicos mais relacionados com o desenvolvimento dessas doenças^{1, 2, 3, 25, 27, 34, 36, 38, 37, 57, 70, 96 e 134}.

O tratamento endodôntico, ao utilizar agentes químicos em associação com técnicas mecânicas, busca romper o equilíbrio do ecossistema microbiano com a finalidade de promover desinfecção do sistema de canais radiculares. A desinfecção e a modelagem na terapia endodôntica, seguidas de uma obturação hermética do sistema de canais radiculares, são essenciais no sucesso do tratamento⁹.

Objetivando a eliminação microbiana dos canais radiculares infectados e prevenindo a reinfecção dos canais é que alguns autores apontam o completo preparo químico-mecânico como uma das etapas mais importante na desinfecção endodôntica, mesmo sendo de conhecimento, que a obturação é essencial na prevenção da reinfecção do canal^{28, 33, 34, 36, 57, 91 e 96}.

Esse objetivo de eliminação microbiana do sistema de canais radiculares além de ser alcançado pela remoção mecânica da dentina infectada usualmente em combinação com a irrigação de um agente antimicrobiano é relacionado também à etapa de medicação intracanal entre as sessões^{25, 33 e 36}. A medicação deve apresentar atividade antimicrobiana para manutenção da condição de desinfecção promovida no preparo químico-mecânico e para produzir atividade antimicrobiana sobre possíveis microrganismos remanescentes^{8, 25, 33, 36, 53 e 90}.

Segundo Gomes et al.³⁶, embora a etapa de medicação intracanal seja impreterivelmente importante no sucesso de qualquer caso de tratamento endodôntico, sua relevância aumenta principalmente nos casos de infecções resistentes ao tratamento convencional, onde há presença de exsudação contínua e dor. Basrani et al.⁸, descrevem que apesar da limpeza mecânica reduzir consideravelmente o número de microrganismos, acredita-se que o número de bactérias remanescentes

desta etapa possa ser controlado somente com o uso de uma medicação intracanal durante e após as sessões de preparo.

Outra etapa do tratamento endodôntico que se sobressai para completar o sucesso da desinfecção intracanal é o selamento adequado do canal radicular^{33, 57 e 121}. O selamento hermético do lúmen do canal com um cimento obturador, que proporcione um selamento de microrganismos remanescentes das etapas anteriores e que conserve característica antimicrobiana, também contribui na eliminação de microrganismos e prevenção de recontaminação do sistema de canal radicular^{38 e 121}.

Todos os procedimentos descritos reduzem principalmente o número de microrganismos viáveis nos canais radiculares, entretanto, toda a complexidade anatômica peculiar do sistema de canais dificulta a completa eliminação microbiana do canal, permitindo que microrganismos remanescentes proliferem e possam causar infecção secundária e alterações periapicais, promovendo falhas da terapia endodôntica^{25, 28, 53, 68, 91, 96, 121 e 134}.

As áreas como istmos, ramificações, deltas, irregularidades e túbulos dentinários são locais complexos do sistema de canais radiculares onde a colonização microbiana encontra anteparo mecânico. Essas áreas são dificilmente alcançadas pelos agentes antimicrobianos utilizados na terapia endodôntica convencional e representam um obstáculo na eficácia do tratamento endodôntico. Menezes et al.⁷⁰ em estudo sobre a efetividade de agentes irrigantes e de medicamentos para utilização intracanal, relataram a dificuldade da eliminação microbiana dos canais radiculares utilizando-se apenas soluções irrigantes durante a instrumentação e medicação intracanal. Melker et al.⁶⁸ relataram a importância do conhecimento anatômico do sistema de canais radiculares. Segundo os autores, o avanço tecnológico tem possibilitado aumento na observação de minuciosidades anatômicas promovendo condições de contornar os problemas decorrentes das dificuldades inerentes da complexidade anatômica dos canais radiculares.

Embora os procedimentos de limpeza, saponificação e instrumentação dos canais radiculares sejam efetivamente importantes na eliminação dos microrganismos que infectam os canais, a total eliminação dos microrganismos é ainda muito difícil na maioria dos casos^{8, 27, 34, 57, 95 e 121}.

Segundo Schoop et al.⁹⁵ de todos os fatores que acercam o tratamento endodôntico, a eliminação microbiana efetiva do sistema de canais radiculares é talvez o maior desafio da Endodontia atual e é de inestimável valor para a preservação do dente tratado endodonticamente. Kreisler et al.⁵⁷ em estudo sobre comparação da efetividade de agentes irrigantes e laser diodo na desinfecção de canais radiculares mencionaram que o sucesso em longo prazo do tratamento endodôntico é de aproximadamente 90%, e enfatiza a dificuldade de obter sucesso na terapia endodôntica convencional.

É pelo fato dos microrganismos estarem tão relacionados com o desenvolvimento, a progressão de doenças pulpares e periapicais e falhas no tratamento endodôntico que diversos autores na literatura referem-se ao fato de que o sucesso do tratamento endodôntico está associado à eliminação eficiente dos microrganismos na terapia endodôntica^{2, 8, 27, 68, 87, 96, 110 e 123}. Por todos esses motivos é possível ressaltar que, além de ser objetivo do tratamento endodôntico a eliminação microbiana, é também objetivo do tratamento a prevenção da reinfecção do canal radicular^{8, 66 e 91}.

2.3 A importância da medicação intracanal no sucesso do tratamento endodôntico

Vários estudos relataram a preocupação dos autores com os medicamentos utilizados na endodontia para assegurar os procedimentos de limpeza e desinfecção dos canais entre as sessões do

tratamento e evitar reinfecção do canal^{8, 25, 29, 36, 53, 70, 109, 123 e 126}. Na literatura menciona-se o fato do preparo químico cirúrgico não ser suficiente para tornar o canal livre dos microrganismos, sendo que microrganismos são isolados a partir de 40 a 50% dos canais⁹⁰.

O uso de medicação intracanal elimina microrganismos do sistema de canal radicular e tem sido relacionada com o aumento do sucesso na terapia endodôntica. As medicações intracanal são usadas com o intuito de eliminar microrganismos do sistema de canal radicular e prevenir proliferação microbiana entre as sessões do tratamento^{29 e 126}. Também tem sido empregada com intuito de redução do processo inflamatório, minimização de algias e como auxiliar no processo de reparação dos tecidos acometidos⁵³.

O protocolo que ainda mais se utiliza como medicação intracanal é à base de hidróxido de cálcio, seja o composto utilizado como fórmula única ou associado a outros medicamentos^{8, 30, 36, 53, 70, 90 e 126}. Entretanto observa-se uma crescente preocupação com a utilização de medicações alternativas ao hidróxido de cálcio que sejam efetivas sobre microrganismos alcalino-resistentes, fungos, vírus e outros que estão emergindo como patógenos potenciais, e que ainda demonstrem atividade sobre endotoxina de bactérias Gram-negativas^{30, 53, 90 e 110}.

Segundo Basrani et al.⁸, acredita-se que o número de microrganismos remanescentes no canal pode ser controlado pelo uso da medicação intracanal durante as sessões do preparo do canal. Entretanto microrganismos resistentes como *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* conservam-se viáveis com o uso das medicações intracanal convencionalmente utilizadas como, por exemplo, o hidróxido de cálcio o que segundo esses autores é um assunto de questionamento nos estudos mais atuais⁸.

Nos estudos de Siqueira Junior et al.¹⁰¹, observou-se preocupação na realização de estudos com medicações intracanal que sejam eficazes na eliminação de fungos relacionados com infecção

endodôntica, em virtude de ocorrências sobre a resistência destes à medicação intracanal comumente utilizada no tratamento endodôntico.

Estudos mais atuais mencionam também a importância da medicação intracanal na neutralização de endotoxinas⁷⁰. A morte e replicação de microrganismos Gram-negativos durante o tratamento, promove a liberação de endotoxinas que são capazes de produzir diferentes reações biológicas exacerbando o processo inflamatório decorrente da infecção do canal. Baseado nestas evidências é preocupação que a medicação intracanal, para ser considerada realmente eficaz, também possua a capacidade de neutralizar endotoxinas, além de eliminar microrganismos e prevenir a reinfecção^{59, 70, 81, 93 e 112}.

Com o propósito de avaliar medicações intracanal que demonstrem eficácia frente a microrganismos mais resistentes e seja eficiente na neutralização de endotoxina, é que se observa na literatura atual a ascensão de medicamentos alternativos aos convencionais e a crescente utilização das medicações associadas^{8, 29, 30, 59, 60, 80, 102, 101, 112 e 126}.

Muitos estudos relataram a viabilidade do uso da clorexidina como medicação intracanal^{8, 29, 30, 36, 53, 60, 80, 89, 101, 109 e 126}. O uso da clorexidina na endodontia é proposto na forma de solução irrigante e como medicação intracanal, por sua atividade comprovada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas³⁶. Segundo Siqueira Junior et al.¹⁰¹⁻¹⁰³, a clorexidina é um agente antimicrobiano que tem emergido como uma medicação intracanal potencial principalmente nos casos de lesões periapicais. A clorexidina é uma bisbiguanida catiônica com boa atividade antimicrobiana que age interferindo na parede celular dos microrganismos e causando extravasamento dos componentes intracelulares. É efetiva sobre *Candida albicans*, é bacteriostática em concentrações menores que 0,2% e bactericida em concentrações maiores que 2%⁵³. Uma das suas características favoráveis à utilização na endodontia é sua boa substantividade, segundo alguns estudos, até sete dias^{53, 80, 102 e 126}. Além disso, a clorexidina utilizada intracanal na forma de gel, tem mostrado

possuir boa capacidade de penetração no sistema de canais radiculares, requisito importante para uma medicação intracanal^{36 e 126}.

Na endodontia, a forma gel da clorexidina tem sido bastante investigada. Uma das preocupações quanto ao uso está relacionado à propriedade de dissolução de matéria orgânica. Okino et al.⁸⁰ em seus estudos avaliaram a dissolução do tecido pulpar por clorexidina gel 2% e solução aquosa 2% em comparação com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. Os autores observaram que a clorexidina gel não promoveu dissolução do tecido pulpar. Segundo Karim et al.⁵³, a aplicação da clorexidina combinada com natrosol gel (Aqualon[®]) tem sido sugerida para utilização como medicação intracanal, já que o natrosol gel é um agente não iônico, inerte, solúvel em água e que pode ser completamente removido do canal, e a clorexidina é um agente antimicrobiano efetivo, com baixa toxicidade.

Evans et al.³⁰, Karim et al.⁵³ e Siqueira Junior et al.¹⁰³ mencionaram em seus estudos que a clorexidina gel não tem habilidade para dissolver tecido, porém suas propriedades antimicrobianas e a substantividade sustenta sua aplicabilidade como medicação intracanal. Outra propriedade importante mencionada por Lin et al.⁶⁰ e Siqueira Junior et al.¹⁰³ é a biocompatibilidade da clorexidina com os tecidos periapicais favorecendo o uso como medicação intracanal.

Algumas combinações da clorexidina com outras substâncias para uso como medicação intracanal tem sido observada. Basrani et al.⁸ corroboraram que a combinação da clorexidina gel 2% com hidróxido de cálcio, pode ser utilizada como medicação intracanal. Evans et al.³⁰ avaliaram o efeito da mistura de hidróxido de cálcio com clorexidina 2% sobre *Enterococcus faecalis* em túbulos dentinários, demonstrando maior efetividade desta associação se comparado ao hidróxido de cálcio associado à água destilada. Karin et al.⁵³ mencionaram a utilização de uma formulação de clorexidina clorada para utilização intracanal.

Pode ser observado na literatura que os estudos não possuem a preocupação em investigar a capacidade dos medicamentos na inativação de endotoxina, propriedade de relevância na medicação intracanal. O acúmulo de endotoxinas nos canais infectados pode estimular o aparecimento de lesões periapicais e reabsorção óssea⁴⁶.

Leonardo et al.⁵⁹ mencionaram a possibilidade da associação de substâncias capazes de inativar endotoxina como, por exemplo, a polimixina B, na tentativa de eliminar seu potencial biologicamente tóxico. Como muitos produtos utilizados na inativação de endotoxinas possui efeitos indesejáveis, a viabilidade destes quanto ao uso clínico deve ser investigada.

A polimixina B é um dos componentes do grupo de antibióticos derivados do *Bacillus polymyxa*. É um decapeptídeo que contém quatro anéis de ácido 2,4–diaminobutírico⁷⁹. Acredita-se que sua ação está relacionada a alterações na estrutura da membrana das bactérias, resultando em um extravasamento dos componentes intracelulares essenciais. Segundo Ogita et al.⁷⁹, o antibiótico é conhecido por desestruturar a barreira de permeabilidade da membrana citoplasmática por formação de um complexo com o lipopolissacarídeo e também aumenta a permeabilidade da membrana para uma grande variedade de moléculas, o que pode ser letal à célula bacteriana. Possui uma ação antimicrobiana contra uma ampla variedade de microrganismos Gram-negativos e é particularmente eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa*^{118 e 45}. Segundo Oliveira et al.⁸², polimixina B é um antibiótico que apresenta importantes resultados na neutralização de endotoxina em canais radiculares.

A polimixina B foi estudada por Heijdin et al.⁴⁵ e Messeder et al.⁷¹ na eliminação de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, isoladas de ambientes hospitalares, como a Unidade de Terapia Intensiva (UTI), e foi considerada pelos autores, eficiente no tratamento de pacientes infectados por *Pseudomonas aeruginosa*.

Observa-se que existe a preocupação em implementar uma medicação intracanal que tenha atividade na neutralização de endotoxinas, além dos outros requisitos de relevância em uma medicação intracanal. Oliveira et al.⁸² avaliaram o efeito da polimixina B isolada e em associação com outras substâncias na utilização como medicação intracanal, demonstrando que a polimixina B neutralizou endotoxinas além de proporcionar alterações nas propriedades dos lipopolissacarídeos em estimular a produção de linfócitos B e a combinação da polimixina não foi capaz de neutralizar endotoxinas.

A utilização da medicação intracanal é de importância ímpar no sucesso da terapia endodôntica, consolidando ainda mais a necessidade de estudos que contribuam para o aprimoramento das substâncias utilizadas para este fim^{30, 53, 60, 80 e 103}.

2.4 Irradiação laser e aplicação na prática endodôntica

O primeiro laser, laser ruby, foi criado por Maiman em 1960 e foi introduzido na Odontologia por Stern, Sognaes e Goldman et al. em 1964^{6, 48 e 69}. Desde então se verificou na literatura, uma grande repercussão de pesquisas relacionadas à aplicação clínica do laser na prática odontológica. Com isso foi observada também a emergência paralela da organização que suporta laser na Odontologia em instituir protocolos de uso para os mais diversificados fins na área¹²².

O fascínio que o laser exerce sobre os pesquisadores explica-se por suas características excepcionais como monocromaticidade, pequena divergência, coerência espacial e temporal, intensa energia ou intensa potência, pulsos ultracurtos, possibilidade de ajuste do comprimento de onda, entre outras⁶¹. Segundo Bagnato⁶, a monocromaticidade é a característica mais marcante da luz laser, e ocorre porque a energia carregada pelo fóton estimulante e pelo fóton emitido

são as mesmas. Uma segunda característica importante descrita pelo autor é o fato de que a intensidade do feixe laser pode ser extremamente grande, ao contrário das fontes de luz convencionais. Outras características importantes são o caráter direcional do feixe laser e a coerência do mesmo⁶.

Na área da saúde, a terapêutica usando a luz laser está cada vez mais presente na prática clínica diária, o que se deve principalmente, ao fato do desenvolvimento das técnicas de aplicação do laser e do melhoramento da tecnologia de fibras-ópticas⁹². O desenvolvimento da tecnologia requer uma convergência dos estudiosos de muitas áreas incluindo física óptica, engenharia, bioquímica, farmacologia e adicionalmente, os diferentes setores da área da saúde⁹².

O laser é uma forma de luz, como indica seu nome (*light amplification by stimulated emission of radiation*), e uma excepcional fonte de radiação capaz de produzir, em bandas espectrais extremamente finas, campos eletromagnéticos intensos e coerentes que se estendem do infravermelho remoto ao ultravioleta^{24 e 61}, cuja cor da luz depende do seu comprimento de onda. Os comprimentos de onda menores emitem luz violeta que vai sofrendo variações até a luz vermelha visualizada nos maiores comprimentos de onda (Figura 1).

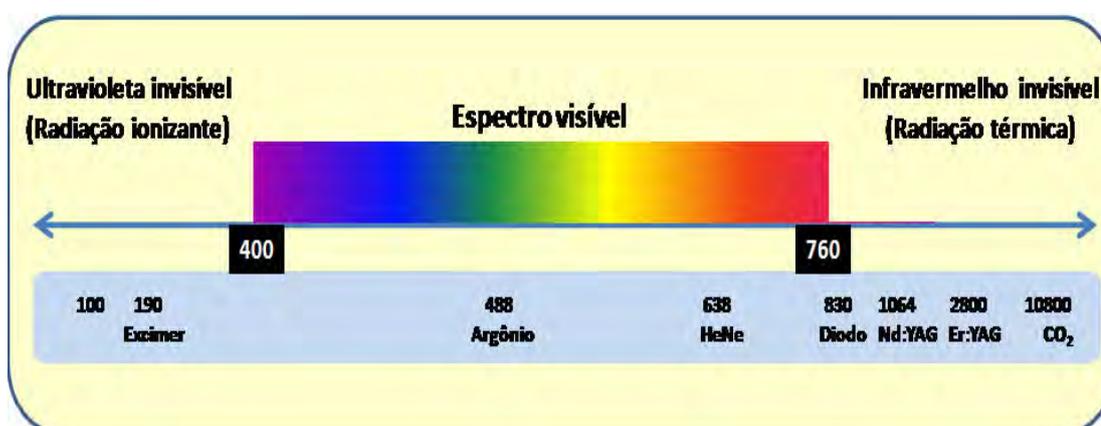


FIGURA 1 - Representação esquemática da distribuição de alguns tipos de lasers em seus respectivos espectros (nm)⁶⁹.

Os aparelhos que emitem radiação laser são constituídos basicamente de componentes mecânicos, como painel de controle, sistemas e mecanismos de liberação do feixe de luz, por componentes elétricos representados pela fonte de energia e os eletrodos e por componentes ópticos, que consiste na cavidade óptica, refletores de fótons, fonte de energia, meio ativo, lentes e filtros. A luz laser emitida é caracterizada por apresentar sempre ondas eletromagnéticas com o mesmo comprimento de onda, mesma direção, mesma frequência e cor, diferenciando da luz convencional que possui distintos comprimentos de onda, em todas direções que é resultado da combinação de vários espectros⁶⁹.

Para seu funcionamento, o laser necessita, primeiramente, da disposição de um meio ativo, ou seja, uma coleção de átomos, moléculas ou íons, que emitem radiação na parte óptica do espectro. Em segundo lugar, deve ser satisfeita uma condição conhecida sob o nome de inversão de população que é gerada por um processo de excitação denominado de bombeamento, que transforma o meio ativo em amplificador de radiação. Também é indispensável uma reação óptica para o sistema composto por essa reação óptica e pelo meio ativo seja a sede de uma oscilação laser^{61 e 116}.

Existem vários tipos de lasers, os quais são classificados quanto ao meio ativo que produz a radiação laser (gasoso, sólido, semicondutor ou líquido), ou ainda pelas possibilidades de utilização (cirúrgico ou terapêutico). São exemplos de lasers cujo meio ativo seja o gás, os lasers de CO₂, HeNe, argônio e excimer. Os lasers sólidos são representados pelo laser rubi, Nd:YAG, Er:YAG, ErCr:YSGG e Ho:YAG, os lasers semicondutores são emitidos por cristais semi-condutores como é o caso do laser de diodo (AsGaAl), e o laser líquido está relacionado com o corante rodaina. Existem lasers combinados, sendo exemplos a combinação do HeNe+diodo e Nd:YAG+Er:YAG⁶⁹.

Os sistemas lasers são classificados quanto nível de excitabilidade no tecido-alvo biológico. Uma vez absorvido pelo tecido,

poderá atuar molecularmente, excitando elétrons ou partes da molécula, promovendo movimento das cargas nessa molécula. Se essa excitabilidade for relativamente pequena, ou seja, tratando-se do laser de baixa intensidade poderá ocorrer uma bioestimulação ou bioinibição para as reações químicas e fisiológicas naturais do tecido, contudo, tratando-se de laser de alta intensidade, a energia depositada no tecido-alvo será tão grande a ponto de romper ligações químicas dessas moléculas, ou mesmo remover elétrons, resultando no rompimento do tecido. Essa é a diferença básica entre um laser de baixa intensidade, que rompe ou modifica permanentemente o tecido através do corte, ablação, coagulação e vaporização do mesmo⁶¹.

Laser de baixa potência opera tipicamente com potência de 100mV ou menos, podendo produzir energia em espectro visível (400-700nm de comprimento de onda), ou na ultravioleta (200-400nm), ou até em regiões próximas à infravermelha (700-1500nm). Os primeiros lasers de baixa intensidade tinham como meio ativo uma mistura gasosa de hélio e neônio (lasers de HeNe) que emitiam na região do vermelho (632,8nm). Atualmente os sistemas lasers de baixa intensidade são, na sua grande maioria constituídos de um cristal crescido em laboratório de diodo semicondutor de arseneto de gálio (AsGa) podendo estar dopado por diversos outros elementos, dependendo do comprimento de onda desejado^{33, 41, 61 e 66}.

Atualmente, está crescendo a qualidade de consciência da utilização do laser como equipamento na prática odontológica moderna, podendo ser usado como coadjuvante ou alternativo aos procedimentos e técnicas tradicionais¹²². Na Odontologia moderna existe uma tendência no sentido da utilização da luz como instrumento de tratamento, sendo que essa linha de conduta é chamada genericamente de Fototerapia. Lasers de baixa potência vêm sendo utilizados com finalidade terapêutica no alívio da dor, para estimular reparação tecidual, reduzir edema e hiperemia nos processos inflamatórios, combatendo infecções e no tratamento de parestesias e paralisias. Os lasers de alta

potência podem ser utilizados buscando uma ação clínica-cirúrgica, seja removendo tecido cariado ou fazendo excisões e incisões em tecido mole⁶².

Embora o uso do laser na Endodontia tenha sido relatado em 1971, por Weichman & Johnson, apenas recentemente o seu uso tem sido reconhecido e indicado. Algumas propriedades dos lasers sejam eles de alta ou baixa intensidade permitem o uso na Endodontia⁶⁹. Estudos na literatura referem-se ao uso do laser como coadjuvante na redução bacteriana intracanal. Também para aumentar a permeabilidade do sistema de canais facilitando a penetração de medicamentos intracanal. São ainda utilizados para diminuir a permeabilidade do sistema de canais radiculares promovendo selamento de canalículos evitando a difusão de produtos irritantes para o periodonto. São relatados para tratamento de algias pós-operatórias, vaporização de tecidos moles e remoção de smear layer^{5, 32, 35, 41, 69, 96, 106 e 122}.

Segundo Mello e Mello⁶⁹, os equipamentos mais recentes foram aprimorados para o uso do laser na cirurgia paraendodôntica, pois além das vantagens acima citadas, a superfície de corte apresenta-se com uma qualidade superior ao obtido com instrumento rotatório. Outra vantagem do uso do laser na cirurgia paraendodôntica é a redução da contaminação do ápice radicular, diminuindo o risco de complicações. Segundo os autores, o uso do laser apresenta outras vantagens sobre as técnicas convencionais como maior conforto ao paciente, analgesia, propriedade antiinflamatória e bioestimulatória. Foi relatado pelos autores que para a obtenção da maior parte dos efeitos citados, torna-se imprescindível o uso de finas e flexíveis fibras ópticas, capazes de acompanhar as curvaturas do canal radicular.

Em Endodontia o laser de alta intensidade usa calor para cortar e vaporizar tecidos e são conhecidos como laser cirúrgico, contrário dos lasers de baixa intensidade que possuem a capacidade de alterar células excluindo-se a necessidade do aumento da temperatura, uma condição desvantajosa que pode resultar em necrose do tecido

subjacente, ligamento periodontal e osso alveolar, podendo ocasionar, inclusive anquilose^{24 e 41}.

Segundo Lizarelli⁶¹, a laserterapia de baixa intensidade que surgiu com Mester, na Hungria, em 1966, tem sido utilizada por cirurgiões-dentistas brasileiros há mais de 20 anos, e na Endodontia tem indicações no diagnóstico diferencial e identificação do elemento dentário comprometido endodonticamente; na drenagem de abscessos por aplicação pontual; na prevenção de pericementite por aplicação em pontos coincidentes (vestibular e lingual/palatina) da região periapical da raiz dentária; na cicatrização e reparo dos tecidos periapicais e na tentativa de se evitar um tratamento endodôntico radical.

A utilização de técnicas coadjuvantes á técnica que se utiliza instrumentação dos canais como o uso dos diferentes tipos de lasers e técnicas associando-se irradiação laser são apontadas como novas abordagens para eliminação da infecção do sistema de canais radiculares. Uma propriedade comum dessas técnicas é que a complexidade anatômica dos canais não é vista como um obstáculo na eliminação microbiana, já que a luz laser pode potencialmente ser redirecionada, em virtude de sua transmissão através dos prismas de esmalte e túbulos dentinários, e por agir efetivamente através dos canais de fibra óptica⁹⁶. Eldeniz et al.²⁸ mencionaram o fato de que todos os sistemas lasers possuem atividade antimicrobiana variáveis nos canais radiculares e que os diferentes tipos de lasers interagem de maneiras diferentes, dependendo do coeficiente de absorção. Schoop et al.⁹⁴ relataram que a introdução dos lasers na Endodontia ajudou a contornar o problema da penetração insuficiente dos agentes desinfetantes, melhorando dramaticamente o sucesso do tratamento endodôntico.

Embora tantas aplicabilidades importantes da Laserterapia de baixa intensidade na Endodontia, a literatura atual salienta para as vantagens desses tipos de lasers sobre o processo de eliminação microbiana do sistema de canais radiculares^{41, 96, 106, 107 e 122}. Moritz et al.⁷⁴ mencionaram o fato de que embora os sistemas lasers de

alta intensidade, como Nd:YAG e CO₂, demonstrarem efetividade na limpeza e desinfecção de canais radiculares e túbulos dentinários que não são totalmente acessíveis no tratamento endodôntico convencional, os lasers diodo estão assumindo importâncias semelhantes aos encontrados com os lasers Nd:YAG. Segundo os autores, na atualidade alguns lasers diodo podem alcançar uma potência de saída de muitos Watts, com confiabilidade, efetividade e menor produção de calor, uma desvantagem dos lasers de alta potência.

Segundo Gutknecht et al.⁴¹, a maior efetividade da terapia com laser de baixa intensidade no protocolo endodôntico de utilização do laser, é que são recomendados para redução microbiana sem apresentarem aumento na temperatura do tecido circundante. Os autores constataram em seus estudos, que a aplicação do laser de baixa intensidade em canais radiculares, não alterou a temperatura do tecido circundante em mais de 7°C, impossibilitando qualquer alteração tecidual e favorecendo a utilização deste laser para fins endodônticos.

O aumento do interesse pelo estabelecimento de uma nova terapêutica com propriedade antimicrobiana na endodontia, foi sugerido também por Folwaczny et al.³². Para os autores a laserterapia de baixa intensidade pode ser considerada uma das opções de maior potencial em aplicabilidade clínica na prática diária da Endodontia.

A laserterapia de lasers de baixa intensidade é avaliada como método alternativo de tratamento antimicrobiano pelo fato de, contrariamente aos antibióticos e antimicrobianos, não favorecem o desenvolvimento da resistência microbiana^{14, 34 e 66}. Muitos agentes antimicrobianos convencionais têm mostrado efeitos colaterais indesejados necessitando que haja diminuições das doses alterando a efetividade antimicrobiana, o que não ocorre na utilização do laser no processo de eliminação de microrganismos³¹.

Embora a terapia endodôntica convencional apresente resultados importantes na eliminação microbiana dos canais radiculares, mais de 30% de falhas nos tratamentos são evidenciados e estão

relacionados à dificuldade de eliminação da infecção endodôntica. Por este e outros motivos é que novas possibilidades no tratamento das infecções endodônticas estão em evidência e inclui técnicas não instrumentadas e uso de tecnologia laser de baixa intensidade.

2.4.1 Terapia Fotodinâmica e atividade antimicrobiana em canais radiculares

O tratamento fotodinâmico com denominação atual de Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*), já era utilizado há mais de 1000 anos no Egito, Índia e China, no entanto poucas pesquisas foram realizadas até por volta de 1960⁶⁹. Utilizando células microbianas, a primeira demonstração foi feita por Raab em 1900, onde observou que pequenas concentrações de azul de metileno não era capaz de causar efeitos letais em protozoários em um ambiente escuro, mas poderia ser letal quando expostos á luz solar de um dia ensolarado^{127 e 133}.

Esta modalidade de tratamento tem sido instituída como terapêutica em oncologia veterinária e humana, no tratamento da degeneração macular relacionada á idade, em doenças dermatológicas, em artrite reumatóide, doenças coronarianas e muitas evidências apontam para a utilização da técnica no controle de diversas infecções^{21, 43 e 58}. Na década de 90 os aparelhos de laser sofreram inovações tecnológicas e novos fármacos surgiram, proporcionando novas aplicações terapêuticas da Terapia Fotodinâmica também na dermatologia¹¹³.

Das possibilidades terapêutica empregando-se Terapia Fotodinâmica, a utilização sobre eliminação microbiana é uma das mais discutidas na atualidade^{14, 34, 42, 52, 55, 56, 57, 58, 72, 76, 96, 105, 130, 131 e 133}. A Terapia Fotodinâmica com finalidade antimicrobiana encontra-se bem estabelecida na literatura, principalmente nos casos de infecções

localizadas, superficiais e aquelas de microbiota conhecida, como boa parte dos casos das infecções que acometem cavidade bucal¹²⁷. Tem sido indicada na literatura como uma das terapias mais promissoras na erradicação de microrganismos em alguns tipos de infecções^{31, 72, 92, 96, 106 e 115}.

As evidências mostram que a Terapia Fotodinâmica surge como um tratamento alternativo ao uso de agentes antimicrobianos tradicionais^{14, 33, 34, 42, 52, 54, 56, 58, 72, 76, 96, 96, 105, 125, 130, 132 e 133}. A consagração no uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana deve-se principalmente ao fato de que a ciência médica tem falhado em encontrar terapias antimicrobianas efetivas na mesma proporção que surgem microrganismos multirresistentes, novos agentes virais, prion, entre outros⁵².

A maior ocorrência de resistência microbiana aos agentes antimicrobianos tradicionalmente utilizados, tem sido muito discutido na literatura mundial^{14, 21, 34, 42, 52, 57, 58, 72, 76, 96, 125, 127, 131, 132 e 133} e também é um dos motivos que justifica o emprego da Terapia Fotodinâmica com finalidade antimicrobiana. Esta justificativa pode ser extrapolada pelo fato de ainda não existirem evidências de que a técnica promova resistência microbiana⁷⁸. Segundo Gonçalves³⁹ e Zanin¹³¹ a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é um dos tratamentos que mais se enquadra nas características da busca por um agente antimicrobiano no qual os microrganismos sejam incapazes de obter resistência.

Núñez et al.⁷⁸ comentam que como até o momento não existem evidências de resistência microbiana à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, esta modalidade terapêutica pode ser de extremo valor em um futuro próximo, uma vez que a chamada “era antibiótica” pode estar chegando ao fim. Outro relato interessante foi tecido por Caminos et al.¹⁴, ao comentar que outro benefício da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é que o fotossensibilizador utilizado é seletivo para o microrganismo através da combinação da droga com baixa dose de luz, já que para promover o mesmo efeito em célula animal é necessário uma

dose muito maior e concentrações diferentes do corante fotossensibilizador. Segundo os autores, os fotossensibilizadores testados até o momento não apresentaram atividade mutagênica ou formação de espécies droga-resistentes.

A técnica da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é baseada no conceito de morte não tóxica, conhecida como fotossensibilização letal⁴⁴, onde é necessária uma impregnação prévia das células microbianas com o corante fotossensibilizador, para posterior exposição dessas a uma determinada fonte de luz. Segundo Gonçalves³⁹, na Terapia Fotodinâmica a eliminação de microrganismos está relacionada com a ativação do corante depositado no organismo alvo que após sensibilização transforma oxigênio molecular em oxigênio singlete que é citotóxico. Durante esse processo, componentes celulares fotossensíveis passam para um estado excitado quando expostos a uma luz de comprimento de onda complementar que é caracterizado pela passagem dos elétrons para níveis de energia superiores. Neste estado excitado, o fotossensibilizador pode interagir com o oxigênio molecular iniciando a formação de oxigênio singlete altamente reativo (fotoproceto Tipo II) ou interagir com outras moléculas como aceptores de elétrons resultando na produção de hidroxilas e outros radicais orgânicos (fotoproceto do Tipo I)^{14, 58, 72, 125, 131 e 133}. Os produtos gerados nessas reações podem promover diversos danos nos componentes da célula microbiana ou alterar as atividades metabólicas de maneira irreversível resultando na morte microbiana^{44, 58 e 131}. Em geral, o processo causa danos na via oxidativa⁷⁶, na membrana plasmática e material genético da célula microbiana¹²⁵, mas não são tóxicos às células do hospedeiro¹³⁰.

A efetividade da Terapia Fotodinâmica requer a presença de fotossensibilização química por luz dotada de comprimento de onda apropriado e a presença de oxigênio. O princípio da terapia é que a energia absorvida via fotossensibilização intracelular é transferida à molécula de oxigênio dando origem a uma reação oxidativa poderosa^{92 e 115}. Pode-se observar então, que os princípios básicos da Terapia

Fotodinâmica Antimicrobiana são relativamente simples, e isto lhe assegura certo grau de confiabilidade e eficiência. A técnica pode ser bastante eficiente desde que seja possível garantir que durante a execução da fototerapia, todos os ingredientes necessários estejam adequadamente presentes: droga, oxigênio e luz suficientes para promoverem danos à célula alvo⁷.

É bastante relevante o emprego da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana também na Odontologia, já que as doenças infecciosas são as de maior prevalência na cavidade bucal^{78 e 127}. Na literatura, é possível observar uma forte tendência de utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Periodontia para redução microbiana pós-tratamento convencional e para tratamento de casos refratários^{63, 78, 122 e 127}. A aplicação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana também é verificada sobre os biofilmes formados em superfícies dentárias implicados na patogênese da cárie^{105, 125, 130 e 132}. Estudos que avaliam a efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre bactérias e fungos envolvidos com afecções da mucosa bucal, são notáveis na literatura mundial^{64, 67, 76, 106, 122 e 129}. Na literatura odontológica observa-se inclusive aplicações não-terapêuticas da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na desinfecção de superfície de implantes e próteses acrílicas^{42, 67, 75 e 122}.

Dentre as possíveis aplicabilidades da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia, talvez a de maior relevância seja a utilização da técnica na eliminação de microrganismos dos canais radiculares, onde a sanificação do sistema de canais radiculares é a condição fundamental para que ocorra a reparação dos tecidos periapicais. O potencial de sucesso no emprego desta modalidade de tratamento para desinfecção de canais radiculares está relacionado principalmente à possibilidade de atingir microrganismos de áreas de difícil acesso do complexo sistema de canais radiculares^{34, 39, 96 e 106}. Esta possibilidade deve-se ao fato de que a luz laser pode ser redirecionada em múltiplas direções, devido transmissão através dos prismas de

esmalte e túbulos dentinários, com atuação efetiva mediada pelo emprego de fibras ópticas⁹⁶.

A utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana tem sido proposta para desinfecção de canais radiculares também pela atuação sobre os biofilmes que crescem nas paredes dentinárias dos canais radiculares. A organização microbiana na forma de biofilme é um fator que determina dificuldade de atuação dos agentes antimicrobianos utilizados intracanal, além de possibilitar resistência microbiana³⁴.

Yamada¹²⁷ apresentou um caso clínico em que foi utilizada Terapia Fotodinâmica logo após o preparo químico cirúrgico do canal radicular e pôde observar redução microbiana de 99,9%, com comprovação da eficácia e rapidez da resolução do caso por acompanhamento radiográfico. O estudo de Seal et al.⁹⁶, para determinar os efeitos da fotossensibilização letal sobre biofilmes de canais radiculares mostraram resultados satisfatórios sobre biofilmes intracanaís, embora não tenha sido alcançado 100% de eliminação. Os autores também observaram que a técnica combinada com o tratamento químico cirúrgico convencional é altamente efetiva.

Com base nas evidências apontadas na literatura, a técnica Terapia Fotodinâmica tem sido testada em microrganismos envolvidos com infecções endodônticas¹⁰⁷, tendo também como vantagens o fato de ser uma técnica de efeito local, facilmente reproduzível e não invasiva⁵⁴. Os estudos na literatura mostram susceptibilidades diferentes dos microrganismos aos efeitos fototóxicos da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, sendo que *Enterococcus faecalis*, embora seja um dos mais difíceis de serem erradicados pela técnica, pode ser reduzido em até 97%^{39, 86, 106, 115 e 129}.

A técnica é bastante interessante na eliminação de microrganismos, por mostrar atividade antimicrobiana inclusive sobre cepas bacterianas antibiótico-resistentes, leveduras, vírus e parasitas^{92 e}

Pelo fato de serem relatados casos de ocorrência de fungos em infecções endodônticas, inclusive em amostras de lesões periradiculares, lesões refratárias e persistentes, observa-se na literatura a busca por tratamentos mais abrangentes na terapia endodôntica. Siqueira Junior et al.¹⁰¹, mencionaram em seus estudos que os fungos são resistentes à terapia convencional, inclusive a medicações consagradas na Endodontia, como por exemplo, o hidróxido de cálcio utilizado sozinho ou associado.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é lançada como modalidade promissora por Teichert et al.¹¹⁵, na fotoerradicação de organismos fúngicos, vindo de encontro à necessidade terapêutica endodôntica no combate a leveduras, principalmente *Candida albicans*. Segundo os autores, o mecanismo de ação de destruição de fungos pela Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana envolve a perfuração da parede celular e membrana, induzido pelo radical oxigênio, que permite a fotossensibilização do corante do interior celular promovendo alterações das organelas celulares com conseqüente morte celular.

Outro aspecto importante para a utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana também em células fúngicas diz respeito a necessidade de investigação de tratamentos alternativos como medida para contornar os problemas decorrentes de resistência aos antifúngicos^{20, 58, 67 e 88}. Um aumento no número de relatos de resistência aos antifúngicos foi mencionado por Munin et al.⁷⁶. Em seu estudo sobre o efeito da fotossensibilização letal sobre *Candida albicans*, os autores observaram a necessidade da irradiação associada ao corante para promover efeito significativo sobre as leveduras.

Estudos sobre a inativação fotodinâmica de leveduras também podem ser baseados no papel que as células fúngicas desempenham como organismo modelo, por sua facilidade de cultivo e por ser uma célula eucariótica^{58 e 67}. Lambrechts et al.⁵⁸ e Maver-Biscanin et al.⁶⁷ demonstraram efeitos importantes da Terapia Fotodinâmica

Antimicrobiana sobre redução de colônias fúngicas de infecções bucais após tratamento *in vivo*.

Quanto à utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre a eliminação de bactérias relacionadas a infecções endodônticas, Walsh¹²² relatou que a energia laser de baixa potência por si só não é letal frente a essas bactérias, mas é usada para ativação fotoquímica do corante liberador de oxigênio. Segundo o autor, o oxigênio singlete liberado do corante causa injúria na membrana e no material genético dos microrganismos, inclusive àqueles resistentes à ação de agentes microbianos. Além disso, a Terapia Fotodinâmica não produz efeitos térmicos deletérios, não promove nenhum tipo de sensibilização e morte de células dos tecidos saudáveis adjacentes ao canal.

Algumas espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas que podem estar associadas com problemas endodônticos também vem sendo alvo de testes sobre efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. No entanto, muitos protocolos diferentes quanto intensidade da luz laser, concentrações dos fotossensibilizadores e métodos de ativação ainda vem sendo testados, demonstrando diferentes resultados e suscetibilidades das espécies bacterianas ao tratamento^{26, 34, 42, 52, 55, 75, 86, 95, 118, 120, 129 e 133}. Alguns estudos têm se preocupado em relacionar o tipo de corante e a efetividade da Terapia Fotodinâmica sobre os microrganismos^{31, 66, 106 e 122}.

Embora estudos na literatura demonstrem resultados promissores do uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na desinfecção de canais radiculares^{24, 96 e 122}, ainda não está bem definido um protocolo de utilização da terapia na prática clínica diária da Endodontia. Folwaczny et al.³², em seus estudos promovem uma discussão sobre a relação do tempo de aplicação do laser com a morte de microrganismos. Observaram que a redução bacteriana mostrou dependência logarítmica com o tempo de radiação.

Observa-se na literatura que os corantes fotossensíveis mais utilizados são azul de toluidina e azul de metileno, que são

fotossensibilizadores sintéticos^{42, 54, 55, 66, 76, 106, 115, 122 e 130}. Cada corante fotossensibilizador possui um espectro de ação da luz sobre um comprimento de onda de máxima absorção. Entretanto, o efeito fotodinâmico depende do nível tecidual adequado do fotossensibilizador⁹².

Além desses, outros corantes fotossensibilizadores, além do azul de toluidina e azul de metileno, vem sendo utilizado na Terapia Fotodinâmica com objetivo de eliminação microbiana intracanal. Segundo⁹⁷ avaliou o potencial de redução bacteriana intracanal utilizando Terapia Fotodinâmica com laser de AsGaAl e corante azuleno 25% associado ao Endo-PTC. O autor constatou redução bacteriana significativa na utilização da técnica, considerando o método efetivo na utilização intracanal.

Uma das preocupações do uso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana intracanal está relacionada à probabilidade de manchamento dentário. No entanto, estudos mais atuais têm evidenciado que a associação dos corantes com outras substâncias podem contornar o problema das alterações cromáticas^{39 e 97}.

A habilidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na eliminação de microrganismos no interior de canais radiculares é promissora. Desta forma, o desempenho desses equipamentos com relação à segurança, a efetividade do comprimento de onda, dos níveis de energia e redução microbiana, deve ser bem documentado, a fim de viabilizar a utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Endodontia.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficácia da instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser de baixa potência e corante azuleno, na eliminação de biofilmes intracanal monoespécies de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* e de biofilmes multiespécies desses microrganismos associados, e na neutralização de endotoxinas do sistema de canais radiculares. Foi também objetivo deste estudo analisar a efetividade da medicação intracanal de clorexidina gel 2%, associada á polimixina B, sobre microrganismos e endotoxinas remanescentes do tratamento com instrumentação e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto deste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Campus de São José dos Campos sob o protocolo nº 060/2005-PH/CEP (Anexo A e B).

4.2 Preparo dos espécimes

Na realização do estudo foram utilizados 80 dentes humanos unirradiculares de dimensões aproximadas, cedidos pela disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, que foram devidamente analisados e indicados para exodontia pela disciplina referida (Anexo A). Os dentes cedidos foram armazenados em solução fisiológica e foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15min. Após remoção dos debris orgânicos remanescentes, os dentes foram selecionados radiograficamente e foram excluídos dentes com complexidade anatômica do canal radicular, com presença de cavidades decorrentes de lesões cariosas ou fraturas na porção radicular e com canal radicular de dimensões não apropriadas á padronização do estudo. Para a preparação dos espécimes, os dentes selecionados foram seccionados transversalmente na região do limite amelocementário com

auxílio de instrumentos rotatórios e discos de carborundum, obtendo espécimes radiculares padronizados em 16mm (Figura 2).

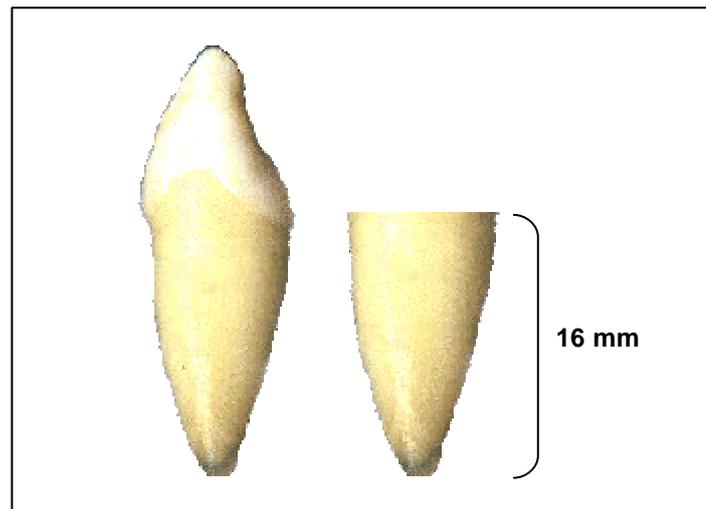


FIGURA 2 – Ilustração do espécime preparado, a partir da secção da coroa dentária.

Depois de seccionados, os espécimes foram submetidos ao procedimento de instrumentação dos canais radiculares, segundo técnica convencional, preconizando-se instrumentação até diâmetro referente à lima Kerr nº 30 com irrigação de 3mL de solução fisiológica a cada troca de instrumento. Em todos os espécimes foi realizado vedamento apical com resina fotopolimerizável Z-100 (3M, Dental Products, St Paul, USA) e impermeabilização externa com duas camadas de adesivo epóxi ARALDITE (Brascola, São Paulo, Brasil).

Após o período de endurecimento final do adesivo, os espécimes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 15min. Em seguida, grupos de 10 espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 8 placas de cultura celular de 24 poços (24 Well Cell Culture Cluster Tissue Culture Treated, Catalog Number 3524, Sterile/Non pyrogenic), fixados

com resina acrílica quimicamente ativada até a altura aproximada de 5mm (Figura 3).



FIGURA 3 – Foto dos espécimes fixados em placa de cultura de célula de 24 poços.

Essas placas foram vedadas e enviadas a Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD, Cotia - São Paulo, Brasil), assim como todos os materiais utilizados nos grupos com *Escherichia coli*, e submetidas à radiação gama com cobalto 60 (20 KGy) para neutralização de possíveis endotoxinas pré-existentes (Csako et al.²²) no interior dos canais radiculares

4.3 Distribuição dos espécimes

Oito placas com grupos de 10 espécimes foram distribuídas aleatoriamente conforme o microrganismo utilizado para a contaminação intracanal, sendo quatro placas destinadas aos grupos experimentais, que foram contaminados e submetidos ao tratamento com instrumentação, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal, e outras quatro aos grupos controles, que foram igualmente contaminados, submetidos ao tratamento com instrumentação e medicação intracanal, porém não receberam tratamento com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (Quadro 1). Os espécimes contaminados com *Escherichia coli* e com microrganismos associados foram utilizados concomitantemente para verificação da neutralização de endotoxinas.

Quadro 1- Distribuição dos espécimes conforme microrganismo, grupo experimental e grupo controle, evidenciando grupos que foram utilizados para análise da neutralização de endotoxina.

Microrganismo	Grupo experimental	Grupo controle	Neutralização endotoxina	Total
<i>Candida albicans</i>	10	10	não	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	10	não	20
<i>Escherichia coli</i>	10	10	sim	20
microrganismos associados	10	10	sim	20
total de espécimes	40	40	-	80

4.4 Contaminação intracanal dos espécimes

Todo o procedimento de contaminação intracanal dos espécimes foi realizado no interior do fluxo laminar. Culturas recentes de 24h de incubação foram utilizadas para padronização das suspensões com 1×10^6 cél./mL de *Candida albicans* ATCC 18804, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ou *Escherichia coli* ATCC 25922. As suspensões foram padronizadas em espectrofotômetro (Shinadzu modelo UV-1203, Kyoto - Japan), cujos valores de densidade óptica (D.O.) e comprimento de onda (λ) para a quantidade de 1×10^6 cél./mL foram previamente estabelecidos no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2– Comprimento de onda e densidade óptica utilizados para obtenção das suspensões contendo 1×10^6 cél./mL dos microrganismos.

Microrganismo	Comprimento de onda	Densidade óptica
<i>Candida albicans</i>	530 nm	0,284
<i>Escherichia coli</i>	590 nm	0,324
<i>Enterococcus faecalis</i>	760 nm	0,298

A quantidade de 10 μ l das suspensões padronizadas foram adicionadas ao interior dos canais radiculares dos espécimes e a esta foi acrescentado 10 μ l de caldo infuso cérebro e coração (BHI - Difco, Detroit – USA) quando contaminados com *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, ou 10 μ l de caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit –

USA) quando contaminados com *Candida albicans*. Os espécimes contaminados com os microrganismos associados foram contaminados primeiramente com 10µl da suspensão padronizada de *Escherichia coli* acrescido de 10µl de caldo BHI e incubados a 37°C. Depois de 7 dias com 5µl da suspensão padronizada de *Enterococcus faecalis* e 5µl da suspensão padronizada de *Candida albicans*, e a esta suspensão foi adicionado 10µl de caldo BHI.

Após contaminação, na entrada do canal radicular foi posicionada uma bolinha de algodão aprotogênica embebida em meio de cultura, e as placas contendo os espécimes contaminados foram vedadas e incubadas a 37°C durante 14 dias nos grupos contaminados com *Escherichia coli*, 21 dias nos grupos contaminados com *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* e um período total de 28 dias nos grupos contaminados com os microrganismos associados. Para a manutenção das condições nutricionais nos espécimes, 20µl de meio de cultura foi adicionado ao canal radicular a cada três dias.

4.5 Coleta do conteúdo do canal radicular

As coletas iniciais (coletas de confirmação) do conteúdo intracanal foram realizadas 24h anterior ao período de incubação inicial de 14 dias nos grupos contaminados com *Escherichia coli*, de 21 dias nos grupos contaminados com *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* e de 28 dias nos grupos contaminados com os microrganismos associados para confirmação da contaminação intracanal, e esta foi denominada “coleta 1”. Foi realizada outra coleta imediatamente após o tratamento dos canais radiculares com instrumentação e terapia fotodinâmica antimicrobiana ou somente com instrumentação, e esta foi denominada

“coleta 2”. As placas contendo os espécimes foram novamente incubadas por mais 7 dias e outra coleta foi realizada, sendo esta estabelecida como “coleta 3”. Após a coleta 3, foi inserida medicação intracanal e as placas contendo os espécimes foram incubadas por mais 14 dias onde ao final deste período foi realizada uma coleta do conteúdo do canal radicular denominada “coleta 4”. Em seguida a remoção da medicação intracanal, foi realizado um último período de incubação dos espécimes de 7 dias e uma última coleta do conteúdo do canal radicular, denominada “coleta 5” (Figura 4). As coletas foram realizadas no interior do fluxo laminar, onde primeiramente os canais foram preenchidos com soro fisiológico apirogênico (HalexIstar, Goiânia-GO. Brasil) evitando o extravasamento além do conduto do canal radicular. O soro, preenchendo toda a extensão do canal radicular, foi agitado com agulhas acopladas a seringas de 1 mL (Injex, Ourinhos-SP. Brasil) durante 1min e, a seguir, foram coletados 100µL do conteúdo do canal radicular. Este conteúdo foi transferido para tubo de polipropileno tipo Eppendorf contendo 900µL de soro fisiológico apirogênico obtendo uma diluição de 10^{-1} do conteúdo coletado do interior do canal radicular. A partir desta suspensão inicial, foram realizadas diluições decimais de 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e alíquotas de 100µL de todas as diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo agar Mac Conkey (Difco, Detroit – USA), nas coletas realizadas nos grupos contaminados com *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, contendo agar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit – USA), nas coletas realizadas nos grupos contaminados com *Candida albicans* e nos grupos contaminados com os microrganismos associados foram semeadas em agar BHI (Difco, Detroit – USA), agar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit – USA) com cloranfenicol e agar Enterococsel (Difco, Detroit – USA). As placas foram incubadas a 37°C por 48h, para verificação do crescimento microbiano.

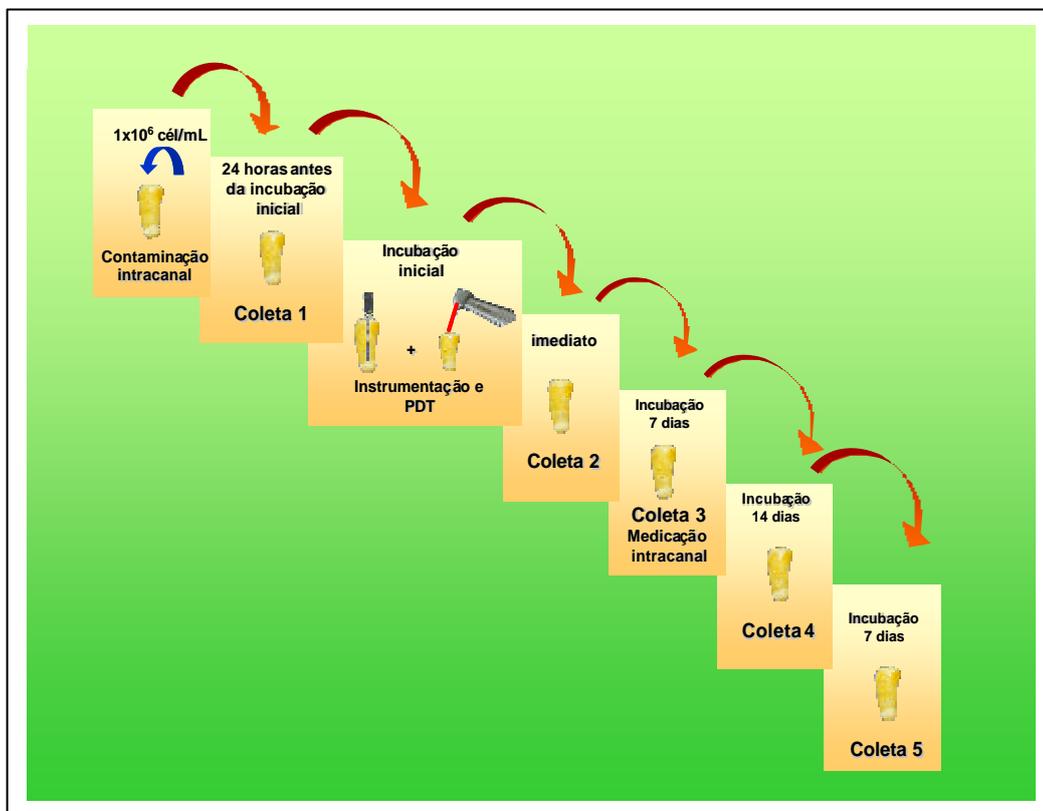


FIGURA 4 – Fluxograma esquematizando as coletas nos grupos experimentais.

4.6 Tratamento dos espécimes com instrumentação, Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal

Constatada a contaminação dos canais radiculares após incubação, os espécimes foram instrumentados até a lima Kerr n° 50 e escalonados até a lima Kerr n° 80. A cada troca de instrumento foi realizada irrigação com 3mL de soro fisiológico apirogênico. Seguida a instrumentação, nos grupos experimentais foi realizada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Para tanto, os canais radiculares e a espessura de dentina da região seccionada do canal foram preenchidos com a fórmula composta pela associação de corante azuleno a 25% e Endo-PTC (Manipulário, Taubaté-SP. Brasil) onde permaneceu por um

período de 5 min. Passado este período, foi realizada Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana através da ativação do corante por irradiação durante 3min utilizando laser diodo de baixa intensidade de AsGaAl (Twin Laser - MM Óptics, São Paulo-SP. Brasil), com comprimento de onda 660nm, ajuste de potência no painel de controle do aparelho em 40mW, utilizando-se sistema de entrega por fibra óptica de diâmetro de 365µm (MM Óptics, São Paulo-SP. Brasil) e potência de saída de fibra óptica mensurada em 30mW. A ativação do corante foi realizada segundo técnica Helicoidal preconizada por Gutknecht et al.⁴¹ e Segundo⁹⁷, promovendo movimentos helicoidais no sentido apical-cervical, para difusão da luz por toda a extensão do canal e espessura de dentina na região seccionada. Os movimentos foram repetidos aproximadamente 10 vezes/min (Figura 5). Os experimentos foram realizados respeitando-se os procedimentos de biossegurança segundo Lizarelli⁶¹.

Imediatamente após a instrumentação e realização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, foi realizada irrigação final dos canais radiculares com 10mL de solução fisiológica apirogênica para remoção do corante e foi coletada amostras do conteúdo do canal radicular conforme descrito no item 4.5 (coleta 2).

Os espécimes dos grupos controle foram instrumentados até espessura correspondente a lima Kerr nº 50 e escalonados até lima Kerr nº 80, utilizando como agente irrigante 3 mL de solução fisiológica apirogênica a cada troca de instrumento, entretanto não foram submetidos ao tratamento com terapia fotodinâmica antimicrobiana. Nestes grupos a coleta do conteúdo do canal radicular (coleta 2) foi realizada imediatamente após a instrumentação.

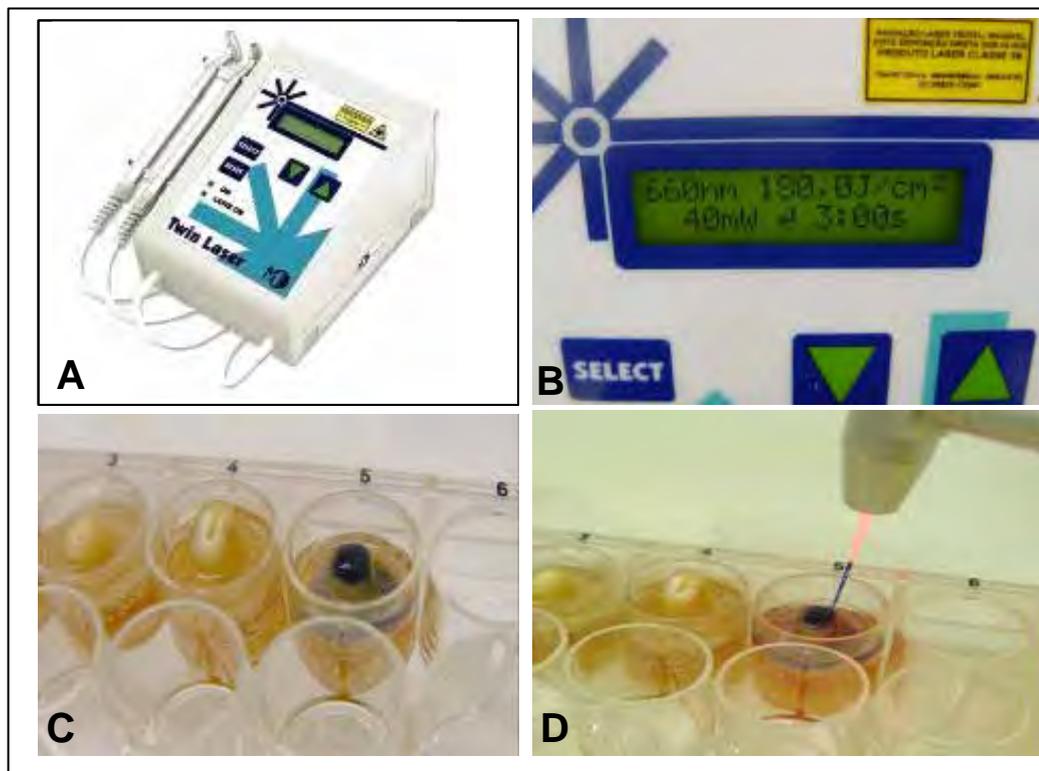


FIGURA 5 – (A) aparelho de emissão de irradiação laser Twin Laser-MM Optics; (B) painel de controle registrando o protocolo da irradiação utilizado no estudo; (C) foto mostrando o espécime preenchido com corante; (D) foto mostrando a inserção da fibra óptica no interior do canal radicular do espécime.

Em seguida, os canais radiculares foram preenchidos com solução fisiológica aprotogênica, selados com bolinha de algodão aprotogênica e incubados a 37°C por 7 dias. Após este período, foi realizada coleta do conteúdo dos canais radiculares (coleta 3) conforme descrito no item 4.5, e estes foram preenchidos com medicação intracanal composta por 1g de clorexidina gel 2% adicionada de 280µL polimixina B (Ophtalmos, São Paulo, Brasil). Para o procedimento foram utilizadas seringas de 3mL e agulhas acopladas preenchendo toda a extensão do canal e espessura de dentina na região seccionada. Em seguida, foi adaptada uma bolinha de algodão aprotogênica na entrada dos canais radiculares.

As raízes foram novamente incubadas por 37°C durante 14 dias e decorrido este período, os canais foram irrigados com 10mL de solução fisiológica apirogênica para remoção de remanescentes da medicação intracanal e foram coletadas amostras do interior do canal radicular (coleta 4), conforme procedimento descrito no item 4.5. Os canais foram novamente preenchidos com soro fisiológico, vedados em sua entrada com bolinhas de algodão apirogênicas e incubados por mais 7 dias. Passado este período de incubação foi realizada a última coleta do conteúdo do canal radicular (coleta 5), conforme descrito no item 4.5.

4.7 Quantificação de endotoxinas

As amostras obtidas em todas as coletas do canal radicular nos grupos contaminados com *Escherichia coli* e nos grupos dos microrganismos associados foram submetidas à análise quantitativa de endotoxina (lipopolissacarídeo-LPS) pelo método cinético cromogênico do Lisado de Amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL). Para submissão das amostras ao teste, o conteúdo coletado do canal radicular foi diluído seriadamente em tubos de polipropileno tipo eppendorf contendo água apirogênica (Cambrex Bio Science, Walkersville. USA) até diluição 10^{-3} , inicialmente analisada como diluição adequada ao teste cinético cromogênico na quantificação de endotoxina dos espécimes. Durante a realização das diluições os tubos foram agitados durante 1min e o conteúdo foi imediatamente transferido para os tubos obtendo-se as diluições seqüenciais. Foram também realizadas diluições da endotoxina padrão de *Escherichia coli* (*Escherichia coli* 055:B5 Endotoxin – Cambrex Bio Science, Walkersville. USA) em diferentes concentrações para representação dos padrões de comparação das amostras (curva-padrão).

Em seguida alíquotas de 100µl da diluição 10^{-3} das amostras do conteúdo do canal radicular foram distribuídas em poços de placas apirogênicas de cultura de célula de 96 poços em quadruplicata, sendo uma duplicata utilizada como controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina) e a outra duplicata para verificação da quantidade de endotoxina da amostra. Foram também adicionados aos poços das placas apirogênicas, 100µL de água apirogênica, utilizados como branco da reação, e padrões de endotoxina representando parâmetros conhecidos de endotoxina no teste (Figura 6).

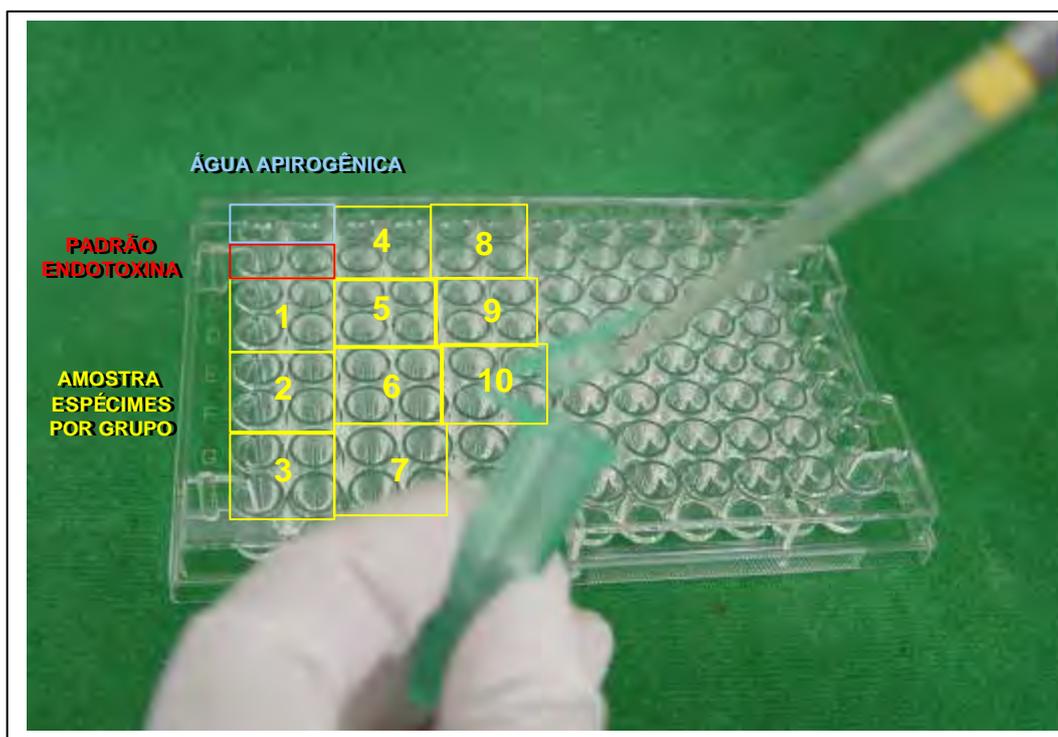


FIGURA 6 – Esquematização da montagem da placa de cultura de célula de 96 poços para realização do teste cinético cromogênico.

A placa devidamente montada foi incubada no leitor cinético QCL (Figura 7) a 37°C por 10min, conectado ao microcomputador com software Wink QCL específico ao gerenciamento do programa do leitor cinético para execução do teste com emissão de respectivos

relatórios. Passado período de incubação no leitor cinético, foram adicionados a cada poço da placa, 100 μ L do reagente cinético cromogênico do LAL (Cambrex Bio Science, Walkersville. USA) resuspenso em água apirogênica conforme orientação do fabricante (Figura 8). O procedimento foi realizado com auxílio de micropipeta de 8 canais e ponteiros apirogênicos (Figura 8).

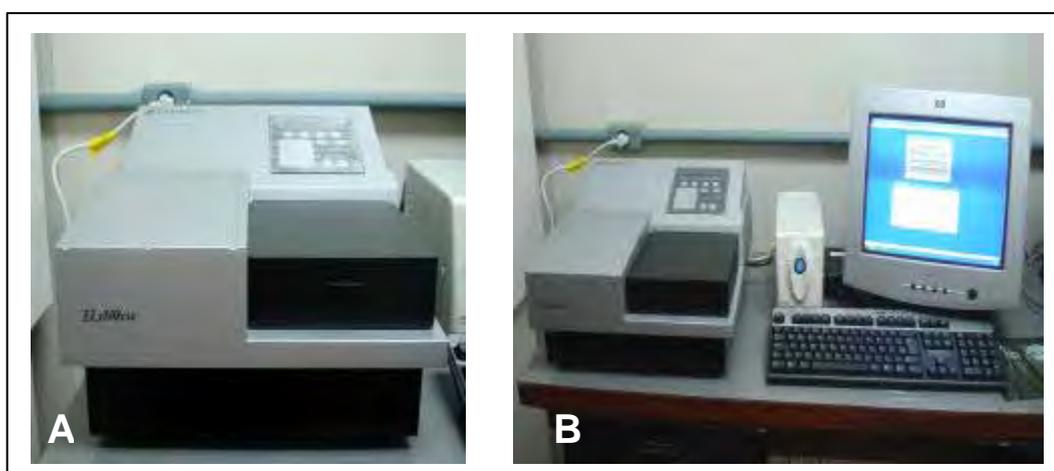


FIGURA 7 – (A) Leitor cinético cromogênico QCL; (B) leitor cinético cromogênico QCL acoplado ao microcomputador.

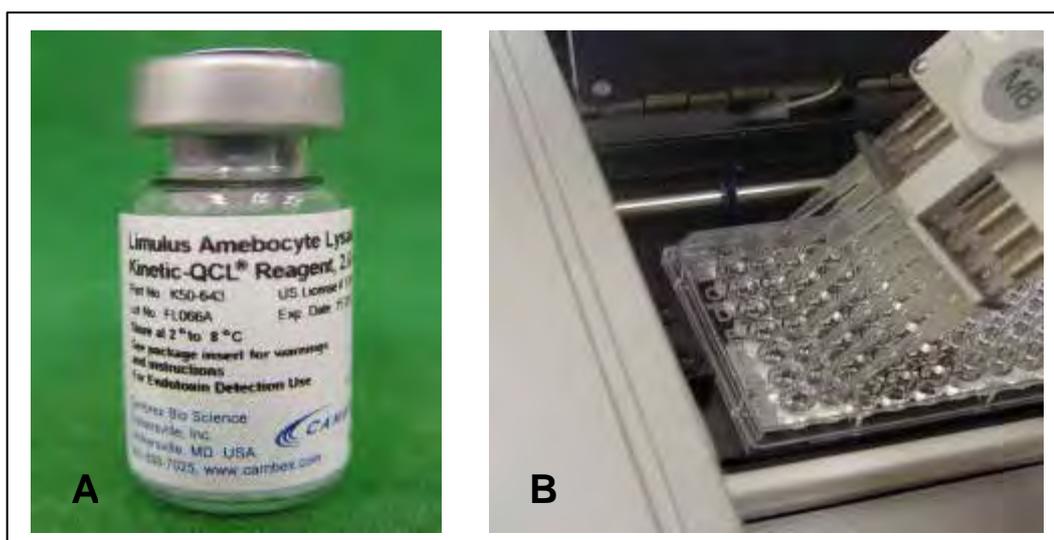


FIGURA 8 – (A) Foto do reagente LAL; (B) foto da distribuição do reagente LAL nos poços da placa contendo amostras dos espécimes.

Após a distribuição do reagente LAL nos poços da placa de cultura de células foi iniciado o ensaio cinético cujo software da leitora de microplacas realiza monitoramento de forma contínua em uma absorvância de 405nm em cada poço da microplaca. O leitor determina o tempo necessário para aumentar a absorvância de cada poço a 0,2 unidades de absorvância, que será denominado tempo de reação. O software WinkQCL realizou o cálculo automático fazendo uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Na seqüência, o resultado (UE/mL) de cada amostra e os parâmetros da curva-padrão foram impressos no formato de relatório.

4.8 Análise estatística

Inicialmente, foi realizada a análise descritiva dos dados de cada grupo de microrganismo, favorecendo a visualização das diferenças que mostraram relevância estatística. Nesta análise, os dados de cada grupo experimental, foram apresentados como valores de tendência central (média) e valores de dispersão (desvio-padrão, máximo e mínimo), com o objetivo de descrição dos valores de interesse em questão.

Objetivando mais coerência na apresentação dos resultados, os dados coletados foram agrupados, conforme metodologia experimental, para análise da efetividade antimicrobiana e análise da neutralização de endotoxina, onde foi avaliada a influência da variável experimental (tratamento com instrumentação associada à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal) sobre a variável resposta (número de unidades formadoras de colônias por mL dos

microrganismos utilizados na contaminação, ou unidade de endotoxina por mL).

Os dados relativos as contagens de unidades formadoras de colônias e unidade de endotoxina, foram submetidos aos testes estatísticos mediante software SPSS for Windows Evaluation Version (2006, versão 15.0, Chigago, USA).

Desta maneira, na análise da efetividade antimicrobiana a representação estatística foi baseada nos dados coletados para cada espécie de microrganismo selecionada no estudo. Foram comparados, nos grupos de microrganismos, os dados pareados de mesma unidade amostral, neste caso comparações realizadas entre as diferentes coletas no mesmo grupo de espécimes (controle ou teste), selecionando-se o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon, de nível de significância de 5%, e também foram comparados os dados não pareados, referentes as comparações entre coletas de grupos de espécimes diferentes (controle e teste) de contaminação pelo mesmo microrganismo utilizando-se, neste caso, o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%.

Somente para grupo contaminado com os microrganismos associados houve também a comparação com os dados das diferentes coletas (grupos controle e teste) realizadas nos grupos dos microrganismos contaminados separadamente, selecionado o teste não paramétrico Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Os mesmos testes estatísticos foram selecionados para a análise da neutralização de endotoxinas, comparando-se os dados do grupo de espécimes contaminados com *Escherichia coli* somente, do grupo contaminado com os microrganismos associados e ambos grupos entre si.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da efetividade antimicrobiana

Os valores obtidos na avaliação da efetividade da instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal, foram expressos pelo número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

Foi realizada análise descritiva dos dados obtidos entre as coletas nos grupos controle e teste contaminados com *Candida albicans*, destacando-se valores de interesse referente a média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice A).

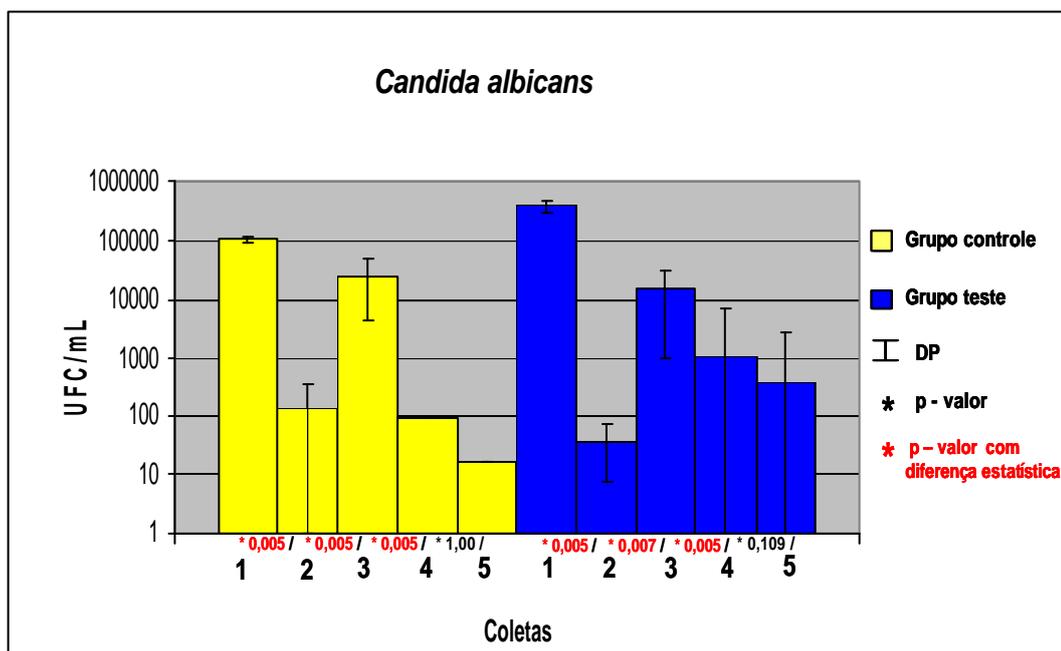
Por meio do teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), para comparação de dados pareados de mesma unidade amostral, foi constatado que no grupo controle dos espécimes contaminados com *Candida albicans*, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias (UFC/mL) da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1, realizada para confirmação da contaminação, foi maior que a coleta 2, realizada imediatamente após tratamento dos espécimes com instrumentação, demonstrando que o tratamento com instrumentação reduziu significativamente o número de UFC/mL. Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3, realizada após período de sete dias do tratamento com instrumentação, foi maior que a média da coleta 2, o que denota aumento considerável do número de UFC/mL após incubação de sete dias posterior ao tratamento com instrumentação, onde observou-se que a redução imediata ao tratamento não se manteve

após período de incubação. A diferença entre as médias obtidas na coleta 3 e coleta 4 foi estatisticamente relevante ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4, realizada após período de 14 dias de incubação com medicação intracanal de polimixina B e clorexidina gel 2%, foi menor que a da coleta 3, comprovando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,00$) entre a coleta 4 e coleta 5, onde foi possível observar que mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve crescimento de UFC/mL, mantendo-se a eficácia de redução alcançada no período de incubação com medicação intracanal.

Entre as coletas do grupo teste dos espécimes contaminados com *Candida albicans*, por meio do teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias de UFC/mL da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1, realizada para confirmação da contaminação, foi maior que a coleta 2, realizada imediatamente após tratamento dos espécimes com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, demonstrando que o tratamento reduziu significativamente, de forma imediata, o número de UFC/mL de *Candida albicans*. Na comparação entre as coletas do grupo teste contaminado com *Candida albicans*, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,007$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3, realizada após período de sete dias do tratamento com instrumentação associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, foi maior que a média da coleta 2, demonstrando aumento no número de UFC/mL de *Candida albicans* após incubação de sete dias posterior ao tratamento com instrumentação, comprovando que a redução imediata ao tratamento não se manteve após período de incubação no grupo teste também. Na análise das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4, observou-se que foram diferentes estatisticamente ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da

coleta 4, realizada após período de 14 dias de incubação com medicação intracanal, foi menor que a da coleta 3, comprovando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal, embora não tenha ocorrido redução de 100% no número de UFC/mL de *Candida albicans*. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,109$) entre a coleta 4 e coleta 5, onde foi possível observar que mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve aumento estatisticamente relevante no número de UFC/mL de *Candida albicans*, mantendo-se a eficácia alcançada no período de incubação com medicação intracanal.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* nas coletas dos grupos controle e teste.



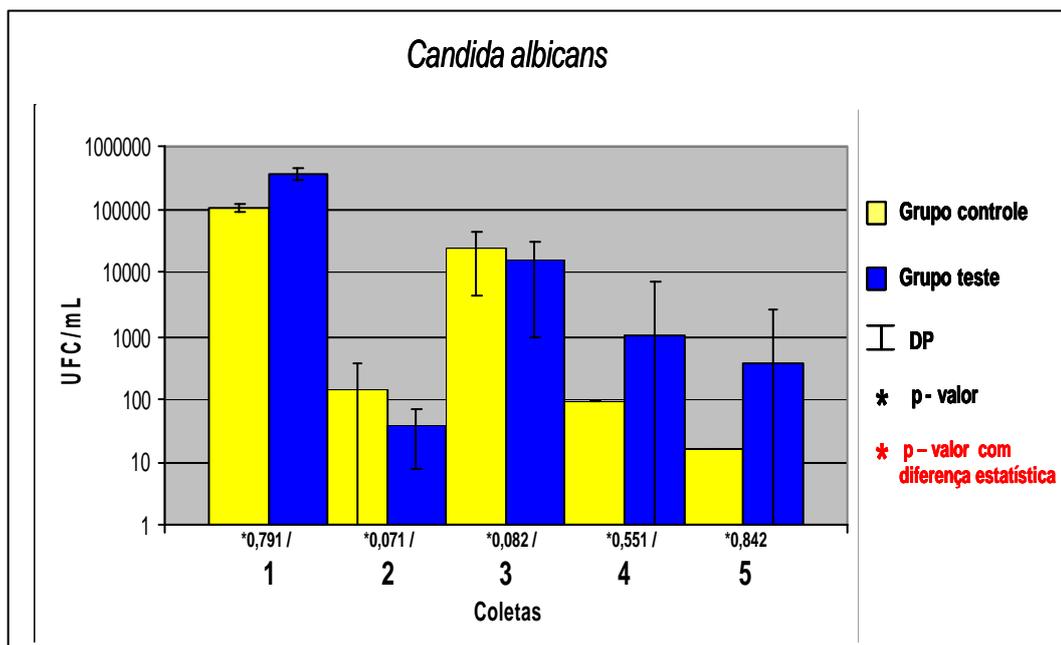
coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 9 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste dos espécimes contaminados com *Candida albicans*.

Os dados de UFC/mL, referentes as coletas realizadas no grupo controle e teste dos espécimes contaminados com *Candida albicans*, foram comparados de forma não pareada, selecionando para a análise o teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5%. Na comparação dos resultados entre as coletas 1, 2, 3, 4 e 5 dos grupos teste e controle não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, demonstrando que não houve diferença no número de UFC/mL de *Candida albicans* entre as mesmas coletas realizadas no grupo controle, em que utilizou-se somente o tratamento com instrumentação, e o grupo teste, onde foi utilizado o tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Também não foi observada diferença significativa na redução alcançada ao final do ciclo experimental com administração da medicação intracanal no grupo teste comparado ao controle.

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste.

Na análise dos resultados obtidos nas coletas dos grupos controle e teste contaminados com *Enterococcus faecalis* foi utilizada a análise descritiva dos dados destacando-se valores de interesse referente à média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice B).



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 10 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=0,5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com *Candida albicans*.

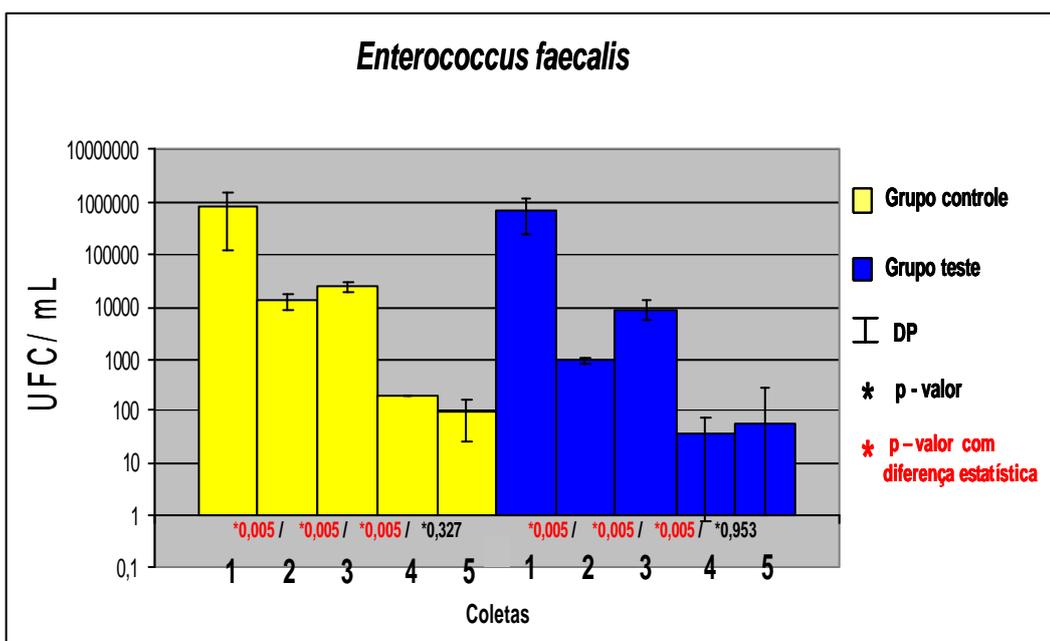
Para a comparação dos dados pareados nos grupos controle de espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis* foi selecionado o teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), onde foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias de UFC/mL da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior que a coleta 2, demonstrando que o tratamento com instrumentação reduziu significativamente a média de UFC/mL de forma imediata. Na comparação das médias de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as coleta 2 e coleta 3 foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$), onde pôde-se observar que a média da coleta 3 foi maior que a média da coleta 2, mostrando aumento considerável do número de UFC/mL passado sete dias do tratamento com instrumentação, sendo que a redução imediata ao tratamento não foi

mantida após período de incubação. No caso das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4 foi observado que houve diferença estatisticamente relevante ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4, realizada após período de 14 dias de incubação com medicação intracanal, foi menor que a da coleta 3, denotando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal. Na comparação das médias de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre a coleta 4 e coleta 5 não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,327$), comprovando que, mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve aumento relevante de UFC/mL, mantendo a eficácia de redução alcançada no período de incubação com medicação intracanal.

Quanto as coletas no grupo teste dos espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis*, por meio do teste estatístico Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi demonstrado que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias de UFC/mL da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior que a coleta 2, comprovando a redução imediata significativa do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Na comparação entre as coletas no grupo teste contaminado com *Enterococcus faecalis*, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3 foi estatisticamente maior com relação a média de UFC/mL na coleta 2, levando a observação de que após período de incubação de sete dias do tratamento ocorreu aumento no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis*, mostrando que a condição de redução alcançada imediatamente após o tratamento não foi mantida. Na análise das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4, observou que foram diferentes estatisticamente ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4, foi menor que a da coleta 3, comprovando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal, embora não tenha ocorrido redução total no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis*. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,953$) entre

a coleta 4 e coleta 5, onde foi possível observar que mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve crescimento estatisticamente relevante no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis*, mantendo-se a eficácia alcançada no período de incubação com medicação intracanal.

Na Figura 11 estão representados os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), na análise comparativa das médias dos valores de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as coletas, nos grupos controle e teste.



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

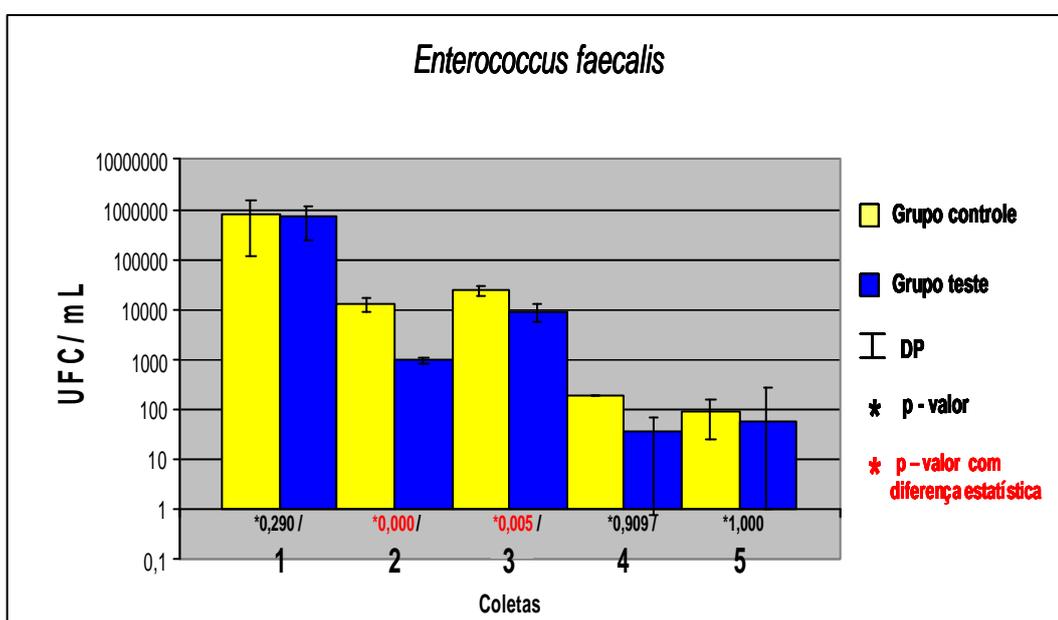
FIGURA 11 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis*.

Para a realização da análise dos resultados relacionando as coletas realizadas no grupo controle com as do grupo teste dos

espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis*, foi selecionado o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Na comparação dos resultados entre as coletas 1 dos grupos teste e controle não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p=0,290$), demonstrando que não houve diferença no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as mesmas coletas realizadas no grupo controle, em que se utilizou somente o tratamento com instrumentação, e o grupo teste, onde foi utilizado o tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Na análise dos resultados relacionando os grupos controle e teste contaminados com *Enterococcus faecalis* nas coletas 2, pôde-se verificar diferença estatisticamente significante ($p=0,000$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 2 do grupo teste foi menor que no grupo controle, significando que a redução imediata do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana foi significativamente melhor em relação ao tratamento utilizando-se somente a instrumentação, no caso dos espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis*. Na análise das médias de UFC/mL obtidas nas coletas 3 relacionando o grupo controle e teste, foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 3 no grupo teste foi menor que a mesma coleta no grupo controle, demonstrando que o tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, embora não tenha impedido aumento da média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* (como observado na descrição comparativa entre a coleta 2 e coleta 3 no grupo teste de espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis*), não possibilitou um aumento da média de UFC/mL tanto quanto observado no grupo de tratamento com instrumentação somente. Na análise dos resultados comparando-se as coletas 4 e coletas 5 dos grupos controle e teste, não houve diferença significativa estatisticamente ($p=0,909$ e $p=1,000$ respectivamente), denotando que após a utilização da medicação intracanal, a média de

UFC/mL no grupo controle e teste alcançou valores semelhantes e estes foram mantidos mesmo após remoção da medicação intracanal.

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney (5%), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste.



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 12 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis*.

Para a interpretação dos resultados obtidos nas coletas dos grupos controle e teste contaminados com *Escherichia coli*, foi realizada uma análise descritiva dos dados destacando-se valores de interesse referente à média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice C).

Através do teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$) foi constatado que no grupo controle dos espécimes contaminados com

Escherichia coli, foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias de UFC/mL da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior comparado á coleta 2, possibilitando considerar que o tratamento com instrumentação reduziu significativamente o número de UFC/mL de *Escherichia coli*. Também foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,028$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3 foi maior que a média da coleta 2, denotando, com o aumento do número de UFC/mL de uma coleta para outra, que a redução imediata ao tratamento não conservou-se após período de incubação. Quanto a análise dos resultados entre a coleta 3 e coleta 4, houve diferença estatisticamente relevante ($p=0,018$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4 foi menor que a da coleta 3, com diminuição de 100% da média de UFC/mL na coleta 4, demonstrando que a utilização da medicação intracanal foi capaz de eliminar totalmente UFC/mL de *Escherichia coli*. Foi possível observar que a efetividade da medicação intracanal se manteve, mesmo após sua remoção e período de incubação, visto que não houve diferença estatisticamente significativa ($P=1,00$) entre a coleta 4 e coleta 5, evidenciando que a eficiência de 100% foi mantida também na coleta 5.

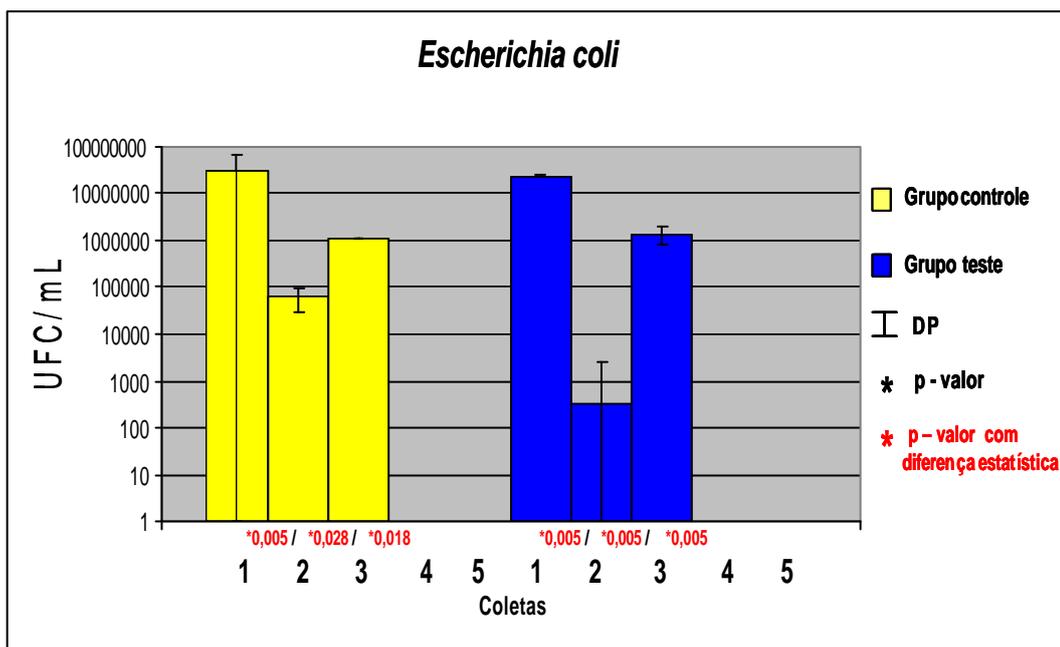
No caso das coletas do grupo teste dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*, por meio do teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi possível observar a ocorrência de diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias de UFC/mL da coleta 1 e coleta 2, onde o fato da média de UFC/mL ter apresentado valor maior em comparação com a coleta 1, denota-se que imediatamente após tratamento dos espécies com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, houve redução significativa do número de UFC/mL. Na comparação entre as coletas no grupo teste contaminado com *Escherichia coli*, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,005$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3 foi maior que a média da coleta

2, demonstrando aumento no número de UFC/mL de *Escherichia coli* após incubação de sete dias posterior ao tratamento com instrumentação, observando-se que a redução imediata ao tratamento não permaneceu após período de incubação no grupo teste também. Na análise das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4, foi possível observar que foram diferentes estatisticamente ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4 foi comprovadamente menor que a da coleta 3, confirmando a diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal, com redução de 100% no número de UFC/mL de *Escherichia coli*. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=1,00$) entre a coleta 4 e coleta 5, possibilitando a observação de que a eficácia alcançada no período de incubação com medicação intracanal foi mantida após período de incubação com remoção da medicação.

Na Figura 13 foram apresentados os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Escherichia coli* entre as coletas, nos grupos controle e teste.

Os resultados foram também analisados comparando as coletas realizadas no grupo controle com as realizadas no grupo teste dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*. Com este intuito foi selecionado o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Comparando-se os resultados foi possível observar que somente entre as coletas 2 houve diferença estatística significativa ($p=0,00$), sendo que a média de UFC/mL de *Escherichia coli* na coleta 2 do grupo teste foi significativamente menor comparado a mesma coleta no grupo controle, demonstrando que o tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana foi, de forma imediata, melhor que o tratamento utilizando-se somente a instrumentação no grupo de espécimes contaminados com *Escherichia coli*. Comparando-se as coletas 1, 3, 4 e 5, não foi possível observar diferença estatística nas mesmas coletas do grupo controle e teste. Este fato mostra que ao final

do ciclo experimental, não há diferença nos resultados obtidos nos grupos controle e teste, mesmo que de forma imediata tenha sido observado diferença na média de UFC/mL de *Escherichia coli* entre os grupos teste e controle.



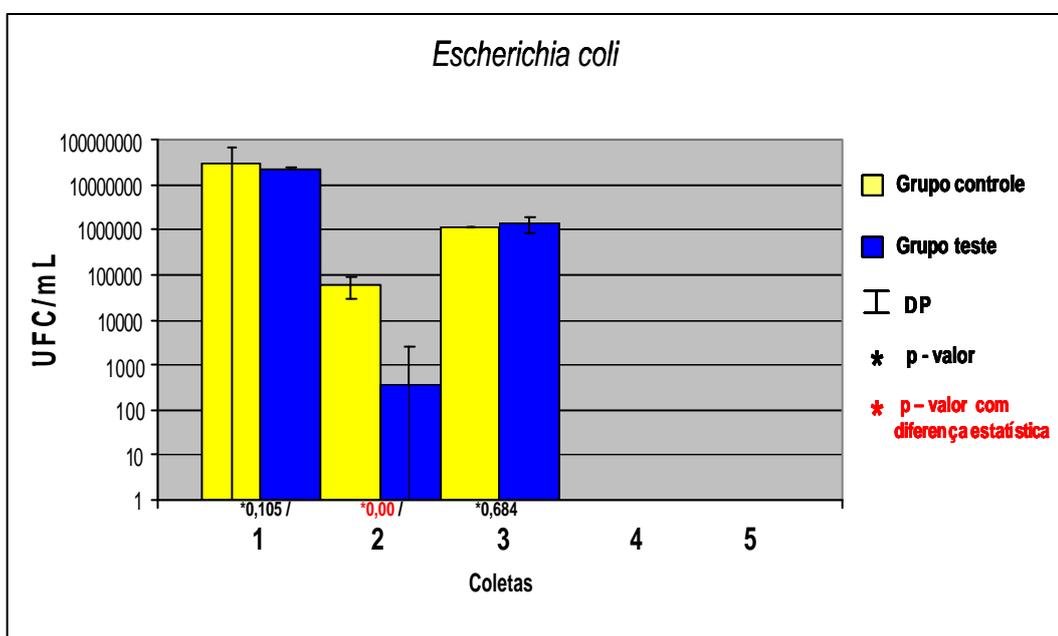
coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 13 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*.

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Escherichia coli* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste.

Foram analisados os resultados dos dados obtidos nas coletas dos grupos teste e controle dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, além de serem realizadas análises

comparativas com os resultados obtidos nos grupos de biofilmes monoespécies. Os resultados da efetividade do tratamento frente à *Candida albicans* no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados teve por base a análise descritiva dos resultados de modo a destacar os valores de interesse referente à média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice D).



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 14 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*.

Para a comparação dos dados de *Candida albicans* nos grupos controle de espécimes contaminados com os microrganismos associados, foi selecionado o teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$). Com base no teste estatístico foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,028$) comparando-se as médias de UFC/mL de *Candida albicans* entre as coleta 1 e coleta 2, sendo que a

média da coleta 1, foi maior que a coleta 2, demonstrando que o tratamento com instrumentação reduziu significativamente o número de UFC/mL de forma imediata. Na comparação das médias de UFC/mL de *Candida albicans* entre as coleta 2 e coleta 3, não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,345$), mostrando que não ocorreu crescimento considerável no número de UFC/mL de *Candida albicans* após período de incubação de sete dias do tratamento utilizando-se somente a instrumentação. No caso das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4 foi observado que houve diferença estatisticamente relevante ($p=0,036$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4 foi menor que a da coleta 3, denotando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal. Na comparação entre as médias de UFC/mL de *Candida albicans* no grupo dos microrganismos associados, pôde-se observar que entre a coleta 4 e coleta 5 houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,011$), sendo que a média de UFC/mL foi menor na coleta 5, demonstrando que após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, houve diminuição relevante na média de UFC/mL na última coleta com redução de 100% na média de UFC/mL de *Candida albicans* ao final do ciclo experimental.

Quanto aos dados de *Candida albicans* no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, por meio do teste estatístico Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi demonstrado que houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,028$) entre as médias de UFC/mL da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior que a coleta 2, comprovando a redução imediata significativa do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Na comparação dos resultados de *Candida albicans* entre as coletas no grupo teste contaminado com os microrganismos associados, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3 foi estatisticamente maior com relação a média de UFC/mL de *Candida albicans* da coleta 2, demonstrando que, após

período de incubação de sete dias do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, ocorreu aumento no número de UFC/mL onde é possível observar que a condição de redução alcançada imediatamente após o tratamento não foi mantida. Na análise das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4, observou-se que foram diferentes estatisticamente ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4, foi significativamente menor em comparação com a coleta 3, comprovando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal, embora não tenha ocorrido redução total no número de UFC/mL de *Candida albicans*. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,374$) entre a coleta 4 e coleta 5, onde foi possível observar que mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve crescimento estatisticamente relevante no número de UFC/mL de *Candida albicans*, mantendo-se a eficácia alcançada no período de incubação com medicação intracanal.

Na Figura 15 estão representados os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), na análise comparativa entre as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* nas coletas dos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados.

Os resultados para *Candida albicans* foram também analisados comparando as coletas realizadas no grupo controle com as realizadas no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados. Para este, foi selecionado o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Foi observado que entre as coletas 1 do grupo controle comparado ao grupo teste, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,157$), ou seja, o número de UFC/mL de *Candida albicans* foi estatisticamente semelhante entre as coletas 1 realizadas no grupo controle, em que utilizou-se somente o tratamento com instrumentação, e o grupo teste, onde foi utilizado o tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

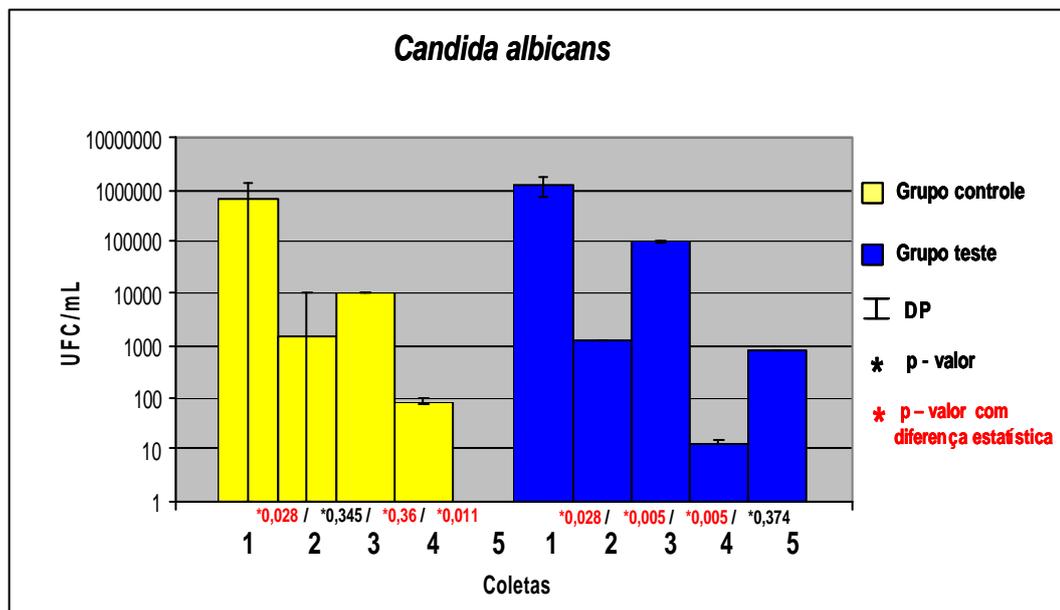


FIGURA 15 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* nas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados.

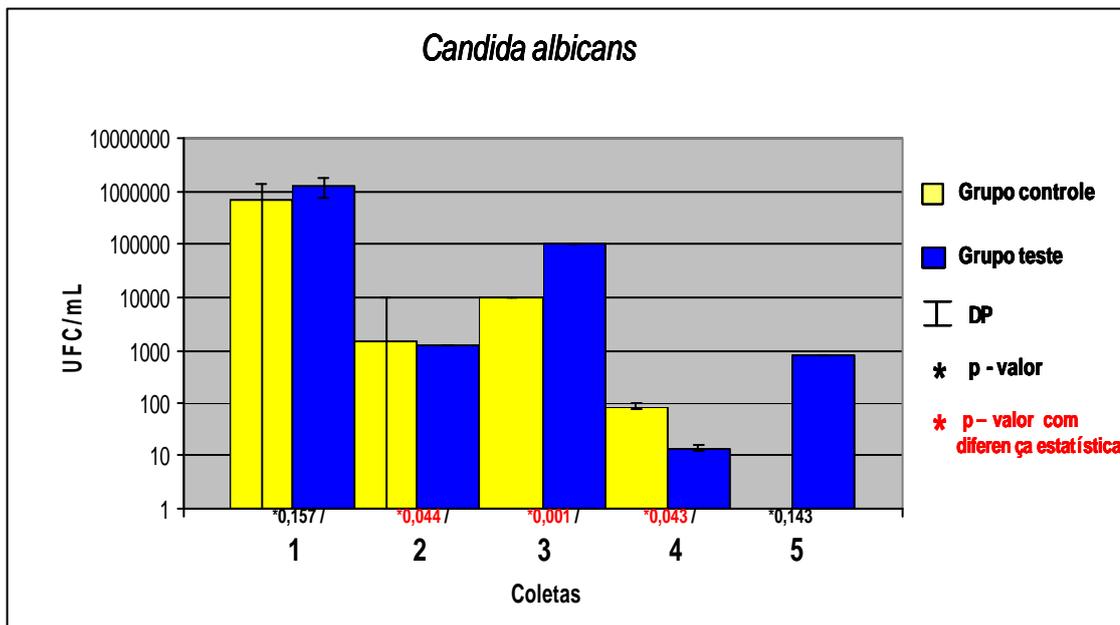
Comparando-se as coletas 2, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significante ($p=0,044$) no número de UFC/mL de *Candida albicans*, sendo que a média de UFC/mL no grupo teste foi menor que no grupo controle, confirmando que, neste caso, o tratamento com instrumentação associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana foi imediatamente melhor na redução de UFC/mL de *Candida albicans*.

Na análise dos resultados relacionando os grupos controle e teste contaminados com *Candida albicans* nas coletas 3, pôde-se verificar diferença estatisticamente significante ($p=0,001$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 3 do grupo teste foi maior que no grupo controle, significando que a redução imediata do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no grupo teste não se manteve menor comparado ao grupo controle e no

grupo controle a redução imediata ao tratamento com instrumentação foi mantida após período de incubação. Na análise dos resultados comparando-se as coletas 4 dos grupos controle e teste, houve diferença significativa estatisticamente ($p=0,043$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4 do grupo teste foi menor que no grupo controle, denotando que após a utilização da medicação intracanal, embora o número de UFC/mL de *Candida albicans* tenha aumentado após período de incubação do tratamento com instrumentação associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, a média de UFC/mL no grupo teste apresentou uma redução maior que o observado no grupo controle. Quanto as coletas 5 dos grupos teste e controle, não houve diferença estatística significativa ($p=0,143$) demonstrando que ao final do ciclo experimental não há diferença significativa no número de UFC/mL de *Candida albicans* utilizando-se ambos tipos de tratamento.

A Figura 16 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste nos espécimes contaminados com os microrganismos associados.

Na análise dos resultados comparando o comportamento de *Candida albicans* no ciclo experimental de contaminação monoespécie com o ciclo de contaminação multiespécies (microrganismos associados) foi selecionado o teste estatístico Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Com base no teste foi possível verificar que foi observada diferença ($p=0,0006$) de comportamento entre as coletas 2 dos grupos teste, sendo que a média de UFC/mL de *Candida albicans* na coleta 2 do grupo dos espécimes com microrganismos associados foi maior, demonstrando que a redução imediata ao tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana foi melhor no grupo monoespécie de contaminação com *Candida albicans*.



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 16 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados.

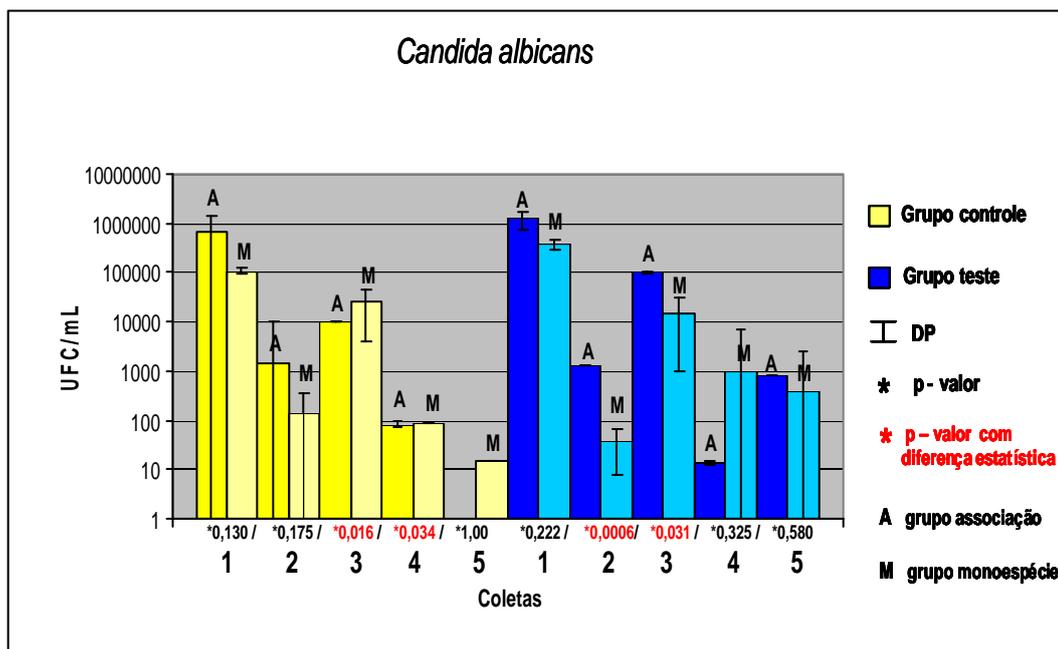
Nos grupos teste também foram observadas diferenças estatísticas entre as coletas 3, sendo que a média de UFC/mL da coleta 3 do grupo teste dos espécimes contaminados com microrganismos associados foi maior que no grupo de contaminação monoespécie, mostrando que embora nos dois casos tenha sido observado aumento na média de UFC/mL de *Candida albicans*, o aumento foi mais significativo no grupo teste dos microrganismos associados. Não foi observada diferença estatisticamente relevante para *Candida albicans* nas demais coletas comparando-se os grupos teste de contaminação mono e multiespécie.

Quanto aos resultados de *Candida albicans* dos grupos controle de contaminação mono e multiespécie houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,016$) entre as coletas 3, sendo que a

média de UFC/mL de *Candida albicans* no grupo dos microrganismos associados foi menor em relação ao grupo de contaminação monoespécie. Este fato denota que embora nas duas situações ocorra aumento do número de UFC/mL depois de sete dias do tratamento com instrumentação, este aumento é mais pronunciado no grupo de contaminação monoespécie. Também foi verificada diferença estatística ($p=0,034$) entre as coletas 4, mas embora o teste estatístico aponte como melhor redução com utilização de medicação intracanal o grupo dos microrganismos associados, o fato de em ambos casos ter sido relevante a diminuição comparando-se as coletas 3 com as coletas 4 dentro do mesmo grupo, seria equivocado considerar a indicação estatística que entre as coletas 4 do grupo controle de contaminação mono e multiespécies haja algum grupo que apresentou uma melhor performance de diminuição das médias de UFC/mL de *Candida albicans*. Não foram verificadas diferenças estatística entre as demais coletas nos grupos controle de contaminação mono e multiespécie.

A Figura 17 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste nos espécimes com contaminação mono e multiespécies.

Foram analisados os resultados dos dados obtidos nas coletas dos grupos teste e controle dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, além de serem realizadas análises comparativas com os resultados obtidos nos grupos de biofilmes monoespécies. Os resultados da efetividade do tratamento frente à *Enterococcus faecalis* no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados teve por base a análise descritiva dos resultados de modo a destacar os valores de interesse referente à média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice E).



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 17 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Candida albicans* nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.

Para a comparação dos dados de *Enterococcus faecalis* nos grupos controle de espécimes contaminados com os microrganismos associados, foi selecionado o teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$). Com base no teste estatístico foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) comparando-se as médias de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1, foi maior que a coleta 2, demonstrando que o tratamento com instrumentação reduziu significativamente o número de UFC/mL de forma imediata. Na comparação das médias de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as coleta 2 e coleta 3, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$), mostrando que ocorreu crescimento considerável no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* após período de incubação de sete dias do tratamento utilizando-

se somente a instrumentação. No caso das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4 foi observado que houve diferença estatisticamente relevante ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4 foi consideravelmente menor que a da coleta 3, denotando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal. Na comparação entre as médias de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* no grupo dos microrganismos associados, pôde-se observar que entre a coleta 4 e coleta 5 não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p=0,083$), demonstrando que mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve crescimento de UFC/mL, mantendo-se a eficácia de redução alcançada no período de incubação com medicação intracanal, inclusive alcançando 100% de redução da média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* no final do ciclo experimental.

Quanto aos dados de *Enterococcus faecalis* no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, por meio do teste estatístico Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi demonstrado que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias de UFC/mL da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior que a coleta 2, comprovando a redução imediata significativa do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Na comparação dos resultados de *Enterococcus faecalis* entre as coletas no grupo teste contaminado com os microrganismos associados, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3 foi estatisticamente maior com relação a média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* da coleta 2, demonstrando que, após período de incubação de sete dias do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, ocorreu aumento no número de UFC/mL onde é possível observar que a condição de redução alcançada imediatamente após o tratamento não foi mantida também neste caso. Na análise das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4, observou-se que foram diferentes estatisticamente ($p=0,005$), sendo que

a média de UFC/mL da coleta 4, foi significativamente menor em comparação com a coleta 3, comprovando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal, embora não tenha ocorrido redução total no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis*. Entre a coletas 4 e coleta 5 foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,017$), sendo que na coleta 5 ocorreu aumento da média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis*, denotando que a redução alcançada com o uso da medicação intracanal não foi mantida após período de incubação.

Na Figura 18 estão representados os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), na análise comparativa das médias dos valores de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* das coletas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

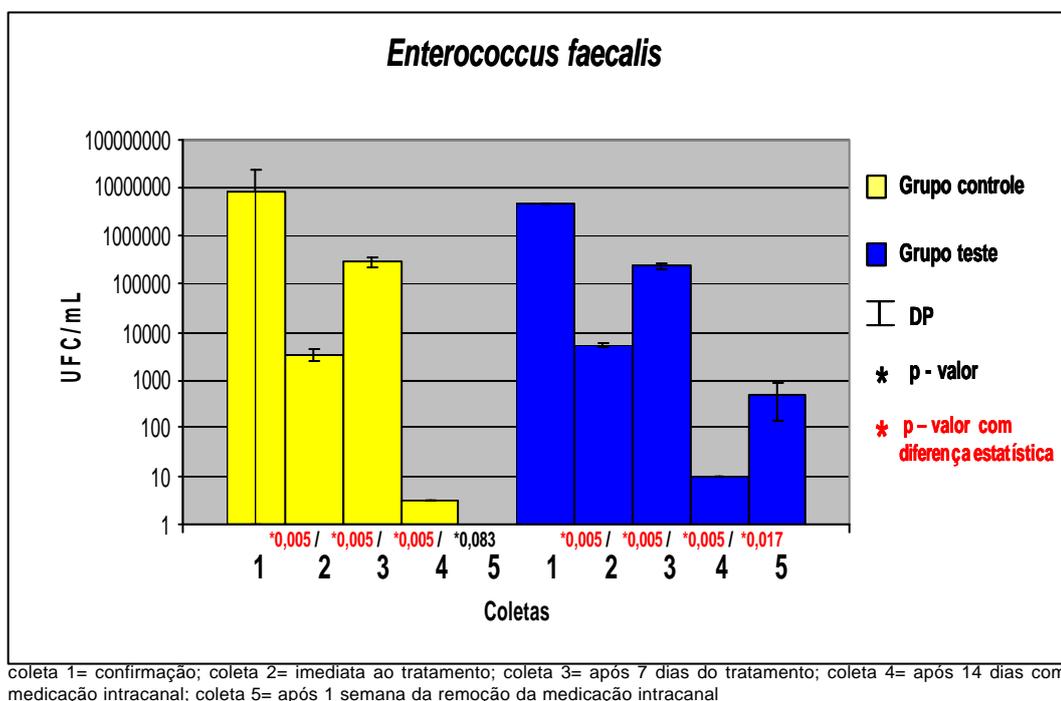
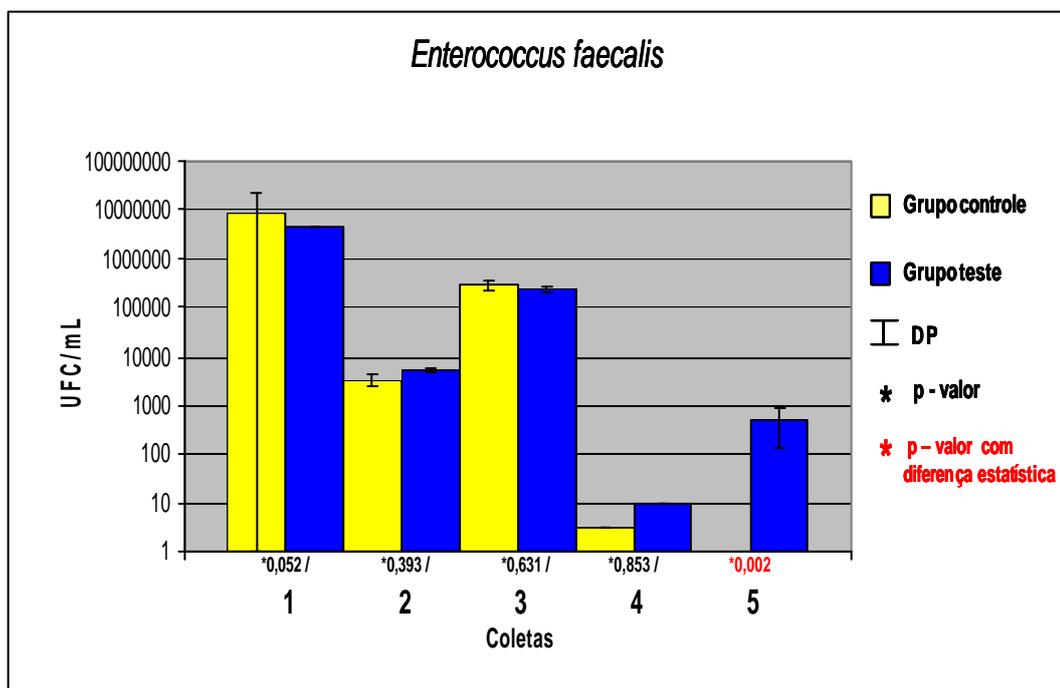


FIGURA 18 – Gráfico demonstrando os resultados para *Enterococcus faecalis* obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

Os resultados para *Enterococcus faecalis* foram também analisados comparando as coletas realizadas no grupo controle com as realizadas no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados. Para este, foi selecionado o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Foi observado que houve diferença estatisticamente significativa somente nas coletas 5, sendo que a média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* na coleta 5 do grupo teste foi maior que a do grupo controle, cuja redução alcançou 100%. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* nas demais coletas comparando-se grupo teste com controle.

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste nos espécimes contaminados com os microrganismos associados.

Na análise dos resultados comparando o comportamento de *Enterococcus faecalis* no ciclo experimental de contaminação monoespécie com o ciclo de contaminação multiespécies (microrganismos associados) foi selecionado o teste estatístico Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Com base no teste não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa ($p=0,739$) na média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* quanto ao comportamento das coletas 1 dos grupos teste com contaminação monoespécie em relação à contaminação com microrganismos associados. Com relação a média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* nas coletas 2 dos grupos teste houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,011$), sendo que a média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* na coleta 2 do grupo dos espécimes com microrganismos associados foi maior, demonstrando que a redução imediata ao tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana foi melhor no grupo monoespécie de contaminação com *Enterococcus faecalis*



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 19 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

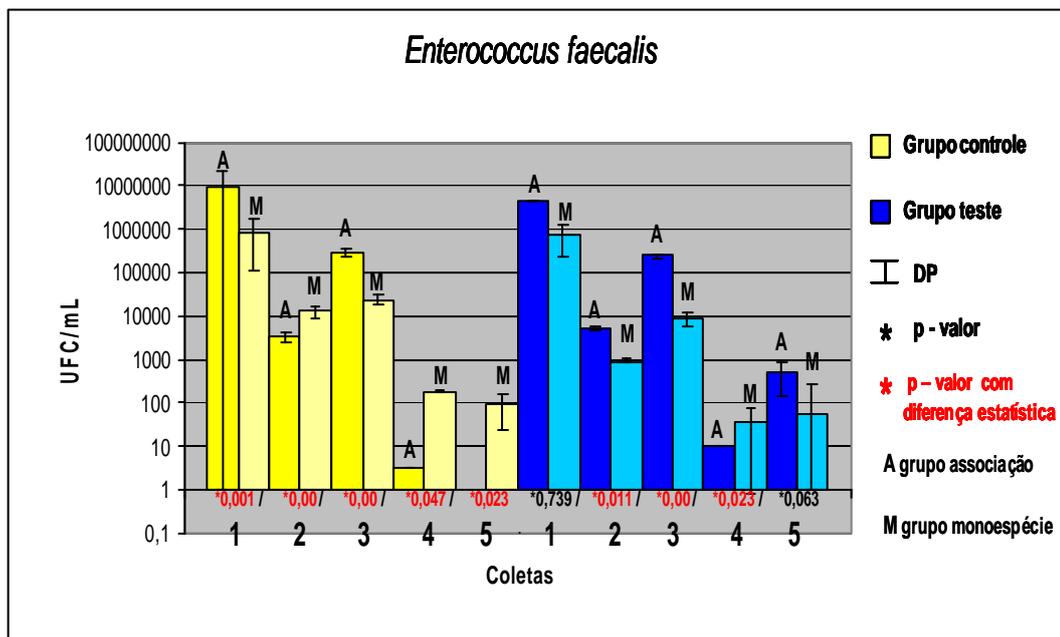
Nos grupos teste também foi observada diferença estatística ($p=0,00$) entre as coletas 3, sendo que a média de UFC/mL da coleta 3 do grupo teste dos espécimes contaminados com microrganismos associados foi maior que no grupo de contaminação monoespécie, mostrando que embora nos dois casos tenha sido observado aumento na média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis*, o aumento foi mais significativo estatisticamente no grupo teste dos microrganismos associados. Quanto as coletas 4, foi observada diferença estatisticamente relevante ($p=0,23$) para *Enterococcus faecalis* comparando-se os grupos teste de contaminação mono e multiespécie, sendo que a média de UFC/mL na coleta 4 do grupo teste de microrganismos associados foi menor, possibilitando descrever que a

medicação intracanal apresentou redução melhor no grupo de contaminação com os microrganismos associados, no caso de *Enterococcus faecalis*. Nas coletas 5, não ocorreram diferenças significantes ($p=0,63$) entre os grupos teste de *Enterococcus faecalis* de contaminação mono ou multiespécies.

Os resultados de *Enterococcus faecalis* dos grupos controle de contaminação mono e multiespécie mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$) entre as coletas 1, sendo que a média de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* no grupo dos microrganismos associados foi maior em relação ao grupo de contaminação monoespécie. Este fato denota que embora nas demais coletas ocorram diferenças estatísticas da média de UFC/mL, seria equivocado considerar a indicação estatística entre as coletas do grupo controle de contaminação mono e multiespécies, já que a diferença nas coletas 1, realizada para confirmação de contaminação, determina tendência de diferenças estatísticas nas demais coletas.

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste nos espécimes com contaminação mono e multiespécies.

Foram analisados os resultados dos dados obtidos nas coletas dos grupos teste e controle dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, além de serem realizadas análises comparativas com os resultados obtidos nos grupos de biofilmes monoespécies. Os resultados da efetividade do tratamento frente à *Escherichia coli* no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados teve por base a análise descritiva dos resultados de modo a destacar os valores de interesse referente à média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice F).



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 20 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.

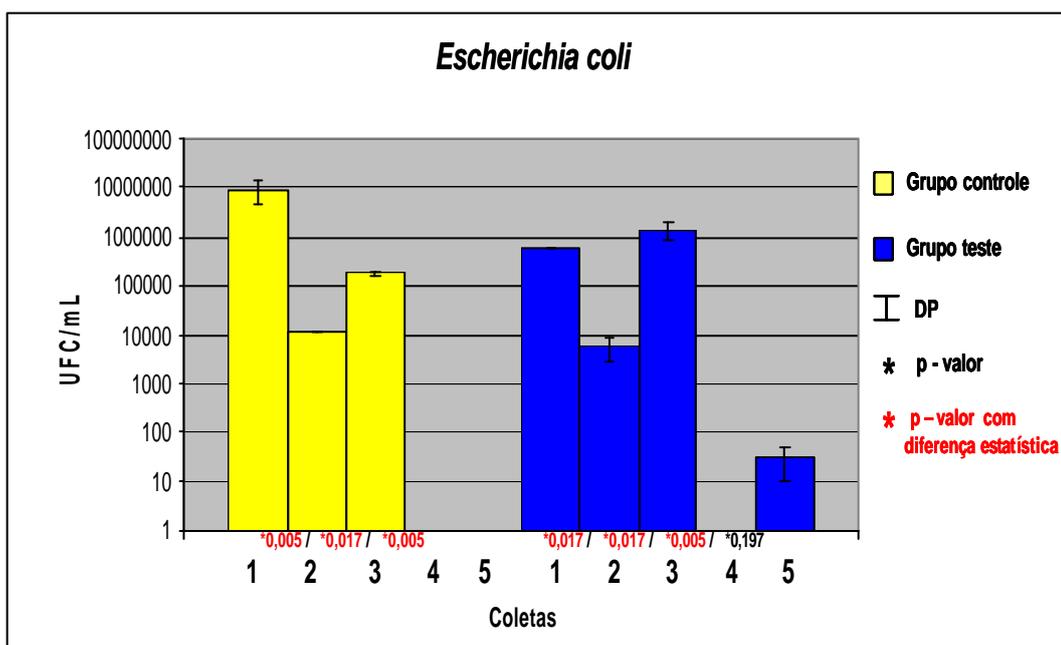
Para a comparação dos dados de *Escherichia coli* nos grupos controle de espécimes contaminados com os microrganismos associados, foi selecionado o teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$). Com base no teste estatístico foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) comparando-se as médias de UFC/mL de *Escherichia coli* entre as coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1, foi maior que a coleta 2, demonstrando que o tratamento com instrumentação reduziu significativamente o número de UFC/mL de forma imediata. Na comparação das médias de UFC/mL de *Escherichia coli* entre as coleta 2 e coleta 3 foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,017$), sendo que na coleta 3 a média de UFC/mL de *Escherichia coli* foi significativamente maior, mostrando que ocorreu crescimento considerável a média de UFC/mL após período de

incubação de sete dias do tratamento utilizando-se somente a instrumentação. No caso das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4 foi observado que houve diferença estatisticamente relevante ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL de *Escherichia coli* da coleta 4 foi menor que a da coleta 3, denotando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal alcançando redução de média de UFC/mL de 100%. Esta condição foi mantida já que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1,00$) entre a coleta 4 e coleta 5, permanecendo redução efetiva de 100% ao final do ciclo experimental.

Quanto aos dados de *Escherichia coli* no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, por meio do teste estatístico Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi demonstrado que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,017$) entre as médias UFC/mL de *Escherichia coli* da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior que a coleta 2, comprovando a redução imediata significativa do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Na comparação dos resultados de *Escherichia coli* entre as coletas no grupo teste contaminado com os microrganismos associados, foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,017$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3 foi estatisticamente maior com relação a média de UFC/mL de *Escherichia coli* da coleta 2, demonstrando que, após período de incubação de sete dias do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, ocorreu aumento no número de UFC/mL onde é possível observar que a condição de redução alcançada imediatamente após o tratamento não foi mantida. Na análise das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4, observou-se que foram diferentes estatisticamente ($p=0,005$), sendo que a média de UFC/mL da coleta 4, foi significativamente menor em comparação com a coleta 3, comprovando diminuição significativa da média de UFC/mL pela utilização da medicação intracanal, embora não tenha ocorrido redução total no número de UFC/mL de *Escherichia coli*. Não foi constatada diferença

estatisticamente significante ($p=0,197$) entre a coleta 4 e coleta 5, onde foi possível observar que mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve crescimento estatisticamente relevante no número de UFC/mL de *Escherichia coli*, mantendo-se a eficácia alcançada no período de incubação com medicação intracanal, embora não tenha sido alcançada redução de 100% neste caso.

Na Figura 21 estão representados os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), na análise comparativa das médias dos valores de UFC/mL de *Escherichia coli* das coletas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

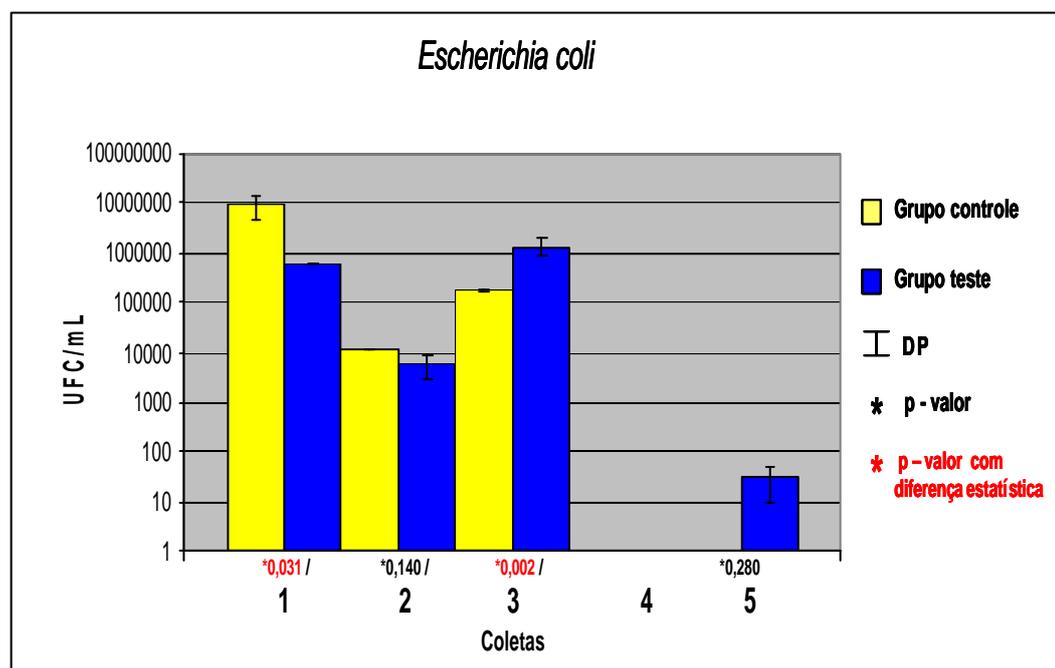


coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 21 – Gráfico demonstrando os resultados para *Escherichia coli* obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

Os resultados para *Escherichia coli* foram também analisados comparando as coletas realizadas no grupo controle com as realizadas no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados. Para este, foi selecionado o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Foi observado que entre as coletas 1 do grupo controle comparado ao grupo teste, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,031$), sendo que a média UFC/mL de *Escherichia coli* foi maior na coleta 1 do grupo controle. Entre as coletas 3 observou-se diferença estatisticamente significativa ($P=0,002$), sendo que a média de UFC/mL de *Escherichia coli* foi maior no grupo teste, demonstrando que após incubação a partir do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana ocorreu um aumento consideravelmente maior com relação ao aumento após o mesmo período observado no grupo controle. Nas demais coletas não foram observadas diferenças significantes.

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Escherichia coli* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste nos espécimes contaminados com os microrganismos associados.



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 22 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Escherichia coli* nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

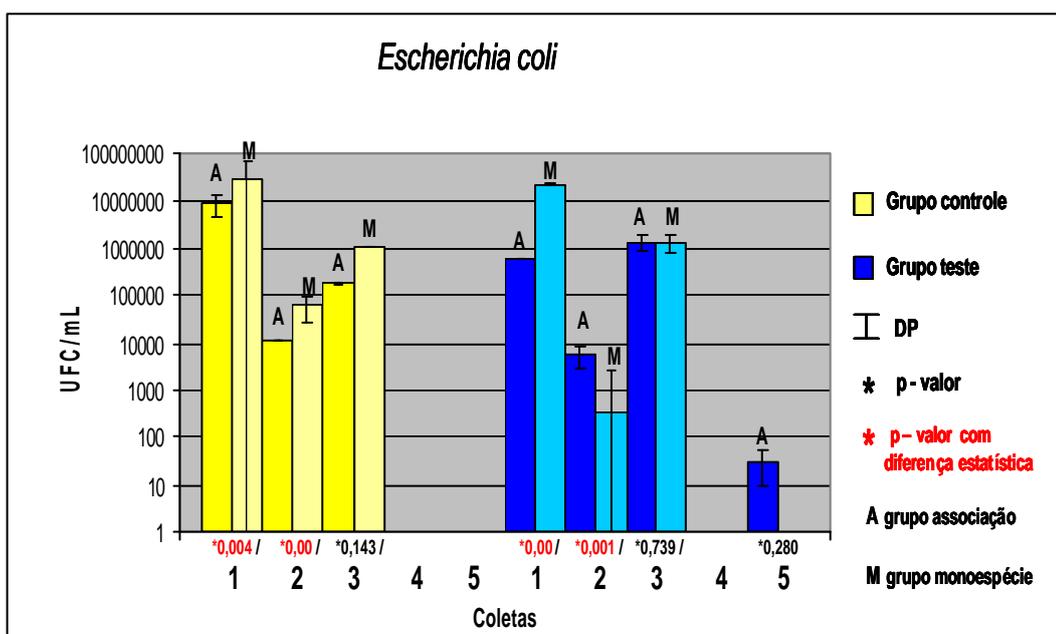
Na análise dos resultados comparando o comportamento de *Escherichia coli* no ciclo experimental de contaminação monoespécie com o ciclo de contaminação multiespécies (microrganismos associados) foi selecionado o teste estatístico Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Com base na análise foi possível verificar diferença estatística significativa ($p=0,00$) entre as coletas 1 dos grupos teste de contaminação mono e multiespécies, sendo que as médias de UFC/mL de *Escherichia coli* foi maior no grupo teste de contaminação monoespécie, demonstrando que houve diferença no comportamento de crescimento entre os grupos de contaminação mono e multiespécies. Com relação à média de UFC/mL de *Escherichia coli* nas coletas 2 dos grupos teste houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,001$), sendo que a média de UFC/mL de *Escherichia coli* na coleta 2 do grupo dos espécimes

com microrganismos associados foi maior, demonstrando que a redução imediata ao tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana foi melhor no grupo monoespécie de contaminação com *Escherichia coli*. Não foi observada diferença estatística significativa ($p=0,739$) entre as médias de UFC/mL nas coletas 3, mostrando que embora o comportamento das médias no grupo de contaminação mono e multiespécie tenham sido diferentes até a coleta 2, ocorreu uma semelhança de comportamento na coleta 3. Quanto as coletas 4 e coletas 5, não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes para *Escherichia coli*, demonstrando que a semelhança de comportamento ocorrida a partir da coleta 3 foi mantida nas coletas subsequentes.

Os resultados para *Escherichia coli* nos grupos controle de contaminação mono e multiespécies mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,004$) entre as coletas 1, sendo que a média de UFC/mL de *Escherichia coli* no grupo dos microrganismos associados foi menor em relação ao grupo de contaminação monoespécie, mostrando que ocorreu diferença no comportamento de crescimento na contaminação monoespécie em relação á multiespécies. Na análise das coletas 2, houve diferença significativa ($p=0,00$), sendo que a média de UFC/mL de *Escherichia coli* foi menor no grupo dos microrganismos associados em relação ao grupo de contaminação monoespécie, mostrando que ocorreu diferença no comportamento de crescimento na contaminação monoespécie em relação á multiespécies imediatamente após ao tratamento com instrumentação. Não houve diferença estatística significativa nas demais coletas dos grupos controle, denotando-se que ocorreu semelhança no comportamento de *Escherichia coli* no grupo de contaminação monoespécie com relação á contaminação multiespécies a partir da coleta 3.

A Figura 23 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores

de UFC/mL de *Escherichia coli* entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste nos espécimes com contaminação mono e multiespécies.



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 23 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias dos valores de UFC/mL de *Escherichia coli* nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.

5.2 Análise da neutralização de endotoxina

Para avaliação dos dados obtidos na análise da efetividade da instrumentação associada à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal sobre a neutralização de endotoxinas, os resultados foram expressos pelo número de unidade de endotoxina por mL (UE/mL).

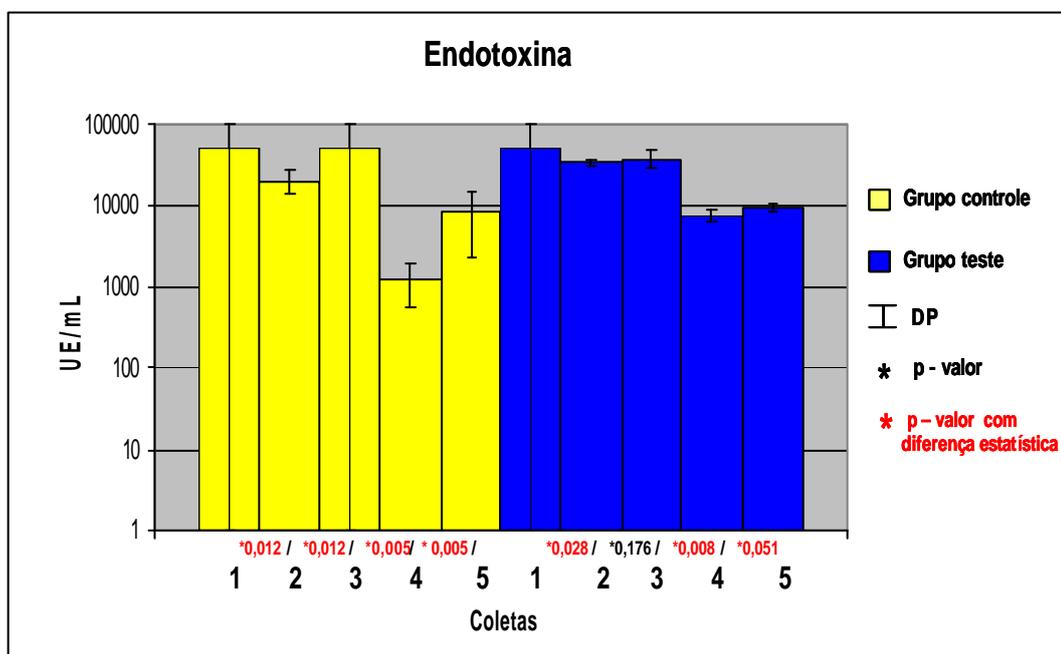
Foi realizada análise descritiva dos dados relativos a quantidade de endotoxina obtidos nas coletas dos grupos controle e teste de espécimes contaminados com *Escherichia coli*, destacando-se valores de interesse referente à média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice G).

Por meio do teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), para comparação de dados pareados de mesma unidade amostral, foi constatado que no grupo controle dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,012$) entre as médias da quantidade de endotoxina obtida na coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior que a coleta 2, demonstrando que o tratamento com instrumentação reduziu o número de EU/mL. Constatou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,012$) entre as médias da quantidade de endotoxina da coleta 2 e coleta 3, sendo que a média da coleta 3, realizada foi maior que a média da coleta 2, o que denota aumento considerável da quantidade de endotoxina comprovando que a redução na quantidade de endotoxina imediata ao tratamento não se manteve após período de incubação. A diferença entre as médias obtidas na coleta 3 e coleta 4 foi estatisticamente relevante ($p=0,005$), sendo que as médias da quantidade de endotoxina da coleta 4 foi menor que a da coleta 3, comprovando diminuição significativa da quantidade de endotoxina com a utilização da medicação intracanal. Na análise comparando-se a coleta 4 e coleta 5 foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$), sendo que a média da quantidade de endotoxina na coleta 5 foi maior, demonstrando que a neutralização de endotoxina alcançada na coleta 4 não se manteve após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias.

Entre as coletas do grupo teste dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*, por meio do teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,028$) entre as médias da quantidade de endotoxina na coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1,

realizada para confirmação da contaminação, foi maior que a coleta 2, realizada imediatamente após tratamento dos espécimes com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, demonstrando que o tratamento reduziu significativamente, de forma imediata, a média da quantidade de endotoxina. Na comparação entre as coletas no grupo teste contaminado com *Escherichia coli*, foi possível observar que não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p=0,176$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, demonstrando que a redução na média da quantidade de endotoxina foi mantida após incubação de sete dias do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Na análise das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4, observou-se que foram diferentes estatisticamente ($p=0,008$), sendo que a média da quantidade de endotoxina da coleta 4 foi menor que a da coleta 3, comprovando diminuição significativa da quantidade de endotoxina pela utilização da medicação intracanal, embora não tenha ocorrido neutralização de 100% das endotoxinas. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,051$) entre a coleta 4 e coleta 5, onde foi possível observar que mesmo após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, não houve aumento significativo na média da quantidade de endotoxina.

A Figura 24 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL entre as coletas, nos grupos controle e teste de *Escherichia coli*.



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 24 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com *Escherichia coli*.

Para a realização da análise dos resultados sobre neutralização de endotoxinas relacionando as coletas realizadas no grupo controle com as do grupo teste dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*, foi selecionado o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Com base nesta análise não foi possível verificar diferença estatisticamente significativa na média da quantidade de endotoxina entre todas as coletas realizadas nos grupos controle e teste, contaminados com *Escherichia coli*.

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina relacionando as mesmas coletas dos grupos teste e controle de *Escherichia coli*.

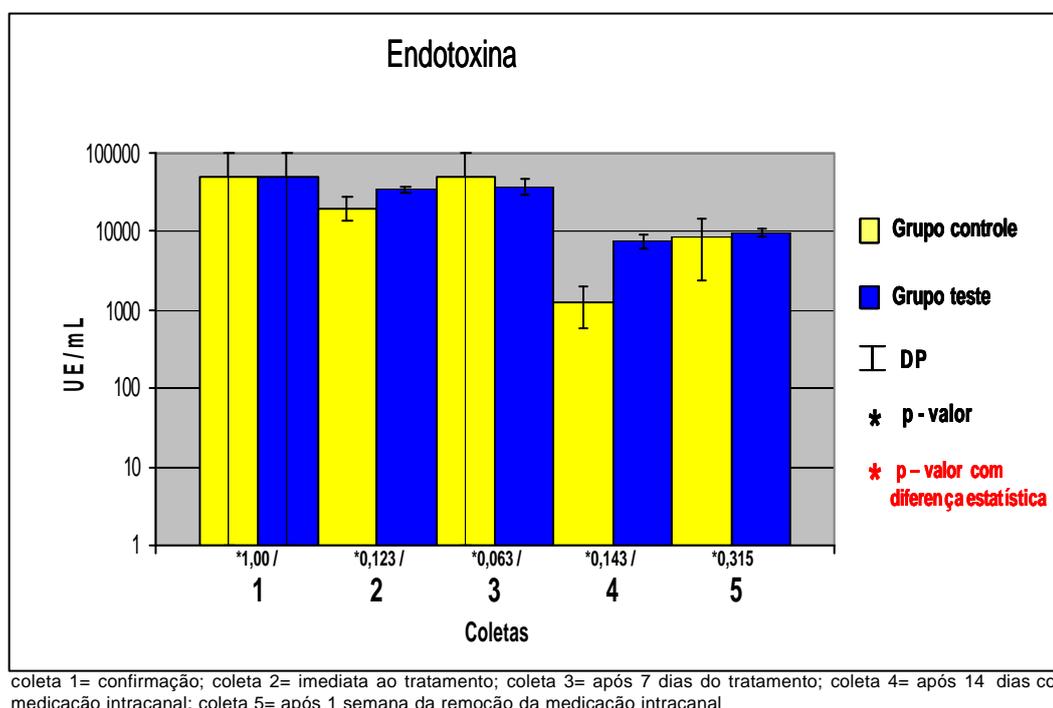


FIGURA 25 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com *Escherichia coli*.

Foram analisadas as médias da quantidade de endotoxina nas coletas dos grupos teste e controle dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, além de serem realizadas análises comparativas com os resultados obtidos nos grupos de biofilmes monoespécies de *Escherichia coli*. Os resultados da efetividade do tratamento na neutralização de endotoxina no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados tiveram por base a análise descritiva dos resultados de modo a destacar os valores de interesse referente á média, desvio padrão, máximo e mínimo (Apêndice H).

Para a comparação dos dados da quantidade de endotoxina nos grupos controle de espécimes contaminados com os

microrganismos associados, foi selecionado o teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$). Com base no teste estatístico foi possível observar que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$) comparando-se as médias de quantidade de endotoxina entre as coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1, foi maior que a coleta 2, demonstrando que o tratamento com instrumentação reduziu a média da quantidade de endotoxina de forma imediata. Na comparação das médias da quantidade de endotoxina entre as coleta 2 e coleta 3 foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$), sendo que a quantidade de endotoxina da coleta 3 foi maior, mostrando que ocorreu aumento considerável na quantidade de endotoxina após período de incubação de sete dias do tratamento utilizando-se somente a instrumentação. No caso das médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4 foi observado que houve diferença estatisticamente relevante ($p=0,008$), sendo que a média da quantidade de endotoxina da coleta 4 foi menor que a da coleta 3, denotando diminuição significativa da quantidade de endotoxina com a utilização da medicação intracanal. Na comparação entre as médias da quantidade de endotoxina no grupo dos microrganismos associados, pôde-se observar que entre a coleta 4 e coleta 5 houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,005$), sendo que a média da quantidade de endotoxina foi menor na coleta 5, demonstrando que após remoção da medicação intracanal e incubação de sete dias, houve diminuição relevante na média da quantidade de endotoxina na última coleta.

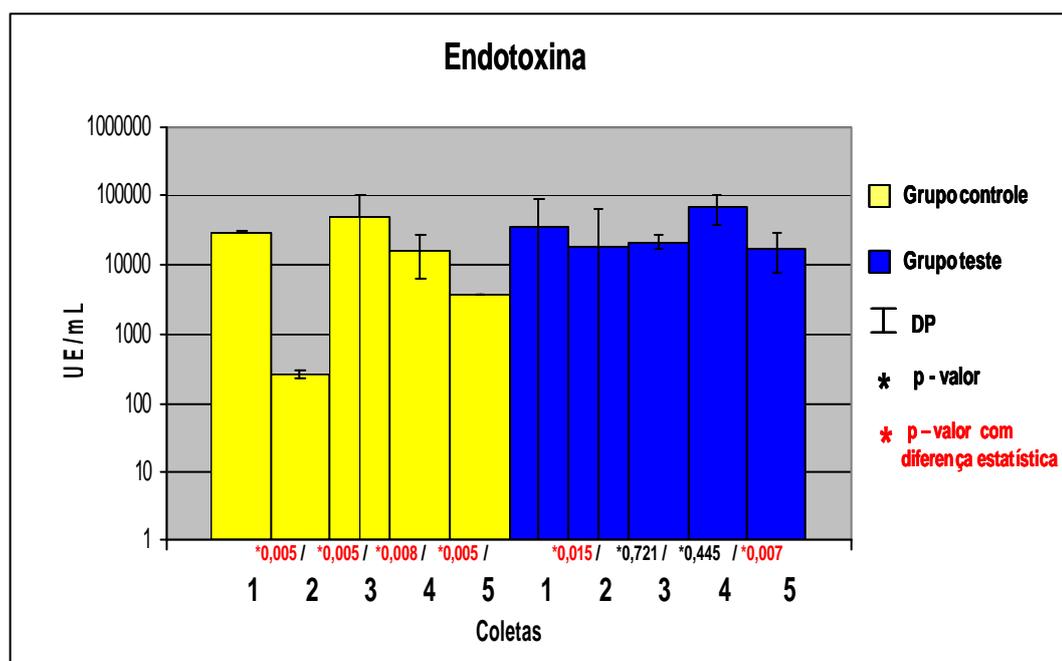
Quanto aos dados de quantidade de endotoxina no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados, por meio do teste estatístico Wilcoxon ($\alpha=5\%$), foi demonstrado que houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,015$) entre as médias de quantidade de endotoxina da coleta 1 e coleta 2, sendo que a média da coleta 1 foi maior que a coleta 2, comprovando a redução da quantidade de endotoxina imediata ao tratamento com instrumentação associada a terapia fotodinâmica antimicrobiana. Na comparação dos resultados da quantidade de endotoxina entre as coletas no grupo teste contaminado

com os microrganismos associados, foi possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,721$) entre as médias da coleta 2 e coleta 3, demonstrando que, após período de incubação de sete dias do tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, a quantidade de neutralização alcançada foi mantida. As médias obtidas entre a coleta 3 e coleta 4 não foram diferentes estatisticamente ($p=0,445$), comprovando que a neutralização alcançada com o tratamento de instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana não foi alterada significativamente com a utilização da medicação intracanal. Foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,007$) entre a coleta 4 e coleta 5, sendo que a média da quantidade de endotoxina foi menor na coleta 5, demonstrando que mesmo após a remoção da medicação intracanal houve diminuição da média da quantidade de endotoxina ao final do ciclo experimental.

Na Figura 26 estão representados os resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), na análise comparativa das médias dos valores de quantidade de endotoxina em UE/mL nas coletas dos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças entre as médias quando o p -valor associado ao teste é menor que 0,05, que foi o nível de significância considerado.

Os resultados da quantidade de endotoxina foram também analisados comparando as coletas realizadas no grupo controle com as realizadas no grupo teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados. Para este, foi selecionado o teste estatístico de Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Foi observado que entre as coletas 1 do grupo controle comparado ao grupo teste, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,436$). Comparando-se as coletas 2, foi possível observar que houve diferença estatisticamente ($p=0,01$) significativa na média da quantidade de endotoxina, sendo que a média no grupo teste foi maior que no grupo controle, confirmando que,

neste caso, o tratamento com instrumentação somente foi imediatamente melhor na neutralização de endotoxina que o tratamento com a instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.



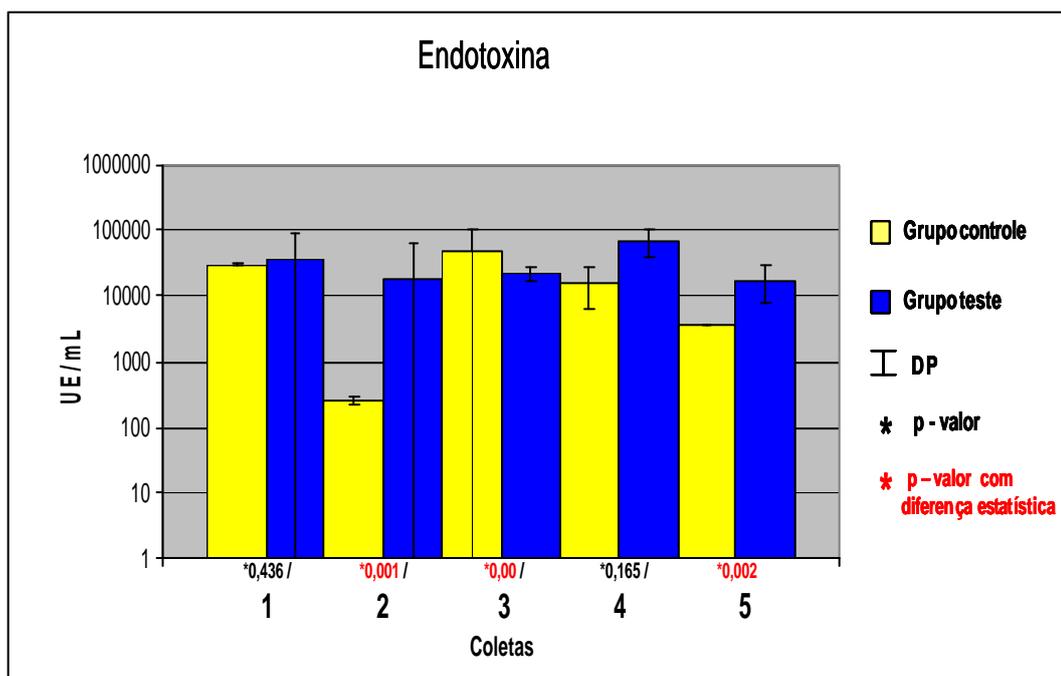
coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 26 - Resultados obtidos no teste estatístico de Wilcoxon ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina nas coletas realizadas no grupo controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

Nas coletas 3, pôde-se verificar diferença estatisticamente significativa ($p=0,00$), sendo que a média da quantidade de endotoxina da coleta 3 do grupo controle foi maior que no grupo teste, significando que a neutralização imediata do tratamento com instrumentação somente, embora tenha sido mais relevante após período de incubação, apresentou um aumento maior na quantidade de endotoxina. Não ocorreu diferença significativa na média da quantidade de endotoxina comparando-se as coletas 4 dos grupos controle e teste, demonstrando que após período com medicação intracanal, a neutralização de endotoxina é semelhante

em ambos grupos. Foi observada diferença estatística significativa ($p=0,002$) entre as médias da quantidade de endotoxina nas coletas 5, sendo que a média da coleta 5 do grupo teste foi maior, comprovando que ao final do ciclo experimental a neutralização de endotoxina foi melhor no grupo controle.

A Figura 27 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com os microrganismos associados.



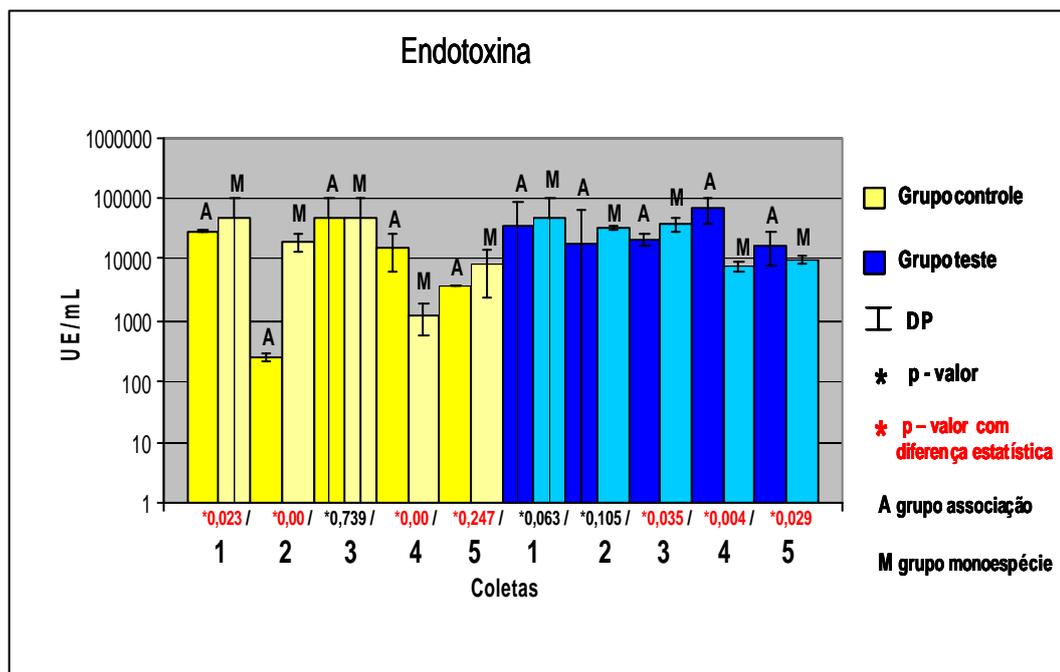
coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 27 – Gráfico demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes contaminados com os microrganismos associados.

Na análise dos resultados comparando o comportamento da média da quantidade de endotoxina no ciclo experimental de contaminação monoespécie de *Escherichia coli* com o ciclo de contaminação multiespécies (microrganismos associados) foi selecionado o teste estatístico Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Com base no teste foi possível verificar que foi observada diferença ($p=0,023$) de comportamento entre as coletas 1 dos grupos controle, sendo que a média da quantidade de endotoxina na coleta 1 do grupo controle dos espécimes com microrganismos associados foi menor, confirmando comportamento diferente na liberação de endotoxina no grupo de contaminação monoespécie de *Escherichia coli* em comparação com o grupo de contaminação multiespécies. Verificou-se diferença estatística ($p=0,00$) entre as coletas 2 dos grupos controle, onde a média da quantidade de endotoxina foi menor no grupo de contaminação monoespécie, confirmando comportamento diferente na neutralização de endotoxina nas coletas imediata ao tratamento com instrumentação. Entretanto nas coletas 3, não foram observadas diferenças significativas estatisticamente ($p=0,739$), demonstrando que após período de incubação a partir do tratamento com instrumentação, ocorre uma semelhança no comportamento da média da quantidade de endotoxina. Nos grupos controle também foram observadas diferenças estatística ($p=0,00$) entre as coletas 4, sendo que a média da quantidade de endotoxina da coleta 4 do grupo controle de contaminação com microrganismos associados foi maior que no grupo de contaminação monoespécie de *Escherichia coli*, mostrando que após utilização da medicação intracanal ocorreu diferença de comportamento quanto as médias da quantidade de endotoxina.. Não foram observadas diferenças estatisticamente relevantes entre as médias da quantidade de endotoxina das coletas 5 nos grupos controle de contaminação mono e multiespécie, ou seja, não ocorreram diferenças no comportamento quanto a média da quantidade de endotoxina comparando as últimas coletas de ambas situações.

Os resultados da análise comparando as médias da quantidade de endotoxina nos grupos testes do ciclo experimental de contaminação monoespécie de *Escherichia coli* com o ciclo de contaminação multiespécies (microrganismos associados) foi selecionado o teste estatístico Mann-Whitney, de nível de significância de 5%. Nas coletas 1 e coletas 2, não foi possível verificar diferenças estatisticamente significantes, mostrando semelhança de comportamento entre estas coletas nos grupos teste de contaminação mono e multiespécies. A partir da coleta 3 pôde-se observar diferença estatisticamente significativa nas médias da quantidade de endotoxina ($p=0,35$), sendo que a média da quantidade de endotoxina na coleta 3 do grupo teste dos espécimes com microrganismos associados foi menor, confirmando comportamento diferente na liberação de endotoxina no grupo de contaminação monoespécie de *Escherichia coli* em comparação com o grupo de contaminação multiespécies. Verificou-se diferença estatística ($p=0,004$) entre as coletas 4 dos grupos teste, onde a média da quantidade de endotoxina foi menor no grupo de contaminação monoespécie, confirmando comportamento diferente entre os grupos de contaminação monoespécie e multiespécies quanto a neutralização de endotoxina após utilização da medicação intracanal. Nos grupos testes também foram observadas diferenças estatísticas ($p=0,029$) entre as coletas 5, sendo que a média da quantidade de endotoxina da coleta 5 do grupo teste de contaminação com microrganismos associados foi maior que no grupo de contaminação monoespécie de *Escherichia coli*, mostrando que o comportamento das médias da quantidade de endotoxina nos grupos são diferentes também após remoção da medicação intracanal.

A Figura 28 apresenta os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL entre as mesmas coletas nos grupos controle e teste nos espécimes com contaminação mono e multiespécies.



coleta 1= confirmação; coleta 2= imediata ao tratamento; coleta 3= após 7 dias do tratamento; coleta 4= após 14 dias com medicação intracanal; coleta 5= após 1 semana da remoção da medicação intracanal

FIGURA 28 – Gráficos demonstrando os resultados obtidos no teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$), comparando as médias da quantidade de endotoxina em UE/mL nas mesmas coletas realizadas nos grupos controle e teste de espécimes de contaminação mono e multiespécie.

6 DISCUSSÃO

A incorporação da tecnologia na prática médica moderna é inquestionavelmente um dos benefícios adquiridos pela humanidade para o tratamento de inúmeras patologias, dentre as quais, as morbidades de cunho infeccioso despontam como foco de atenção no desenvolvimento de métodos terapêuticos avançados. Dentre os fatores que contribuem para uma aprimorização tecnológica voltada aos processos infecciosos estão, sobretudo, os problemas decorrentes da resistência microbiana às drogas atualmente utilizadas na rotina terapêutica. A capacidade de desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos desperta o interesse da comunidade científica, que incorpora cada vez mais em seus objetivos, a busca por mecanismos que transponham esse problema^{14, 34 e 66}. A resistência microbiana oriunda da utilização empírica e indiscriminada dos agentes antimicrobianos, aliada a condição de sobrevida dos pacientes imunocomprometidos, torna ascendente o problema do tratamento dos processos infecciosos. Outro aspecto importante é a aquisição de novo perfil no padrão da infecção com despontamento de espécies antes não relevantes e com aumento na prevalência de infecções de características multiespécies³¹.

É possível observar os reflexos desta nova fase também na Endodontia atual, que diferentemente daquela da década de 80, oferece muito em tecnologia para viabilizar um tratamento eficiente na eliminação de microrganismos, rápido para diminuir consideravelmente as intervenções e seguro aos padrões de qualidade em Endodontia. Dentre as inovações, a utilização da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em Endodontia têm se destacado^{4, 32, 35, 41, 96, 106, 107 e 122}. Os estudos sobre

fototratamento antimicrobiano endodôntico buscam por parâmetros consistentes para que esta tecnologia possa ser introduzida na clínica a fim de facilitar o tratamento, dinamizar a eliminação do processo infeccioso, além de acrescentar quesitos vantajosos ao tratamento, como a atuação antiinflamatória e analgésica local^{4, 32, 35, 41, 96, 106, 107 e 122}. Outras vantagens se referem ao emprego de um sistema de laser de menor custo, de pequena dimensão e que, além disso, ainda pode ser utilizado com fibras ópticas finas e flexíveis compatíveis com os instrumentos endodônticos^{34, 39, 96 e 106}.

As investigações sobre implantação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana como coadjuvante ao tratamento endodôntico embora promissora, necessita do estabelecimento de protocolos viáveis para utilização efetiva, além de muitos estudos referentes às propriedades da técnica, aos efeitos biológicos sobre tecidos do hospedeiro e sobre os agentes infecciosos^{25, 32, 41, 69, 96 e 106}. Este estudo buscou associar a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana ao tratamento convencional a fim de contribuir cientificamente na admissão de um método terapêutico viável para introdução na clínica endodôntica, não desmerecendo etapas primordiais para promoção e manutenção das condições de desinfecção necessárias ao tratamento, como a etapa da instrumentação e medicação intracanal.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana baseia-se em um princípio simples em que a eliminação de microrganismos está relacionada com a ativação do corante depositado no organismo alvo que após sensibilização transforma oxigênio molecular em oxigênio singlete altamente reativo (fotoprocesso Tipo II) ou interage com outras moléculasceptoras de elétrons resultando na produção de hidroxilas e radicais orgânicos (fotoprocessos do Tipo I) que são citotóxicos^{14, 58, 72, 125, 131 e 133}. Entretanto o estabelecimento de protocolos efetivos na fotossensibilização letal sobre microrganismos continua sendo um desafio para os pesquisadores, uma vez que fatores inerentes ao tipo de

irradiação, ao corante fotossensibilizador e à estrutura celular da espécie microbiana devem ser levados em consideração^{12 e 120}.

Muitas das dificuldades no estabelecimento de um protocolo efetivo da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana para utilização intracanal consiste na diferença de susceptibilidade dos microrganismos aos protocolos empregados, fato que merece atenção quando se deseja introduzir parâmetros eficientes para utilização da técnica. Para a introdução de parâmetros eficientes um dos elementos a ser considerado é a dose de irradiação. Yoshimura¹²⁸ mencionou que o sucesso da Terapia Fotodinâmica depende da quantidade de energia entregue aos tecidos ou células-alvo, sendo que existem relatos de insucessos devido ao excesso de energia empregado na técnica, tornando cada vez mais preocupante uma melhor definição dos valores ideais de energia a serem depositados no tecidos ou células alvo.

Alguns outros fatores que devem ser levados em consideração quando objetiva-se definir uma dose de irradiação para a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é o tipo de tecido a ser irradiado (constituintes teciduais, coeficiente de absorção do tecido), distância do emissor ao tecido, método de aplicação (movimentos de irradiação, número de sessões), além de elementos do próprio laser como o tipo selecionado e o sistema de entrega do feixe (fibra óptica, braço articulado com lentes, scanner etc). Segundo considerações de Lopes⁶², não é possível calcular quanto é a absorção de cada tecido ou célula, entretanto é possível calcular o quanto o aparelho está emitindo.

Sem dúvida alguma, a dosimetria é um dos itens mais controversos nas terapias utilizando a luz laser de baixa intensidade, justamente porque a evolução científica vem descobrindo fórmulas mais adequadas e com menor erro para o cálculo da dose mais indicada para cada situação⁶¹. Além disso, é muito importante conhecer as características técnicas do equipamento que está sendo utilizado^{61, 113, 116 e 128}.

Neste estudo, o método de irradiação e o tipo de laser selecionado foram baseados nos protocolos definidos por Gutknecht et al.⁴¹ e Segundo⁹⁷, por demonstrarem em seus estudos resultados relevantes sobre a efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com vistas ao tratamento endodôntico. A escolha pelo laser diodo a outros tipos de laser, está relacionada principalmente por serem recomendados para redução microbiana sem apresentarem aumento na temperatura do tecido circundante, vantagem importante na aplicação da técnica para fins endodônticos^{24, 41 e 74}. Também foi levado em consideração o fato das terapias utilizando lasers de baixa intensidade não favorecerem o desenvolvimento da resistência microbiana, pelo menos até onde se conhece atualmente^{14, 33, 34, 39, 42 e 66}.

O laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) utilizado neste estudo é vantajoso em relação aos outros de estado sólido ou gás principalmente com relação ao custo, motivo pelo qual vêm ganhando espaço cada vez maior em diversas aplicações na Odontologia. Além disso, são duráveis e comprovadamente eficientes no processo de conversão de energia elétrica em luz e na seletividade da luz emitida¹¹⁶.

Diferentes parâmetros de potência (P), comprimento de onda (λ) e tempo de irradiação na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana para fins endodônticos podem ser observados na literatura. Seal et al.⁹⁶, por exemplo, compararam diferentes parâmetros de irradiação para verificação da efetividade antimicrobiana sobre biofilme de *Streptococcus intermedius* em canais radiculares. Os autores utilizaram 20 combinações de quatro concentrações de corante com cinco diferentes doses de energia do laser, alcançando diferentes resultados diante das combinações de parâmetros de irradiação. Garcez et al.³⁴ realizaram Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em canais radiculares contaminados com *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. Para a realização da técnica preconizaram λ de 660 nm em diferentes doses de irradiação e tempo de aplicação, conferindo ao final do experimento, resultados

variados quanto á efetividade. Outros trabalhos realizaram Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente a diferentes microrganismos como *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* dispostos em suspensão ou organizados em biofilmes monoespécies, entretanto não foram observadas evidências de estudos sobre a determinação de parâmetros para Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente a microrganismos organizados em biofilmes multiespécies^{12, 14, 15, 20, 33, 39, 52, 54, 56, 64, 76, 86, 88, 96, 97, 108, 115, 118, 120, 129, 130, 132 e 136}.

Segundo Schoop et al.⁹⁵, novos comprimentos de onda têm sido estabelecidos para a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em desinfecção de canais radiculares. Os autores testaram a efetividade de laser diodo e de KTP (potássio-titânio-fosfato) frente a *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* na potência de saída de 1W e 1,5W e obtiveram diferenças em seus resultados. Os autores relataram que os λ testados são ferramentas úteis na desinfecção dos canais radiculares e podem ser aplicados seguramente se a energia aplicada permanecer dentro dos limites propostos.

Para a realização deste estudo foi selecionado um único parâmetro de irradiação com o objetivo de avaliar as diferenças na atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* constituindo biofilmes mono e multiespécies nos canais radiculares. O parâmetro utilizado, baseado na metodologia proposta por Gutknecht et al.⁴¹ e Segundo⁹⁷, foi utilizando laser diodo de baixa intensidade com comprimento de onda 660nm, ajuste de potência no painel de controle do aparelho em 40mW, utilizando-se sistema de entrega por fibra óptica de diâmetro de 365 μ m e potência de saída (entrega) de fibra óptica mensurada em 30mW, realizando técnica helicoidal de aplicação, durante 30min.

Quanto à utilização do sistema de entrega por fibras ópticas, justifica-se pela compatibilidade com as dimensões dos canais radiculares permitindo que o feixe de irradiação alcance toda a extensão

do canal radicular durante a ativação do corante fotossensibilizador. Foi utilizado neste estudo fibra óptica de diâmetro de 365µm com potência de saída do feixe de irradiação mensurada em 30mW, considerando perda de 10mW de potência da saída do foco do aparelho. Moritz et al.⁷⁴ relataram que a confiabilidade da irradiação nos canais radiculares deve-se às fibras condutoras de luz flexíveis e de diâmetro compatível com o canal. Outros estudos como de Kreisler et al.⁵⁷, Garcez et al.³⁴, Schoop et al.⁹⁵ ressaltaram que, embora a fibra óptica possua dimensões importantes para a entrega do feixe às paredes internas dos canais radiculares, deve ser utilizada com muita cautela para que não haja rompimento da fibra no interior do canal, cuja dificuldade na remoção dos fragmentos comprometeria o sucesso do tratamento.

É fato notável que a pesquisa sobre novos fotossensibilizadores, que possam ser empregados em Terapia Fotodinâmica, têm sido bastante intensa nos últimos anos^{13, 26, 39, 44, 52, 55, 72, 86, 98, 114, 118, 119, 120, 125 e 129}. Alguns requisitos para um bom agente fotossensibilizador são necessários, como possuírem forte absorção na região do vermelho, altos rendimentos quânticos de formação de oxigênio singleto, baixa toxicidade, agregação seletiva e fácil eliminação⁹⁸. Com a expansão da Terapia Fotodinâmica, uma das principais áreas de pesquisa se concentra na busca e desenvolvimento de novas moléculas fotossensíveis¹¹⁴.

No presente estudo foi selecionado o corante fotossensibilizador azuleno associado ao endo-PTC com base na atividade fotodinâmica relevante intermediada pela mistura nos estudo de Segundo¹⁰¹. O corante azuleno, extraído do óleo essencial da *Chamomilla recutita* (camazuleno) é comumente utilizado em preparações cosméticas por apresentar uma atividade antiinflamatória notável na proteção da pele⁶⁵. Outros efeitos como calmante, analgésico, antiespasmódico, carminativo, cicatrizante e emenagogo são também associados aos compostos da *Chamomilla recutita*⁶⁵. Este corante vem sendo utilizado na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com sucessos representativos¹²,

^{33 e 97}, embora muitos outros corantes sejam passíveis de utilização. A vantagem do azuleno na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana pode estar associada ao fato do corante demonstrar, além das características fotossensibilizantes, efeitos antiinflamatórios, cicatrizantes e analgésicos.

A maior parte dos estudos em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana empregam o azul de metileno e o azul de toluidina com resultados importantes na eliminação de microrganismos^{26, 44, 54, 55, 56, 75, 76, 118, 119, 132, 131 e 133}. Apesar de serem corantes bastante utilizados devido sua baixa toxicidade e boa eficiência, ainda são necessários muitos estudos para comprovação clínica e aquisição de acesso regulamentado. Talvez uma alternativa imediata de acesso regulamentado para uso clínico na cavidade oral seria a eritrosina, utilizada comumente na evidenciação de biofilmes de superfícies dentárias. Metcalf et al.⁷² e Wood et al.¹²⁵, apresentam em seus estudos parâmetros de utilização da eritrosina na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com sucesso comparável ao de outros agentes mais utilizados, como o azul de metileno e o azul de toluidina.

No presente estudo a associação do corante azuleno com o medicamento Endo-PTC teve por objetivo promover uma condição mais apropriada para uso clínico melhorando as características da consistência do corante por torná-lo mais viscoso facilitando assim a manipulação e introdução no interior dos canais radiculares. Esta associação também minimiza o potencial de manchamento dentário, evitando que o corante seja inadequado para utilização na clínica endodôntica^{12, 15 e 97}.

O mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana baseia-se na letalidade fotoinduzida, devido principalmente à atividade do oxigênio singlete (1O_2), uma espécie excitada altamente reativa capaz de oxidar moléculas orgânicas com alta densidade eletrônica, como por exemplo, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos^{16 e 73}. É uma das mais importantes espécies oxidativas envolvidas com toxicidade celular e danos genéticos, que ocorrem preferencialmente nos sítios de guanina¹⁶. Segundo Jiménez-Banzo et

al.⁵⁰, a formação de oxigênio singlete fotoinduzido envolve transferência de energia de um fotossensibilizante para as moléculas biológicas.

No decorrer do presente estudo foi notável a observação relacionada com a interação laser-corante-tecido biológico que, no caso da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, pode promover tanto morte celular (fotossensibilização letal) como estimulação celular (fotobioestimulação). Mas embora neste caso o objetivo seja fotossensibilização letal sobre microrganismos, é importante considerar que a radiação laser utilizada na Terapia Fotodinâmica, se não utilizada com devidas precauções, é capaz de promover danos teciduais em regiões ou tecidos vulneráveis do hospedeiro. No Brasil, ainda são poucas as normas relacionadas a tecnologia laser. De acordo com a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), a normalização mais importante a ser considerada para utilização da tecnologia laser na área da saúde é a NBR IEC 60601-2-22 de 10/1997, uma norma internacional adotada no Brasil que prescreve os requisitos particulares para a segurança de equipamentos laseres utilizados em diagnósticos e terapias. Por outro lado, a legislação ordinária sobre a proteção dos trabalhadores diante de riscos no trabalho, estabelece normas regulamentadoras (NRs), dentre as quais encontra-se a NR-15, que regulamenta as atividades e operações insalubres, cujos anexos mais relevantes para a utilização da tecnologia laser, relaciona o fato de que o laser é enquadrado como uma radiação não ionizante e também o fato de que as operações ou atividades que exponham os trabalhadores às radiações não ionizantes, sem a proteção adequada são consideradas insalubres. Assim é importante que seja de conhecimento de todos os envolvidos com a operação de equipamentos laser, os riscos destes equipamentos e a adoção de medidas que permitam reduzi-los ao máximo¹¹.

Lizarelli⁶¹ relata que a biossegurança para utilização dos sistemas laseres em Odontologia torna-se alvo de discussão muito atual. Os organismos internacionais de controle e segurança estabeleceram parâmetros para determinar a exposição máxima a qual os indivíduos

poderiam ser expostos com segurança. Para os diodos laser de AsGaAl infravermelho com um comprimento de onda em torno de 700nm os valores para os parâmetros da máxima exposição permitida (*MPE – Maximum Permissible Exposure*) para a córnea em 0,25s de exposição é de $3,7 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$, para 10s é de $1,5 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$, para 600s é de $5,3 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$ e para 30.000s é de $4,6 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$, constantando que aumentando-se o tempo de exposição á luz, uma intensidade menor, que não seria danosa numa exposição casual poderá tornar-se lesiva¹¹⁶.

A proteção de todos envolvidos no procedimento consiste basicamente no uso dos óculos de proteção que atenuam o feixe ao qual são submetidos. Esta preocupação com as áreas dos olhos é proveniente do fato de que os mais graves acidentes são aqueles ocorridos com os olhos, já que a radiação atinge a retina após sofrer uma amplificação de um fator 100.000 vezes. Em relação ao ambiente devem ser utilizados sistemas de sinalização informativos quanto à radiação laser, advertindo sobre o perigo da exposição ao feixe^{61, 69 e 116}.

Quanto aos procedimentos de inoculação dos espécimes no presente estudo, o tempo de formação do biofilme intracanal foi necessário para que houvesse penetração dos microrganismos nos túbulos dentinários e outras áreas do sistema de canal radicular, conferindo uma condição ambiental semelhante ao que ocorre *in vivo* possibilitando criar *in vitro* um desafio experimental que pudesse ser transposto clinicamente. Neste sentido, os períodos utilizados para alcançar essa condição diferiram entre as espécies de microrganismos selecionadas neste estudo devido as características distintas das espécies quanto ao potencial de penetração e formação de biofilme em túbulos e outras áreas do complexo sistema de canal radicular. Neste estudo o tempo de contaminação no grupo de espécimes inoculados com *Candida albicans* foi de 21 dias baseando-se no fato de que a espécie possui uma célula grande na forma de levedura que poderia dificultar a penetração nos túbulos nesta forma celular, sendo então necessário um maior tempo no interior dos canais radiculares para que na forma de hifa

seja possível ocorrer penetração da espécie no interior dos túbulos promovendo uma melhor fixação desta ao ambiente intraradicular. Silva et al.¹⁰⁰ mencionaram que em microscopia eletrônica de varredura é possível observar que na topografia da parede dentinária do canal radicular infectado com *Candida albicans* as formas de hifas invadem os túbulos dentinários, lateralmente as formas de broto, e as formas de leveduras são mais evidenciadas na parede voltada para o lúmen do canal.

No presente estudo o tempo de contaminação no grupo de espécimes inoculados com *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* foi de 14 dias. Saleh et al.⁹¹ verificaram que a colonização de *Enterococcus faecalis* nos casos relacionados com problemas endodônticos mostram células bacterianas penetrando de 300-400µm no interior dos túbulos dentinários, cuja condição *in vitro* pode ser alcançada com no mínimo 2 semanas de contaminação. Garcez et al.³⁴, preconizaram um menor tempo de contaminação para bactérias Gram-negativas pela característica de mobilidade dessas espécies no interior do complexo canal radicular. Os autores utilizaram um tempo de contaminação de 3 dias para formação de biofilme intracanal de bactérias Gram-negativas. Neste estudo foi utilizado o período de 14 dias de contaminação para o grupo dos espécimes inoculados com *Escherichia coli* com a finalidade de promover uma condição de biofilme maduro no interior dos canais radiculares e de possibilitar a formação de quantidade considerável de endotoxina no ambiente para realização dos testes experimentais que também tiveram por objetivo verificar a efetividade da Terapia Fotodinâmica e medicação intracanal na neutralização de endotoxina. Quanto ao grupo de espécimes de inoculação com os microrganismos associados foi necessário um maior tempo de contaminação (28 dias) para que fosse possível formação de biofilmes com três espécies associadas, sem que houvesse a inibição do crescimento de nenhuma das espécies nesta condição. Embora na literatura possam ser verificados períodos de contaminação dos espécimes distintos dos utilizados neste estudo^{28, 33, 34, 36, 74 e 121}, a determinação dos períodos está relacionada

com os diferentes objetivos dos estudos que, nem sempre, necessitam de condição condizente com a situação clínica *in vivo*, como preconizada neste estudo.

A Terapia Fotodinâmica com finalidade de fotossensibilização letal sobre microrganismos tem sido bastante discutida sob vários aspectos na literatura mundial^{14, 31, 33, 34, 42, 52, 55, 57, 58, 72, 76, 92, 96, 105, 106, 115, 125, 127, 130, 131 e 133}. Os resultados promissores quanto à efetividade antimicrobiana foram atribuídos às vantagens inerentes à técnica para finalidade endodôntica, o que despertou o interesse pela investigação desta na Endodontia, já que a eliminação de microrganismos é um dos objetivos preponderantes do tratamento endodôntico^{34, 39, 86, 96, 106, 115, 127 e 129}.

Nas considerações de Folwaczny et al.³², Kreisler et al.⁵⁹ e Zeina et al.¹³³, quanto à atividade da irradiação laser sobre microrganismos, foi mencionada a existência de diferenças importantes na sensibilidade das espécies microbianas à luz laser, determinadas em grande parte pela morfologia celular de cada espécie. Shackley et al.⁹² relataram, por exemplo, que a Terapia Fotodinâmica é mais seletiva em tecidos hiperproliferativos, sendo possível que a capacidade proliferativa de cada espécie determine a sensibilidade à técnica.

Outros autores evidenciaram diferenças na sensibilidade a Terapia Fotodinâmica, relacionadas ao tipo bacteriano. Soukos et al.^{105 e 106}, Komerick e Wilson⁵⁵ e Zancanela et al.¹²⁹ são contundentes em mencionar que é perceptível uma maior susceptibilidade das bactérias Gram-positivas à ação fotodinâmica da técnica, em relação às bactérias Gram-negativas. Entretanto no presente estudo, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana promoveu relativa diminuição tanto das Gram-positivas, quanto das Gram-negativas, mas em ambos casos pôde-se observar que houve dificuldade de eliminação total das espécies bacterianas. Zeina et al.¹³³ observaram diferenças de susceptibilidade a Terapia Fotodinâmica levando em consideração o tipo celular, onde relataram que a Terapia Fotodinâmica é mais efetiva frente à células procarióticas em relação às

eucarióticas. Esta observação também foi constatada no presente estudo, onde a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana nos padrões utilizados, não demonstrou resultados significantes na eliminação de células eucarióticas de *Candida albicans*, mas promoveu relativa diminuição no número de células procarióticas de *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Também foram relatadas diferenças na sensibilidade à Terapia Fotodinâmica quando os microrganismos estão organizados sob a forma de biofilme e quando estão dispostos como células isoladas em um meio líquido, sendo que o desafio da Terapia Fotodinâmica é maior quando os microrganismos estão organizados em forma de biofilmes^{27, 75, 96, 125 e 130}. No presente estudo foi possível observar que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, no protocolo proposto frente a microrganismos organizados na forma de biofilmes, mostrou dificuldade na eliminação microbiana, já que a redução alcançada no grupo de tratamento utilizando-se a técnica foi igual ou aproximada aquela alcançada nos grupos em que a técnica não foi utilizada e em nenhum dos casos ocorreu eliminação de 100% dos microrganismos com a utilização da terapia.

Quanto aos fatores relacionados à irradiação, existem relatos que a redução microbiana depende da dose, do tempo, da fluência^{34 e 130}, comprimento de onda utilizado¹³, tipo de luz, irradiação de feixe pulsado ou contínuo⁵⁷, potência, coeficiente de extinção do meio (absorção)⁷⁶ entre outros. As características químicas dos corantes fotossensibilizantes devem ser compatíveis com a célula alvo, com o meio ao qual estão dispostas durante o processamento da técnica, além de ser extremamente importante o estabelecimento da banda de absorção (λ) ideal do corante à irradiação relacionada^{13, 55, 58, 62, 76, 86, 106, 125 e 129}. Outros fatores como o pH e a presença de constituintes proteicos no meio, podem interferir na susceptibilidade dos microrganismos a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana⁵⁵.

No protocolo de tratamento endodôntico associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana preconizado neste estudo frente a biofilmes intracanaís monoespécie de *Candida albicans*, foi possível

observar que não houve diferença na efetividade das etapas do tratamento utilizando Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com relação ao grupo controle, inclusive após a etapa de utilização da medicação intracanal de polimixina B associada à clorexidina gel 2%. Esses resultados concordam com as evidências de Zeina et al.¹³³, onde a espécie de levedura *Candida albicans* se mostrou menos susceptível à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando luz policromática de projetor de slide, com 250W e comprimento de onda de 400-700nm, mediada pelo azul de metileno. No estudo de Brasil et al.¹² também foi possível observar falta de atividade da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana frente a *Candida albicans* utilizando-se protocolo muito semelhante com relação ao estabelecido no presente estudo (laser diodo AsGaAl, $\lambda = 685\text{nm}$, fibra óptica) para fotossensibilização letal intracanal mediada pelo azuleno associado ao Endo-PTC.

Embora o protocolo para Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em canais radiculares, preconizado neste estudo não tenha obtido resultados positivos frente a *Candida albicans*, outras investigações na literatura realizaram a técnica com resultados interessantes, porém em outras condições experimentais. Majewski et al.⁶⁴ observaram *in vitro*, que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana utilizando-se laser diodo de baixa intensidade de AsGaAl ($\lambda = 660\text{nm}$, $P = 35\text{mW}$), mediada pelos corantes azul de metileno e azuleno, possibilitou uma melhor redução no número de UFC de quatro diferentes cepas de *Candida albicans* em relação ao grupo controle. Rossoni et al.⁸⁸ demonstraram em seus estudos, que a Terapia Fotodinâmica utilizando-se laser diodo ($\lambda = 660\text{nm}$ e $P = 35\text{mW}$) com os corantes fotossensibilizadores azul de metileno e azul de toluidina, nas densidades de energia de 6, 10 e $15\text{J}/\text{cm}^2$ possibilitou uma redução *in vitro* no número de UFC de *Candida albicans* melhor que o grupo controle. Os estudos de Munin et al.⁷⁶ demonstraram que a Terapia Fotodinâmica com laser diodo ($P = 0,035\text{W}$, $\lambda = 683\text{nm}$) com dose de energia de $28\text{J}/\text{cm}^2$

utilizando-se o corante fotossensibilizador azul de metileno na concentração de 0,27mM foi capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans* e diminuir a porcentagem de células com tubos germinativos, no protocolo previamente estabelecido.

Comparando-se os resultados das condições experimentais mencionadas nos estudos que apresentaram resultados interessantes frente a atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica e a deficiência da atividade antimicrobiana para *Candida albicans* no protocolo estabelecido no presente estudo, é provável que, dentre os fatores que poderiam justificar este resultado, o desafio proposto na forma de biofilme seria a causa mais relacionada com a dificuldade de eficiência do protocolo preconizado neste estudo. Como anteriormente mencionado, existe uma diferença muito importante na sensibilidade a Terapia Fotodinâmica quando os microrganismos estão organizados sob a forma de biofilme em comparação à disposição em forma de células isoladas num determinado meio, onde a dificuldade de ação da Terapia Fotodinâmica é maior na organização em biofilmes^{27, 75, 96 e 130}. Embora tenha sido perceptível a atividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente a *Candida albicans* em diferentes estudos, nenhum dos estudos analisados que apresentaram uma condição de efetividade foi submetido ao desafio na forma de biofilme mas na forma de células isoladas dispersas em meio líquido. Charbrier-Roselló et al.²⁰ embora tenham observado que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, nos protocolos estabelecidos pelos autores, eliminou completamente a enzima deidrogenase de *Candida albicans* enfatizou que os resultados relevantes da Terapia Fotodinâmica em estudos *in vitro*, com poucas condições que remetem ao estado clínico não devem ser extrapoladas para condições *in vivo*, já que fator como a complexidade dos tecidos interfere substancialmente nos resultados.

Zeina et al.¹³³ relacionam a ineficiência da técnica frente a *Candida albicans* também com a dificuldade imposta pela membrana celular que pode agir como uma barreira adicional ao corante. Além disso,

os autores relacionaram ainda o tamanho celular maior das leveduras em relação às células bacterianas, como um fator que poderia dificultar a atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica. O presente estudo preconizou um tempo padrão de irradiação de 3min o que pode ter sido insuficiente para a promoção de atividade antimicrobiana, uma vez que segundo estudos de Zeina et al.¹³³, para o início da atividade antimicrobiana considerável sobre *Candida albicans* nos padrões estabelecidos pelos autores, foi necessário um tempo mínimo de 20min, onde constataram que a fotossensibilização letal de *Candida albicans* é mais lenta que a bacteriana.

Neste estudo foi observado que ao final do ciclo experimental referente ao tratamento endodôntico proposto, não houve diferença entre o grupo teste e controle, sendo observado que com a utilização da medicação intracanal houve diminuição significativa no número de UFC/mL de *Candida albicans* e essa condição foi mantida após período de incubação sem medicação, possibilitando a argumentação de que a medicação utilizada contendo clorexidina demonstrou atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans*, além de ter possibilitado uma atividade residual por não ter sido observado aumento significativo no número de UFC/mL da levedura. Ruff et al.⁸⁹ também constatou por meio de suas investigações que a clorexidina 2% possui substantividade muito importante e uma ótima atividade frente a cepas de *Candida albicans* resistentes á hidróxido de cálcio. Basrani et al.⁸ relataram que clorexidina como irrigante ou como medicação intracanal tem demonstrado eficácia antimicrobiana comparada com hipoclorito de sódio e efetividade sobre cepas resistentes á hidróxido de cálcio e ainda sugerem associar clorexidina com hidróxido de cálcio como alternativa de medicação intracanal frente á *Candida albicans*. Nos estudos de Siqueira Junior et al.¹⁰¹ sobre efetividade da clorexidina como medicação intracanal, ficou demonstrado que clorexidina possui boa atividade frente a *Candida albicans* nos canais radiculares, obtendo atividade melhorada quando associada com pasta de óxido de zinco.

Stowe et al.¹⁰⁹ observaram atividade inibitória da clorexidina 0,12% também sobre *Candida albicans*. O estudo de Menezes et al.⁷⁰ realizado em condições semelhantes às propostas no presente estudo, mostraram efetividade considerável da clorexidina 2% como agente irrigante frente a *Candida albicans*, embora no mesmo estudo outras associações tenham demonstrado efetividade superior.

Os resultados do presente estudo quanto à análise da efetividade do protocolo de tratamento endodôntico associado à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana preconizado neste estudo frente a biofilmes intracanais monoespécie de *Enterococcus faecalis*, foi possível observar que o padrão das fases do tratamento foram semelhantes nos grupos controle e teste, entretanto neste caso, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana apresentou uma redução no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* mais relevante que a redução observada no grupo controle em que foi utilizada somente a instrumentação. Além disso, os resultados deste estudo mostraram que, embora tenha ocorrido aumento no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* após sete dias do tratamento, no grupo teste este aumento permaneceu menor em relação ao observado no grupo controle. Estes resultados estão de acordo com os de Castro et al.¹⁵ que utilizaram Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser diodo (AsGaAl, $\lambda = 685\text{nm}$ e $P = 35\text{mW}$) e corante fotossensibilizador azuleno associado ao Endo-PTC, onde verificaram que a técnica foi capaz de reduzir o número de *Enterococcus faecalis*. Os resultados de Soukos et al.¹⁰⁶ também demonstraram que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em canais radiculares, utilizando laser diodo com auxílio de fibra óptica ($\lambda = 665\text{nm}$, $P = 1\text{W}$) e corante fotossensibilizador azul de metileno, foi capaz de reduzir a porcentagem de *Enterococcus faecalis*. Assim como nos resultados do presente estudo, Soukos et al.¹⁰⁶ verificaram que embora a Terapia Fotodinâmica tenha reduzido a porcentagem de *Enterococcus faecalis*, não ocorreu erradicação total da espécie em canais radiculares. Em investigação realizada por Usacheva

et al.¹²⁰ para analisar a sensibilidade dos microrganismos patogênicos a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, também foi verificada sensibilidade de *Enterococcus faecalis* independente do corante utilizado pelos autores (azul de metileno e azul de toluidina) com laser diodo ($\lambda = 664\text{nm}$, $P = 50$ a 100mW). Neste caso também foi observado que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana não foi capaz de eliminar completamente *Enterococcus faecalis*.

Foi possível observar também que ao final do ciclo experimental, após a utilização da medicação intracanal, a redução no número de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* não apresentou diferença nos grupos controle e teste. Pôde-se observar que a medicação contendo clorexidina mostrou desempenho muito importante, embora não tenha sido capaz de eliminar completamente a espécie organizada na forma de biofilme em canais radiculares. Estes resultados concordam com os encontrados por Gomes et al.³⁶, em que clorexidina gel utilizada como medicação intracanal inibiu o crescimento de *Enterococcus faecalis*, chegando a ser mais efetiva que hidróxido de cálcio, demonstrando também, assim como neste estudo, uma atividade residual por até 15 dias. Portenier et al.⁸⁵ verificaram eliminação de *Enterococcus faecalis* com clorexidina utilizada em diferentes concentrações e associada com outra medicação. Damello et al.²⁵ fizeram observações interessantes sobre a atividade antimicrobiana da clorexidina gel 2%, onde tanto a utilização como irrigante ou como medicação intracanal reduziu o número de UFC de *Enterococcus faecalis* e foi capaz de manter a condição alcançada por até 7 dias, comprovando a propriedade de substantividade da clorexidina, assim como observado no presente estudo, que ao final do ciclo experimental houve a manutenção da condição de redução alcançada com o uso da medicação intracanal.

Segundo Gomes et al.³⁶ a atividade da clorexidina gel 2% depois de 15 dias sugere que a viscosidade na forma gel possibilita o contato do agente ativo com o canal e túbulos dentinários e que esta consistência é capaz de penetrar por mais de 0,4mm nos túbulos.

Dentre os resultados das investigações sobre a efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente *Enterococcus faecalis* analisadas no presente estudo, não foram encontradas evidências sobre falta de atividade da Terapia Fotodinâmica para a referida espécie. Este fato denota que é interessante o aprimoramento do protocolo de utilização da técnica em canais radiculares, uma vez que, mesmo em desafios na forma de biofilme e canais radiculares dotados de muitas anfractuosidades, a Terapia Fotodinâmica tem atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*, uma das espécies mais resistentes ao tratamento endodôntico convencional.

Neste estudo, os resultados da análise da efetividade do protocolo de tratamento endodôntico associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente a biofilmes intracanaís monoespécie de *Escherichia coli*, foi possível observar que o padrão das fases do tratamento foram semelhantes nos grupos controle e teste. Relacionando os resultados dos grupos controle e teste foi observada que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana associada a instrumentação foi, de forma imediata, melhor que o tratamento utilizando-se apenas a instrumentação, mas após a utilização da medicação intracanal, ao final do ciclo experimental, os dois tratamentos reduziu totalmente o número de UFC/mL de *Escherichia coli*. Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os descritos por Usacheva et al.¹¹⁸ onde observaram que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser diodo ($\lambda = 664\text{nm}$) e corantes fotossensibilizadores azul de metileno e azul de bluidina, foi efetiva na inativação de *Escherichia coli*, alcançando eliminação total utilizando-se concentrações de 95 a 170 μM de azul de toluidina e de 180 a 250 μM de azul de metileno. Komerick e Wilson⁵⁵ observaram redução de *Escherichia coli* com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana dependente da dose de energia da luz incidente. Os estudos de Prates et al.⁸⁶ verificaram efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana com laser diodo ($\lambda = 660\text{nm}$ e $P = 100\text{mW}$) frente a *Escherichia coli* utilizando-se corante

fotossensibilizador azul de metileno, alcançando índices de redução em tubos de ensaio, de até 99,85%. Segundo Zancanella et al.¹²⁹ a inativação efetiva da Terapia Fotodinâmica frente à *Escherichia coli* utilizando-se laser diodo ($\lambda = 660\text{nm}$) e corante fotossensibilizador azul de metileno, está relacionada com a capacidade do fotossensibilizador catiônico remover íons divalentes dos lipopolissacarídeos da parede celular externa favorecendo a distorção da membrana externa, com a formação de canais que acabam por permitir entrada do fotossensibilizador. Os autores também relatam que embora a Terapia Fotodinâmica, nos padrões utilizados seja efetiva para *Escherichia coli*, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes á processos de fotoinativação devido às características estruturais da célula, sendo que muitos estudos recomendam a utilização de aditivos como EDTA ou polimixina B ao corante fotossensibilizador para conseguir efetiva inativação.

Neste estudo foi observado que de forma imediata a Terapia Fotodinâmica associada á instrumentação diminui o número de UFC/mL de *Escherichia coli*, mas outros autores como Soukos et al.¹⁰⁵ e ¹⁰⁶ e Komerick e Wilson⁵⁵ mencionaram a susceptibilidade a Terapia Fotodinâmica é maior em bactérias Gram-positivas, com relação às Gram-negativas.

Quanto a atividade antimicrobiana da clorexidina associada á polimixina B, a redução total do número de UFC/mL de *Escherichia coli* após utilização da medicação intracanal pode estar relacionada a presença de polimixina B possibilitando maior atividade da clorexidina. Ogita et al.⁷⁹, por exemplo, relataram que a polimixina B inibiu o crescimento de *Escherichia coli* de maneira bastante efetiva em pequenas concentrações. Zancanella et al.¹²⁹, como anteriormente mencionado, relata que a literatura recomenda uso de aditivos como a polimixina B para melhorar atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli*. Komerick e Wilson⁵⁵ observaram pouca atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica utilizando corante fotossensibilizador ftalocianina e porfirina, e mencionaram que a efetividade desses corantes poderia ser

considerada se houvesse a associação com aditivo tipo EDTA. Os resultados interessantes desse e de outros estudos frente a *Escherichia coli* utilizando-se Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana é importante para despertar interesse pelo aprimoramento do protocolo de utilização da técnica em canais radiculares, levando em consideração a possibilidade de melhorar a efetividade da técnica através da associação de aditivos como EDTA ou polimixina B ao corante fotossensibilizador.

No presente estudo os microrganismos *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* foram inoculados de forma associada no interior dos canais radiculares, constituindo biofilmes multiespécies com o objetivo de verificar diferenças na atividade antimicrobiana da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e medicação intracanal frente aos microrganismos associados. Foi observado que o padrão de comportamento de *Candida albicans* nas fases do tratamento preconizado para o grupo controle diferiu após período de incubação de uma semana de tratamento com instrumentação, sendo observado que a redução alcançada com a instrumentação no grupo de espécimes inoculado com *Candida albicans* associada aos outros microrganismos se manteve após uma semana, diferentemente do grupo controle em que a espécie foi inoculada de forma isolada. Também foi observada diferença após a utilização da medicação intracanal entre o grupo em que os espécimes foram inoculados somente com *Candida albicans* em relação ao grupo de inoculação multiespécies. Neste caso, houve maior redução pela medicação intracanal no grupo dos microrganismos associados, ocorrendo redução total nesse grupo ao final do ciclo experimental. Com esses resultados foi possível observar que ocorreu melhor atividade antimicrobiana do tratamento proposto para o grupo controle quando *Candida albicans* foi inoculada em associação com outros microrganismos, embora ao final do ciclo experimental não tenha sido observada diferença relevante.

Quanto ao padrão de comportamento de *Candida albicans* nas fases do tratamento preconizado para o grupo teste, em que

foi associada instrumentação com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, ocorreu diferença na atividade antimicrobiana imediatamente ao tratamento sendo observado que no grupo dos espécimes em que *Candida albicans* foi inoculada de forma isolada houve maior redução no número de UFC/mL em relação ao grupo em que *Candida albicans* foi inoculada em associação com outros microrganismos. Embora nos dois casos tenha ocorrido aumento do número de UFC/mL após uma semana do tratamento, o aumento foi numericamente maior no grupo que *Candida albicans* foi inoculada em associação com outros microrganismos. Após a utilização da medicação intracanal não houve diferença de comportamento frente a *Candida albicans* entre as fases em ambos grupos. Esses resultados possibilitam concluir que no grupo teste a observação mais importante quanto à comparação no comportamento de *Candida albicans* inoculada em associação ou isoladamente, foi que *Candida albicans* foi mais sensível, de forma imediata, a terapia fotodinâmica antimicrobiana quando inoculada isoladamente. De maneira geral foi possível observar que o comportamento de *Candida albicans* ao final do ciclo experimental preconizado neste estudo para o grupo teste e grupo controle, onde se utilizou instrumentação associada com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, não diferiu significativamente quando inoculada isoladamente ou em associação com outros microrganismos, sendo que a eficiência da atividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente a *Candida albicans*, tanto no caso em que os espécimes foram inoculados isoladamente como naqueles inoculados em associação com outras espécies, não foi satisfatória nas condições propostas no presente estudo.

Neste estudo também foi analisado o padrão de comportamento de *Enterococcus faecalis* nas fases do tratamento preconizado para o grupo controle e teste. Os resultados mostraram que no grupo controle houve diferença em todas as fases, sendo que ao final do ciclo experimental, o único grupo que alcançou redução total de *Enterococcus faecalis* foi aquele em que a inoculação foi realizada em

associação com outras espécies. Nas comparações realizadas no grupo teste, em que foi utilizada a instrumentação em associação com Terapia Fotodinâmica, foi observado que de forma imediata a Terapia Fotodinâmica associada á instrumentação reduziu um número maior de UFC/mL de *Enterococcus faecalis* no grupo em que a espécie foi inoculada isoladamente, e essa condição seguiu o mesmo padrão depois de uma semana do tratamento. Após utilização da medicação intracanal foi observada maior redução de *Enterococcus faecalis* no grupo de inoculação multiespécie. No final do ciclo experimental não foi observada diferença entre o comportamento de *Enterococcus faecalis* comparando-se o grupo de inoculação isolada e com outras espécies associadas quando foi utilizado tratamento de instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. De maneira geral foi possível observar que *Enterococcus faecalis* apresentou diferenças no padrão de comportamento quando inoculado isoladamente em relação a inoculação multiespécies, sendo que apenas no grupo controle de inoculação multiespécies foi verificada eliminação total de *Enterococcus faecalis* ao final do ciclo experimental.

Quanto aos resultados do presente estudo frente a *Escherichia coli* foi possível observar que o comportamento da espécie quando inoculada isoladamente foi diferente da inoculação em associação com outras espécies, tanto nos grupos controle quanto nos grupos teste, na fase em que se verificou a atividade antimicrobiana imediata aos tratamentos (instrumentação e instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana). No grupo controle ocorreu maior redução de *Escherichia coli* imediata ao tratamento no grupo de inoculação multiespécies, já no grupo teste a maior redução foi observada no grupo de inoculação com *Escherichia coli* somente. Os resultados do presente estudo também evidenciaram que, ao final do ciclo experimental, não ocorreu diferença no comportamento de *Escherichia coli* tanto nos grupos teste e controle de inoculação mono e multiespécies. De maneira geral foi possível observar que *Escherichia coli* apresentou diferenças no

comportamento imediato ao tratamento com instrumentação e com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, sendo que *Escherichia coli* foi mais sensível, de forma imediata, ao tratamento associando-se Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana no grupo de espécimes de inoculação isolada. Entretanto, não foram observadas diferenças no comportamento de *Escherichia coli* nos grupos inoculados isoladamente ou com outras espécies associadas ao final do ciclo experimental levando em consideração os tratamentos propostos neste estudo.

Na literatura é uma tendência verificar efetividade de medicamento, técnicas e materiais frente a comunidades de biofilmes microbianos^{42, 72, 75, 125 e 133}. O emprego de biofilmes monoespécies e multiespécies para observação das características nestes tipos distintos de comunidades microbianas podem ser observados em estudos na literatura^{72, 75, 125 e 130}, entretanto não foram constatadas evidências na literatura consultada, que pudessem ser utilizadas como parâmetros de comparação com os resultados obtidos no presente estudo.

No protocolo de tratamento endodôntico associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana preconizado neste estudo frente a neutralização de endotoxinas em biofilmes intracanal monoespécie de *Escherichia coli*, demonstrou que no grupo teste a redução na quantidade de endotoxina imediatamente ao tratamento com instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica foi mantida após uma semana do tratamento. No grupo teste também foi possível observar, que a condição de redução alcançada com a utilização da medicação intracanal se manteve após remoção da medicação, ao final do ciclo experimental. Embora tenha ocorrido diferença no comportamento do grupo teste e controle, ao final do ciclo experimental os resultados dos tratamentos na neutralização de endotoxina foram semelhantes.

Poucos são os estudos verificando a atividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana sobre endotoxina. Na literatura consultada apenas a investigação de Komerick e Wilson⁵⁵ demonstrou interesse em

relacionar a atividade da Terapia Fotodinâmica com endotoxinas. Entretanto os autores avaliaram a influência da Terapia Fotodinâmica com laser de baixa potência (22,3 – 74,4J/cm²) e corante azul de toluidina sobre a bioatividade da endotoxina. Os autores mostraram que a Terapia Fotodinâmica nos padrões utilizados foi capaz de diminuir a bioatividade da endotoxina em estimular IL-6 e IL-8, além disso, essa diminuição foi dependente da concentração do corante e da dose de energia empregada. O presente estudo não relacionou a bioatividade da endotoxina com os tratamentos endodônticos preconizados, o que impossibilita comparações com o estudo de Komerick e Wilson⁵⁵.

Os resultados do presente estudo podem ser comparados, no entanto, com os estudos de Tanomaru et al.¹¹² e Silva et al.⁹⁹ que, embora tenham avaliado a efetividade da clorexidina 2% na forma líquida e na forma gel como agente irrigante intracanal, verificaram que a clorexidina 2% não inativou endotoxina de *Escherichia coli*, inclusive não demonstrou inibição em sua atividade biológica. No presente estudo, clorexidina gel 2% associada a polimixina B foi capaz de neutralizar endotoxina de *Escherichia coli*, apesar não ter sido verificada neutralização total de endotoxina em nenhum dos casos. O efeito de neutralização demonstrado neste estudo, pode estar relacionado com a diminuição no número de UFC/mL de *Escherichia coli* após utilização da medicação intracanal e também com uma possível potencialização do efeito da clorexidina pela polimixina B, já que alguns autores relataram essa possibilidade^{55 e 129}.

Foi possível observar também que o perfil de redução da quantidade de endotoxina no grupo de inoculação de *Escherichia coli* isolada foi diferente da inoculação em associação com outras espécies. No grupo teste, em que o tratamento realizado associou instrumentação com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, houve uma redução maior na quantidade de endotoxina em relação ao grupo controle e, neste caso, a redução foi mantida após uma semana de incubação. Foi possível constatar que mesmo após utilização da medicação intracanal de

clorexidina gel e polimixina B, a redução se manteve como a alcançada com o tratamento de instrumentação associado a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. Comparando-se o comportamento da quantidade de endotoxina nos grupos teste de inoculação de *Escherichia coli* isolada com associada a outras espécies, foi constatado que no grupo de inoculação monoespécie a quantidade de endotoxina apresentou uma redução maior ao final do ciclo experimental proposto em relação ao grupo de biofilme multiespécie. No grupo controle, ocorreu maior redução da quantidade de endotoxina após utilização da medicação intracanal no grupo de inoculação de *Escherichia coli* isolada, mas ao final do ciclo experimental, a quantidade de redução de endotoxina foi semelhante entre os grupos de inoculação de *Escherichia coli* isolada e associada a outras espécies. De maneira geral foi possível observar que a quantidade de endotoxina, nos grupos de inoculação de *Escherichia coli* isolada e associada a outras espécies, apresentou diferenças nas fases dos tratamentos propostos. Foi possível observar que nos grupos controle de contaminação mono e multiespécies, a diminuição da quantidade de endotoxina foi semelhante ao final do ciclo experimental, já nos grupos teste ocorreu maior redução da quantidade de endotoxina no grupo de inoculação monoespécie.

Neste caso, os resultados mostraram que a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana associada ao tratamento de instrumentação foi melhor na neutralização de endotoxina de forma imediata ao tratamento, comparado com o grupo controle, mas após utilização da medicação intracanal de clorexidina gel 2% associada a polimixina B, não ocorreu diferença na quantidade de endotoxina comparando-se os grupos controle e teste. Assim como no grupo de inoculação isolada de *Escherichia coli*, o efeito de neutralização pode estar relacionado com a diminuição no número de UFC/mL de *Escherichia coli* após utilização da medicação intracanal e também com uma possível potencialização do efeito da clorexidina pela polimixina B, já que alguns autores relataram essa possibilidade^{55 e 129}.

A avaliação do tratamento preconizado no presente estudo frente ao desafio de biofilmes mono e multiespécies foi importante já que na infecção endodôntica *in vivo* existe esta mesma condição de organização dos microrganismos, aumentando a possibilidade de transposição dos resultados para a clínica. Dunavant et al.²⁷ mencionaram que poucos são os estudos que avaliam a efetividade de técnicas, materiais, instrumentos, entre outros, sobre o crescimento dos microrganismos na forma de biofilme. Seal et al.⁹⁶ discutiram sobre o fato de que a fotossensibilização letal, apesar de apresentar resultados promissores, não tem sido aplicada sobre biofilmes intracanal. Segundo Zanim et al.¹³⁰ relataram a importância da verificação da Terapia Fotodinâmica sobre as diferentes fases dos biofilmes, já que em seus estudos observaram que biofilmes mais velhos são menos susceptíveis a terapia. Müller et al.⁷⁵ mencionaram que biofilmes mais velhos são mais resistentes também à clorexidina, em comparação com os mais novos. Os autores também fizeram menção ao fato de que pouco se conhece sobre o efeito da Terapia Fotodinâmica sobre biofilmes. Em contrapartida, Wood et al.¹²⁵ observaram que os biofilmes jovens de *Streptococcus mutans* foram menos susceptíveis a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana que os biofilmes mais velhos.

Apesar do presente estudo não ter incluído grupos experimentais analisando a efetividade da utilização do corante fotossensibilizador azuleno ou da irradiação laser de AsGaAl (no parâmetro da Terapia Fotodinâmica) isoladamente, esses aspectos foram analisados em diferentes estudos, sob diferentes condições e, na grande maioria dos casos, não foram observados resultados relevantes na utilização isolada dessas condições. Os estudos comprovaram que essa forma de utilização não apresenta diferença com relação aos grupos designados como controle^{12, 15, 20, 34, 55, 58, 96, 105, 106 e 133}.

Embora o presente estudo não teve como proposta avaliar a atividade dos tratamentos sobre os fatores de virulência dos microrganismos, na literatura pode ser observado que a Terapia

Fotodinâmica é capaz de interferir com alguns desses fatores, mesmo quando não é relevante a redução microbiana alcançada pela técnica^{13, 55 e 76}, sendo importante investigações que elucidem melhor a interferência da Terapia Fotodinâmica com esses fatores.

É incontestável que no tratamento endodôntico, as etapas de instrumentação, irrigação e medicação intracanal são essenciais para o sucesso do tratamento, entretanto o melhoramento da técnica, medicamentos e materiais utilizados convencionalmente, vêm de encontro ao objetivo de proporcionar sempre um tratamento de maior qualidade, menos dispendioso, mais confortável para o paciente e para o profissional e, principalmente mais efetivo. Todos esses fatores, sem dúvida, estão relacionados com a repercussão do sucesso do tratamento em Endodontia.

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana não deve ser desmerecida, nem exaltada pelos profissionais segundo Miller et al.⁷⁵. Segundo esses autores, a aplicação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana não deve substituir os regimes dos tratamentos convencionais, mas deve ser aprimorada no sentido de implementação como coadjuvante ao tratamento convencional, já que o laser de baixa intensidade é seguro, de fácil manipulação e aceitação pelo paciente, apresenta outras vantagens além de promover atividade antimicrobiana quando associado a um corante fotossensibilizador e é uma alternativa viável em relação ao custo relativamente baixo do aparelho emissor de irradiação.

Acreditamos que são necessárias investigações para aprimorar os resultados do protocolo de tratamento endodôntico proposto neste estudo, a fim de que sejam estabelecidos outros protocolos de tratamento passíveis de aplicação na clínica. Talvez, devido aos inúmeros fatores que influenciam na efetividade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e diversidade microbiana associada a cada quadro clínico endodôntico, os estudos encontrarão estratégias efetivas para cada condição específica, assim como já ocorre com os antibióticos atuais.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que:

- a) a instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* foi efetiva, mas não apresentou efetividade frente a *Candida albicans*, no caso dos biofilmes intracanal monoespécie;
- b) a instrumentação associada a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana não foi efetiva frente aos microrganismos e neutralização de endotoxinas no caso dos biofilmes intracanal multiespécies;
- c) a utilização da medicação intracanal de clorexidina gel 2% associada a polimixina B não promoveu total neutralização de endotoxina de *Escherichia coli* em biofilmes intracanal monoespécie e multiespécie, mas apresentou significativa efetividade sobre os microrganismos estudados.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Al-Hezaimi K, Al-Hamdan K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JHS, Rotstein I. Effect of white-colored mineral trioxide aggregate in different concentrations on *Candida albicans in vitro*. J Endod. 2005;31(9):684-6.
- 2 Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JHS, Rotstein I. Antibacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. J Endod. 2006;32(11):1053-6.
- 3 Al-Hezaimi K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JHS, Rotstein I. Comparison of antifungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. J Endod. 2006;32(4):365-7.
- 4 Almeida-Lopes L. Dosimetria. DMC J. 2007;1(1):16-7.
- 5 Altundasar E, Özçelik B, Cehreli ZC, Matsumoto K. Ultramorphological and histochemical changes after ER,CR:YSGG laser irradiation and two different irrigation regimes. J Endod. 2006;32(5):465-8.
- 6 Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. Física na Escola. 2001;2(2): 4-9.

* Baseado em:

International Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic services division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 7 Bagnato VS. Presentes desafios e perspectivas da terapia fotodinâmica. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 8 Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L. Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. J Endod. 2004;30(6):413-7.
- 9 Belber VB. Verificação da redução de *Enterococcus faecalis* no canal radicular e nos túbulos dentinários utilizando diferentes substâncias químicas auxiliares e técnicas de instrumentação: estudo *in vitro* [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- 10 Berkiten M, Berkiten R, Okar I. Comparative evaluation of antibacterial effects of Nd: YAG laser irradiation in root canals and dentinal tubules. J Endod. 2000;26(5):268-70.
- 11 Brandalize MCB, Philips J. Padrões de classificação de equipamentos laser utilizados em levantamentos terrestres e aéreos. Congresso Brasileiro de Cadastro Técnico Multifinalitário da Universidade Federal de Santa Catarina [texto da internet]. Florianópolis; 2002. [citado em 31/01/2008] Disponível em: <http://geodesia.ufsc.br/Geodesia-online/arquivo>
- 12 Brasil CO, Castro MR, Khouri S, Arisawa EAL. Avaliação, *in vitro*, da terapia fotodinâmica em cultura de *Candida albicans*. Anais do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos; 2006.

- 13 Buck STG, Imasato H, Perussi JR. Correlação estrutura-atividade de corantes em terapia fotodinâmica. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 14 Caminos DA, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. Bioorg Med Chem. 2006;14:4253-9.
- 15 Castro MR, Brasil CO, Khouri S, Arisawa EAL. Avaliação *in vitro* do efeito da terapia fotodinâmica em suspensão de *Enterococcus faecalis*. Anais do X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação da Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos; 2006.
- 16 Cavalcante AKD, Martinez GR, Mascio PD, Menck CFM, Agnez-Lima LF. Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains. DNA repair. 2002;1:1051-6.
- 17 Cecchini SCM. Desinfecção da dentina radicular pela irradiação dos lasers de Nd:YAG, Ho:YAG e Er:YAG: um modelo *in vitro* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2001.
- 18 Centralx. Bula-Medicamentos, Terra - Cortril[®] Creme. [citado 21/03/2007]. Disponível em : <http://www.bulas.med.br>
- 19 Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. Lasers Med Scie. 2003;18(1):51-5.
- 20 Charbrier-Roselló Y, Foster T, Pérez-Nazario N, Mitra S, Haidaris CG. Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(10):4288-95.

- 21 Chavantes MC. Aplicações Médicas. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 22 Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect immune*. 1983; 41(1):190-6.
- 23 Cunha GL. Medicação sistêmica na prática endodôntica. *Estação Científica*. 2006; 3.
- 24 Damante CA, Greggi SLA, Sant'Ana ACP, Passanezi E. Clinical evaluation of the effects of lowintensity laser (GaAlAs) on wound healing after gingivoplasty in humans. *J Appl Oral Sci*. 2004;12(2):133-6.
- 25 Damello FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assesment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as na endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99:768-2.
- 26 Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2329-35.
- 27 Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2006;32(6):527-31.
- 28 Eldeniz AU, Ozer F, Hadimli HH, Erganis O. Bactericidal efficacy of Er,Cr:YSGG laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation: an *ex vivo* pilot study. *Int Endod J*. 2007;40:112-9.
- 29 Evanov C, Liewehr F, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37°C and 46°C. *J Endod*. 2004;30(9):653-7.

- 30 Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod.* 2003;29(5):338-9.
- 31 Feuerstein O, Moreinos D, Steinberg D. Synergic antibacterial effect between visible light and hydrogen peroxide on *Streptococcus mutans*. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:872–6.
- 32 Folwaczny M, Mehl A, Aggstaller H, Hickel R. Antimicrobial effects of 2.94 μm Er:YAG laser radiation on root surfaces: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2002;29(1):73-8.
- 33 Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, DDS, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:93-8.
- 34 Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007;39:59-66.
- 35 Gentile LC, Gregghi SLA. Clinical evaluation of dentin hypersensitivity treatment with the low intensity Gallium Aluminum Arsenide laser – ArGaAl. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(4):267-2.
- 36 Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J.* 2003;36:267-75.
- 37 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;19:71-6.
- 38 Gomes BPFA, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. *In Vitro* evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. *Braz Dent J.* 2004;15(1):30-5.

- 39 Gonçalves L. Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2005.
- 40 Guimarães Junior L. Biossegurança e controle de infecção cruzada em consultórios odontológicos. São Paulo: Editora Santos; 2001. 536p.
- 41 Gutknecht N, Franzen R, Vanweersch JML, Mir M. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med Sci.* 2005;20:99–103.
- 42 Haas R, Orhun D, Nikoletta MP, Georg M. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser: an *in vitro* study. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(4):249-54.
- 43 Hage R, Plaper H. Terapia fotodinâmica em medicina veterinária. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 44 Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, et al. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49:941-51.
- 45 Heijden IM, Levin AS, Pedri EH, Fung L, Rossi F, Duboc G, Barone AA, Costa SF. Comparison of disc diffusion, etest and broth microdilution for testing susceptibility of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* to polymyxins. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2007;6:1-8.
- 46 Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infections bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(3):162-9.
- 47 Hutter JW. Commentary: Endotoxin Content in Endodontically Involved Teeth. *J Endod.* 2006;32(4):291-2.

- 48 Ishikawa I, Aoki A, Takasaki AA. Potential applications of Erbium:YAG laser in periodontics. *J Periodont Res.* 2004;39:275–85.
- 49 Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol.* 2005;54:777-83.
- 50 Jiménez-Banzo A, Nonell S, Hofkens J, Flors C. Singlet oxygen photosensitization by and its chromophore HBDI. *Biophys J BioFast.* 2007. [citado em 12/01/08]. Disponível em : <http://www.biophysj.org>
- 51 Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod.* 2006;32(10):946-50.
- 52 Jori G, Brown SB. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:403-5.
- 53 Karim IE, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:560-9.
- 54 Komerick N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol.* 2000;72(5):676-80.
- 55 Kömerik N, Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol.* 2002;92:618-23.
- 56 Kömerik N, Nakanishi H, MacRobert AJ, Henderson B, Speight P, Wilson M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):932-40.

- 57 Kreisler M, Kohnen W, Beck M, Haj HA, Christofers AB, Götz H, et al. Efficacy of NaOCl/H₂O₂ irrigation and GaAlAs Laser in decontamination of root canals in vitro. *Lasers Surg Med.* 2003;32:189-96.
- 58 Lambrechts SAG, Aalders MCG, Van Marle J. Mechanistic Study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(5):2026-34.
- 59 Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of Bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(2):93-8.
- 60 Lin S, Zuckerman O, Weiss E, Mazor Y, Fus Z. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. *J Endod.* 2003;29(6):416-8.
- 61 Lizarelli RFZ. Protocolos clínicos odontológicos: uso do laser de baixa intensidade. São Paulo: Bons Negócios Editora; 2005. 90p.
- 62 Lopes LA. Fototerapia. *DMC J.* 2007; 1(1):3.
- 63 Lui JN, Sae-Lim V, Song KP, Chen NN. In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated gutta percha points on *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2004;37:105-13.
- 64 Majewski M, Ribeiro MA, Junqueira JC, Jorge AOC. Efeitos da terapia fotodinâmica sobre cepas de *Candida* isoladas de pacientes submetidos a antibioticoterapia prolongada. *Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde.* São Pedro; 2007.
- 65 Mapeli NC, Vieira MC, Heredia ZNA, Siqueira JM. Produção de biomassa e de óleo essencial dos capítulos florais da camomila em função de nitrogênio e fósforo. *Horticultura Brasileira.* 2005; 23(1):32-7.

- 66 Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon lamp in vitro. *J Periodont Res.* 2003;38:428–35.
- 67 Maver-Biscanin M, Mravak-Stipetic M, Jerolimov V, Biscanin A. Fungicidal Effect of diode laser irradiation in patients with denture stomatitis. *Lasers Surg Med.* 2004;35:259-62.
- 68 Melker KB, Vertucci FJ, Rojas MF, Progulske-Fox A, Bélanger M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. *J Endod.* 2006; 32(2):148-51.
- 69 Mello JB, Mello GPS. *Laser em Odontologia.* São Paulo: Santos; 2001.174p.
- 70 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;37:311-9.
- 71 Messede, OH, Teles JMM, Espinheira L, Agareno S, Farias A. Uso da polimixina B no tratamento das infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes. *Anais 2º Simpósio Internacional de Terapia Intensiva e Medicina de Emergência.* São Paulo; 2003.
- 72 Metcalf D, Robinson C, Devine D, Wood S. Enhancement of erythrosine-mediated photodynamic therapy of *Streptococcus mutans* by light fractionation. *J Antimicrobiol Chemother.* 2006; 58:190-2.
- 73 Miyamoto S, Rosein GE, Prado F, Uemi M, Medeiros MHG, Di Mascio P. Hidroperóxidos biológicos e geração de oxigênio molecular singlete. *Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde.* São Pedro; 2007.

- 74 Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J, Sperr W. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int.* 1997;28(3):205-9.
- 75 Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. *Eur J Oral.* 2007;115:77-80.
- 76 Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B.* 2007;88:16-20.
- 77 Murakami Y, et al. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:321-5.
- 78 Núñez SC, Garcez AS, Ribeiro MS. PDT antimicrobiana em Odontologia: mecanismos e aplicações. *Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde.* São Pedro; 2007.
- 79 Ogita A, Nagao Y, Fujita K, Tanaka T. Amplification of vacuole-targeting fungicidal activity of antibacterial antibiotic polymyxin B by allicin, an allyl sulfur compound from garlic. *J Antibiot.* 2007;60(8):51-18.
- 80 Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JAP. Dissolution of pulp tissue by aqueous solutions of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconae gel. *Int Endod J.* 2004;37:38-41.
- 81 Oliveira LD, Carvalho CAT, Valera MC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Diffusion ability of endotoxin through dentinal tubules. *Braz Oral Res.* 2005;19(1):5-10.

- 82 Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent*. 2005;33:107-14.
- 83 Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol*. 2000;76(2-3):97-119.
- 84 Pinheiro ET. Investigação de bactérias associadas ao insucesso do tratamento endodôntico [dissertação]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2000.
- 85 Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod*. 2006;32(2):138-41.
- 86 Prates RA, Suzuki LC, Yamada AM, Ribeiro MS. Azul de metileno, verde de malaquita, indocianina verde e verterporfirina: ação fotodinâmica antimicrobiana sobre *Escherichia coli*. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 87 Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, et al. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2004;37:438-46.
- 88 Rossoni RD, Souza RC, Junqueira JC, Jorge AO. Fotossensibilização de *Candida albicans* por radiação laser de baixa potência. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 89 Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod*. 2006;32(4):331-3.

- 90 Sakamoto M, Siqueira Junior JF, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:19-23.
- 91 Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 2004;37:193-8.
- 92 Schackley DC, Whitehurst C, Clarke NW, Betts C, Moore JV. Photodynamic therapy. *J R Soc Med.* 1999;92:562-5.
- 93 Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod.* 2006;32(4):293-5.
- 94 Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedielik N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med.* 2004; 35(2):111-6.
- 95 Schoop U, Kluger W, Dervisbegovic S, Goharkhay K, Wernisch J, Georgopoulos A, et al. Innovative Wavelengths in Endodontic Treatment. *Lasers Surg Med.* 2006;38:624-30.
- 96 Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int Endod J.* 2002;35:268-74.
- 97 Segundo ASG. Laser em baixa intensidade associado à fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.
- 98 Setúbal CA, Da Motta Neto JD. Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.

- 99 Silva LAB, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J.* 2004;15(2):109-14.
- 100 Silva LAB, Perassi FT, Ito IY, Bonifácio KC, Filho MT. A presença de fungos nas infecções endodônticas. *FOL.* 2000 Jan./dez;12(1,2):62-6.
- 101 Siqueira Junior JF, Rôças IN, Lopes HP, Magalhães FAC, Uzeda M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *J Endod.* 2003;29(8):501-4.
- 102 Siqueira Junior JF, Paiva S, Rôças IN. Redution in the cultivable populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod.* 2007;33(5):541-7.
- 103 Siqueira Junior JF, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 July;104:122-30.
- 104 Soares IJ, Goldberg F. *Endodontia: técnica e fundamentos.* Porto Alegre: Artmed; 2001. p.155-99.
- 105 Soukos N, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. *Lasers Surg Med.* 2003;33:161-8.
- 106 Soukos NS, Chen PSY, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006;32(10):979-84.
- 107 Souza EB, Amorim CVGA, Lage Marques JL. Effect of diode laser irradiation on the apical sealing of MTA retrofillings. *Braz Oral Res.* 2006;20(3):231-4.

- 108 Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B*. 2006;83:34–8.
- 109 Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2004;30(6):429-31.
- 110 Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod*. 2006;32(2):93-8.
- 111 Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K. A comparative study of the removal of smear layer by three endodontic irrigant and two types of laser. *Int Endod J*. 1999;32:32-9.
- 112 Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LAB. Effect of different irrigants solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J*. 2003;36:733-9.
- 113 Tardivo JP, Petri V, Baptista MS. Uma nova abordagem para terapia fotodinâmica em medicina. *Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde*. São Pedro; 2007.
- 114 Tedesco AC. Novas perspectivas no desenvolvimento de fármacos fotossensíveis aplicáveis a terapia fotodinâmica. *Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde*. São Pedro; 2007.
- 115 Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93:155-60.

- 116 Torres CRG, Borges AB, Kubo, CH, Gonçalves SCP, Araújo RM, Celaschi S et al. Clareamento dental com fontes híbridas LED/LASER. Taubaté: Evidência Visual; 2004. 140p.
- 117 Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. São Paulo: Atheneu; 2004.
- 118 Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001;29:165-73.
- 119 Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med.* 2003;33:311-9.
- 120 Usacheva MN, Teichert MC, Sievert CE, Biel MA. Effect of Ca²⁺ on the photobactericidal efficacy of methylene blue and toluidine blue against Gram-negative bacteria and the dye affinity for lipopolysaccharides. *Lasers Surg Med.* 2006;38:946-54.
- 121 Vivaqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single-or-multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. *Int Endod J.* 2005;38:697-704.
- 122 Walsh, LJ. The current of laser applications in dentistry. *Australian Dent J.* 2003;48(3):146-55.
- 123 Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003;29(9):562-4.
- 124 Williamson AE, Dawson DV, Drake DR, Walton RE, Rivera EM. Effect of root canal filling/sealer systems on apical endotoxin penetration: a coronal leakage evaluation. *J Endod.* 2005;31(8):599-604.

- 125 Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:680-4.
- 126 Wuerch RMW, Apicella MJ, Mines P, Yancich PJ, Pashley DH. Effect of 2% chlorhexidine gel as an intracanal medication on the apical seal of the root-canal system. *J Endod.* 2004;30(11):788-91.
- 127 Yamada A. Terapia fotodinâmica antimicrobiana: o mais novo aliado do cirurgião-dentista nos processos infecciosos. *DMC J.* 2007;1(1):22-3.
- 128 Yoshimura EM. Dosimetria de luz. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 129 Zancanela DC, Machado AEH, Filho PPC, Oliveira CA. Atividade fotobactericida do azul de metileno e ftalocianina de zinco frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Anais do Congresso de PDT 2007 - Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos moleculares, tecnológicos e aplicações na área da saúde. São Pedro; 2007.
- 130 Zanin ICJ, Gonçalves RB, Brugnara Junior A, Hope CK, Pratten J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an *in vitro* study. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:324-30.
- 131 Zanin ICJ. Estudo da ação antimicrobiana da terapia fotodinâmica sobre biofilmes orais [tese]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
- 132 Zanin ICJ, Lobo MM, Rodrigues LKA, Pimenta LAF, Höfling JF, Gonçalves RB. Photosensitization of *in vitro* biofilms by toluidine blue O combined with a light-emitting diode. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:64-9.

- 133 Zeina B, Greenman J, Purcell WM, Das B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2001;144:274-8.
- 134 Zoletti GO, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and—independent approaches. *J Endod.* 2006;32(8):722-6.

Apêndice A – Tabela dos resultados obtidos na análise descritiva dos dados em UFC/mL das coletas dos grupos controle e teste nos espécimes contaminados com *Candida albicans*

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	5000	340000	107900	114805,584
C2 controle	10	10	500	138	147,558
C3 controle	10	18480	32800	25202	4804,895
C4 controle	10	0	910	92	287,433
C5 controle	10	0	140	16	43,767
C1 teste	10	12000	1960000	382500	697386,112
C2 teste	10	10	140	38	37,357
C3 teste	10	20	30430	15442	12167,531
C4 teste	10	0	5860	1024	2186,577
C5 teste	10	0	2260	372	806,595

Apêndice B - Tabela dos resultados obtidos na análise descritiva dos dados em UFC/mL nas coletas dos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com *Enterococcus faecalis*

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	13600	1472000	851000	402274,92
C2 controle	10	4120	24400	13074	6472,797
C3 controle	10	5760	35210	23408	9932,51
C4 controle	10	0	854	190	346,845
C5 controle	10	0	774	93	240,927
C1 teste	10	196000	1840000	709600	584779,389
C2 teste	10	65	4120	929	1266,6
C3 teste	10	3480	15680	9155	3597,849
C4 teste	10	0	99	36	41,256
C5 teste	10	0	231	57	93,65

Apêndice C – Tabela dos resultados obtidos na análise descritiva dos dados em UFC/mL das coletas dos grupos controle e teste dos espécimes contaminados com *Escherichia coli*

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	11200000	45500000	31500000	11234174
C2 controle	10	23600	118200	60600	35335,2
C3 controle	10	0	2343000	1080200	939968,5
C4 controle	10	0	0	0	0
C5 controle	10	0	0	0	0
C1 teste	10	1790000	44600000	23540000	15764963
C2 teste	10	0	2300	349	779,2
C3 teste	10	554000	2992000	1376000	735323,9
C4 teste	10	0	0	0	0
C5 teste	10	0	0	0	0

Apêndice D – Tabela dos resultados em UFC/mL para *Candida albicans* obtidos na análise descritiva dos dados nas coletas dos grupos controle e teste no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	10000	4200000	667300	1275049
C2 controle	10	10	8700	1467	3544
C3 controle	10	10	67000	11259	22233
C4 controle	10	0	200	83	89,1
C5 controle	10	0	0	0	0
C1 teste	10	1000	8300000	1269429	3106221
C2 teste	10	30	6300	1288	1866
C3 teste	10	4000	284000	101010	111206
C4 teste	10	0	97	13,8	30
C5 teste	10	0	5180	845	1801

Apêndice E – Tabela dos resultados em UFC/mL para *Enterococcus faecalis* obtidos na análise descritiva dos dados nas coletas dos grupos controle e teste no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	360000	24800000	8816000	7001674,2
C2 controle	10	900	15800	3260	4462,2
C3 controle	10	21000	698000	292400	237228,5
C4 controle	10	0	10	3	4,8
C5 controle	10	0	0	0	0
C1 teste	10	19000	24100000	4683900	8017764,7
C2 teste	10	420	15400	5134	4819
C3 teste	10	25600	396000	234760	158456
C4 teste	10	0	50	10	18
C5 teste	10	0	1880	504	678,5

Apêndice F – Tabela dos resultados em UFC/mL para *Escherichia coli* obtidos na análise descritiva dos dados nas coletas dos grupos controle e teste no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	225000	51800000	9150500	15747741
C2 controle	10	210	30600	11691	11041
C3 controle	10	1000	490000	176810	181294,4
C4 controle	10	0	0	0	0
C5 controle	10	0	0	0	0
C1 teste	10	0	2430000	359300	763825,3
C2 teste	10	340	21200	6616	7929,4
C3 teste	10	700	2152000	1362470	668487
C4 teste	10	0	10	1	3,1
C5 teste	10	0	270	30	84,5

Apêndice G – Tabela dos resultados obtidos na análise descritiva dos dados de quantidade de endotoxina em UE/mL nas coletas dos grupos controle e teste nos espécimes contaminados com *Escherichia coli*

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	50000	50000	50000	0
C2 controle	10	395	50000	20224	20670,2
C3 controle	10	50000	50000	50000	0
C4 controle	10	47	6290	1237	1874,8
C5 controle	10	223	27000	8442	8443,7
C1 teste	10	50000	50000	50000	50000
C2 teste	10	2280	50000	34195	18944
C3 teste	10	9070	50000	38197	15408,5
C4 teste	10	354	50000	7527	15784
C5 teste	10	1020	50000	9702	15414,2

Apêndice H – Tabela dos resultados em UE/mL para quantidade de endotoxina obtidas na análise descritiva dos dados nas coletas dos grupos controle e teste no grupo de espécimes contaminados com os microrganismos associados

coletas	n	mínimo	máximo	média	desvio-padrão
C1 controle	10	1670	50000	29540	20488,9
C2 controle	10	32	500	259	169,9
C3 controle	10	49700	50000	49970	94,8
C4 controle	10	5060	50000	16203	13682
C5 controle	10	59	10300	3711	3635,5
C1 teste	10	6100	50000	35540	15088
C2 teste	10	69	50000	18124	20056
C3 teste	10	851	50000	21919	17679
C4 teste	10	7130	50000	71160	151426,1
C5 teste	10	3850	50000	17733	15140,9

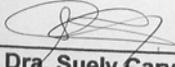
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - M. São Diniz
CEP 12201-970 - F. (13) 3947-9028

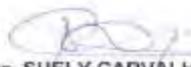
CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **060/2005-PH/CEP**, sobre “Efetividade *in vitro* da terapia fotodinâmica com laser ArGaI, na eliminação de microrganismos e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares” sob a responsabilidade de **FRANCINE CRISTINA DA SILVA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

São José dos Campos, 11 de outubro de 2005.


Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

ANEXO B – Parecer de alteração do título do projeto certificado pelo
Comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA <small>Av. Dr. Placido de Castro, 111 - São José dos Campos - CEP 12244-900 - SP - Fone: (12) 3347-8800 - FAX: (12) 3347-8828</small>	
 Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	
São José dos Campos, 19 de fevereiro de 2008	
Ofício nº 01/08-CEP	
Prezado(a) Sr.(a)	FRANCINE CRISTINA SILVA ROSA
Projeto	Efetividade in vitro da terapia fotodinâmica com laser ArGaGI, na eliminação de microorganismos e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares.
PARECER	
<p>Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a ALTERAÇÃO DO NOME DO PROJETO, passando para "Eficácia da instrumentação associada à terapia fotodinâmica antimicrobiana e medicação intracanal na eliminação de biofilmes e na neutralização de endotoxinas em canais radiculares". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 060/2005-PH/CEP de 11/10/2005</p>	
Atenciosamente,	
 Prof. Dra. SUELY CARVALHO MUTTI NARESSI Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC	

ROSA, F.C.S. *In vitro* effectiveness of photodynamic therapy with low potency AsGaAl laser in the elimination of microorganisms and neutralization of endotoxins in root canals. [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2008.

ABSTRACT

The use of laser radiation as an intra canal disinfection method against microorganisms recalcitrant to conventional therapy and endotoxins, that represents one of the main etiologic agents involved in the pathogenesis of the periapical lesions, has been studied nowadays. This way, the aim of this study was to evaluate in vitro the effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (PDT) using ArGaAl low potency laser with azulene in the elimination of intracanal monospecies or multispecies biofilms formed by Candida albicans ATCC 18804, Enterococcus faecalis ATCC 29212, Escherichia coli ATCC 25922, and also in the neutralization of endotoxins in root canals. Also, to analyze the effectiveness of 2% chlorhexidine gel associated to polymixin B as intra canal medication for the disinfection of root canal system. Eighty human dental roots standardized in 16 mm and properly prepared will be used. The specimens were contaminated and incubated during 14, 21 or 28 days with the microorganisms individually or associated. In the group contaminated with Escherichia coli the neutralization of endotoxin was also verified. After 14 days, sampling of intra canal content was plated in selective culture medium for each specie. Teeth were instrumented (Kerr #35-80) and, then, the association of 25% azulene and Endo-PTC was inserted in the root canal interior and the specimens will be irradiated with ArGaAl laser for 3 minutes. Two sampling from the root canal content was performed, one immediately after the instrumentation and photodynamic therapy and another after 7 days. Then, root canals received as medication, an association of polymixin B and 2% chlorhexidine gel for 14 days. In the groups inoculated with Escherichia coli the neutralization of endotoxin was evaluated by chromogenic cinetic test. Control groups that were instrumented but were not treated with PDT were included in the study. Paired data from the same sampling unit, obtained in the microbiological and endotoxina neutralization analyzes were submitted to Wilcoxon's test (5) and non-paired data to Mann-Whitney test (5%). It was concluded that instrumentation associated to antimicrobial photodynamic therapy was effective against E. faecalis and E. coli as monospecies intracanal biofilm, however showed no effect against the other tested microorganisms and in the neutralization of endotoxins. Also, the use of 2% chlorhexidine gel and polymixin B did not promote the neutralization of endotoxin of Escherichia coli in mono and multispecies intracanal biofilms, but was effective against the microorganisms studied.

KEYWORDS: *Photodynamic Therapy; Endodontics; laser; disinfection*