

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor (a), o texto completo desta tese será disponibilizado a partir de

15/12/2019



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

AMJAD ABU HASNA

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

2017

AMJAD ABU HASNA

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

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

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

São José dos Campos
2017

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

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

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

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

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (coorientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Cláudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Universidade São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia

Campus de Bauru

São José dos Campos, 15 de dezembro de 2017.

DEDICATÓRIA

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus amigos da graduação Haya, e Moualla.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

À CAPES pela concessão de bolsa.

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

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

Alexander o Grande

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

Alexandre The Great

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sendo assim, pelo presente estudo verificou-se que:

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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