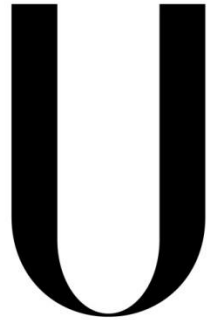


Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Estudo comparativo da ação microbiana do
Hipoclorito de Sódio recorrendo a Terapia
Fotodinâmica contra *Enterococcus faecalis***

Maria João Coelho Valadas

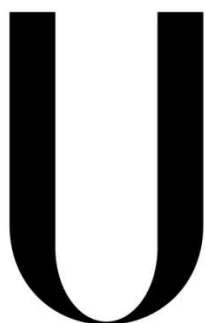
Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Estudo comparativo da ação microbiana do
Hipoclorito de Sódio recorrendo a Terapia
Fotodinâmica contra *Enterococcus faecalis***

Maria João Coelho Valadas

Dissertação orientada pelo Professor Doutor António Ginjeira

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2015

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui os meus agradecimentos a todos aqueles que colaboraram comigo e, direta ou indiretamente, me ajudaram a cumprir os objetivos a que me propus e, deste modo, a realizar mais esta etapa da minha formação académica.

Ao Professor Doutor António Ginjeira, pela disponibilidade, paciência e atenção que sempre me dispensou. Agradeço também a sua particular amabilidade pela disponibilização do material necessário à realização deste protocolo experimental.

Ao Doutor Luís Tavares, Professor Catedrático de Imunologia e Microbiologia, Presidente do Conselho Diretivo da FMVUL, pelas instalações e prontidão em colaborar na execução do protocolo experimental deste trabalho.

À Carla Carneiro pela dedicação e constante disponibilidade, particularmente no que concerne a todas as logísticas necessárias ao trabalho e pela paciência demonstrada sempre que novas questões se colocavam.

Aos meus pais, por tudo o que me têm proporcionado e pelo apoio incondicional que ao longo dos anos me têm dado, sobretudo durante o meu percurso académico, apesar das adversidades que fui encontrando pelo caminho.

Aos meus irmãos por estarem sempre presentes.

À minha querida madrinha que sempre me tem apoiado na realização de trabalhos.

Às minhas amigas de curso, em especial à Beatriz e à Inês, pelo companheirismo, amizade e entajuda.

Às minhas amigas de infância, pela sua constante presença, paciência, carinho e apoio que permitiram ultrapassar os momentos mais difíceis e pela força com que sempre me encorajam a nunca desanimar.

E por fim, aos meus colegas de mestrado, por todos os momentos partilhados durante estes anos.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Introdução: Os irrigantes convencionais, como o Hipoclorito de Sódio, não são totalmente eficazes na eliminação bacteriana. O insucesso do tratamento endodôntico deve-se à presença de bactérias no interior do canal. Atualmente, têm surgido novos métodos para melhorar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico, a Terapia Fotodinâmica tem sido estudado como coadjuvante ao tratamento convencional na eliminação dos microrganismos.

Objetivo: Verificar a capacidade bactericida da Terapia Fotodinâmica como coadjuvante do tratamento endodôntico quando comparado com tratamento endodôntico convencional com soluções de Hipoclorito de Sódio a 5% e a 2,5%.

Materiais e métodos: Preparação de 56 dentes monorradiculares: 30 dentes de estudo e 12 dentes controlo. Inoculação com a estripe de *Enterococcus faecalis* de referência (ATCC 29212). Realizaram-se quatro protocolos de desinfeção testando a eliminação de *E. faecalis*. No Grupo 1, avaliou-se a capacidade de desinfeção do Hipoclorito de Sódio a 5%. No Grupo 2, avaliou-se a capacidade de desinfeção do Hipoclorito de sódio a 2,5%. No Grupo 3, avaliou-se a capacidade de desinfeção do Hipoclorito de Sódio a 5% complementado com a Terapia Fotodinâmica. No Grupo 4, avaliou-se a capacidade de desinfeção do Hipoclorito de Sódio a 2,5% complementado com a Terapia Fotodinâmica. A eliminação de *E. faecalis* foi verificada através de métodos de cultura bacteriológica.

Resultados: Todos os grupos apresentaram efeito antibacteriano. No entanto, nenhum erradicou por completo a *E. faecalis*. O grupo 1 e o grupo 3 apresentaram os resultados mais eficazes. O grupo 2 apresentou os valores mais baixos de atividade bactericida.

Conclusão: A Terapia Fotodinâmica mostrou ser um bom complemento de soluções de Hipoclorito de Sódio em baixas concentrações. Porém, a Terapia Fotodinâmica como complemento do Hipoclorito de Sódio a 5% não apresentou melhoria. O Hipoclorito de Sódio na concentração de 5% continua a ser o método mais eficaz na eliminação de *E. faecalis*.

PALAVRAS-CHAVE: *Enterococcus faecalis*, Hipoclorito de Sódio, FotoSan 630, Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

Introduction: The conventional irrigants, as Sodium Hypochlorite, are not totally effective in eliminating the bacteria. The unsuccessful result in endodontic treatment is due to the presence of bacteria inside the root canal. Nowadays, there are new methods to improve the success rate of endodontic treatments, the Photodynamic Therapy has been studied as a valid adjuvant to the conventional treatment on the microorganisms elimination.

Objective: Verify the effectiveness of the Photodynamic Therapy as adjuvant to the endodontic treatment when compared to the conventional endodontic treatment with solutions of Sodium Hypochlorite 5% and 2,5%.

Materials and Methods: Preparation of 56 monoradicular teeth: 30 study teeth and 12 control teeth. Inoculation with *Enterococcus faecalis* reference (ATCC 29212). Four disinfection protocols were design testing the elimination of *E. faecalis*. In Group 1, it was evaluated the antibacterial efficacy of Sodium Hypochlorite 5%. In Group 2, it was evaluated the antibacterial efficacy of Sodium Hypochlorite 2,5%. In Group 3, it was evaluated the antibacterial efficacy of Sodium Hypochlorite 5% complemented with the Photodynamic Therapy. In Group 4, it was evaluated the antibacterial efficacy of Sodium Hypochlorite 2,5% complemented with the Photodynamic Therapy. The elimination of *E. faecalis* was verified through bacterial growth methods.

Results: All the groups had antimicrobial effect. However, none completely eradicated *E. faecalis*. The group 1 and group 3 had more effective results. The group 2 had the lower antibacterial activity values.

Conclusion: The Photodynamic Therapy showed to be a good complement with low Sodium Hypochlorite concentrations. Yet, the Photodynamic Therapy as a Sodium Hypochlorite 5% complement did not show any improvements. The Sodium Hypochlorite at a concentration of 5% still is the most effective method in the elimination of *E. faecalis*.

KEYWORDS: *Enterococcus faecalis*, Sodium Hypochlorite, FotoSan 630, Photodynamic Therapy.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	10
3. HIPÓTESES DE TRABALHO	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO	22
7. CONCLUSÃO.....	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO I– Introdução.....	I
ANEXO II – Metodologias.....	II
ANEXO III – Análise Estatística com o Teste Qui-Quadrado.....	V
ANEXO IV – Meios de crescimento de <i>Enterococcus faecalis</i>	VII

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Grupos Teste.....	13
Tabela 2: Grupos Controlo	13
Tabela 3: Resultados numéricos da desinfeção experimental por Amostra do Grupo 1.	18
Tabela 4: Resultados numéricos da desinfeção experimental por Amostra do Grupo 2.	18
Tabela 5: Resultados numéricos da desinfeção experimental por Amostra do Grupo 3.	19
Tabela 6: Resultados numéricos da desinfeção experimental por Amostra do Grupo 4.	19
Tabela III-1: Análise Estatística das amostras do Grupo 1	V
Tabela III-2: Análise Estatística das Amostras do Grupo 2	V
Tabela III-3: Análise Estatística das Amostras do Grupo 3	V
Tabela III-4: Análise Estatística das Amostras do Grupo 4	VI
Tabela III-5: Análise Estatística do Crescimento da Amostra de Cones dos Diferentes Grupos	VI
Tabela III-6: Análise Estatística do Crescimento das Amostras de Dentes dos Diferentes Grupos	VI
Tabela III-7: Protocolo para a realização dos meios de crescimento de <i>E.faecalis</i> utilizados no estudo.	VII

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comparação entre grupos da amostra de cones com crescimento e sem crescimento às 72h de incubação.	19
Gráfico 2: Comparação entre grupos da amostra de dentes com crescimento e sem crescimento às 72h de incubação.	20
Gráfico 3: Comparação entre grupos da amostra de cones com crescimento às 24, 48 e 72h incubação.	20
Gráfico 4: Comparação entre grupos da amostra de dentes com crescimento às 24, 48 e 72h de incubação.	21
Gráfico II-1: Gráfico de regressão da curva de calibração.	II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1: Reações do NaOCl (Estrela <i>et al.</i> , 2000).....	I
Figura I-2: Mecanismos fotoquímicos da PDT (Kharkwal <i>et al.</i> , 2011).....	I
Figura II-1: Contagem de Unidades Formadoras de Colónia.....	II
Figura II-2: Uniformização da amostra de dentes a 15mm	II
Figura II-3: Câmara de fluxo laminar.....	II
Figura II-4: Aspeto dos tubos após procedimento de desinfeção de um grupo.....	III
Figura II-5: Aspeto dos tubos após 72h: sem turvação e com turvação	III
Figura II-6: Distribuição do conteúdo dos tubos com crescimento em meio de Slanetz & Bartley (SB).....	III
Figura II-7: Aspeto dos tubos do grupo controlo após 72h de incubação	III
Figura II-8: Aspeto de cultura de <i>E.faecalis</i> em meio Slanetz & Bartley (SB) após 48h de incubação	IV

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

NaOCl – Hipoclorito de Sódio

EDTA – Ácido Etilenodiaminotretacético

PDT – *Photodynamic Therapy* (Terapia Fotodinâmica)

TBO – Azul Toluidina O

LED – Light-emitting diode

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigênio)

BHIb - Brain Heart Infusion Broth

COS - Agar columbia + 5 % sangue de Carneiro

SB - Slanetz & Bartley Agar

TSA - Triptona Soya Agar

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo que as bactérias são reconhecidas como principal fator etiológico no desenvolvimento de lesões pulpares e periapicais. (Kakebashi *et al.*, 1965; Kandaswamy and Venkateshbabu, 2010) Os microrganismos, remanescentes após tratamento ou que recolonizam o espaço do canal dentário, são a principal causa no insucesso do tratamento endodôntico e conseqüentemente de patologias pulpares e periapicais persistentes. (Arneiro *et al.*, 2014; Mohammadi, 2008; Zehnder 2006)

Por essa razão, o principal objetivo no tratamento endodôntico é eliminar a infecção bacteriana e a inflamação associada ao tecido pulpar bem como a remoção mecânica do tecido danificado do interior do canal dentário. (Garcez *et al.*, 2007)

Porém, a eliminação dos microrganismos do canal infetado é uma tarefa difícil devido a uma complexa anatomia do sistema canalar com ramificações apicais, canais acessórios e anastomoses. (Mohammadi, 2008; Xu *et al.*, 2009) Momentos antes da obturação, após a preparação químico-mecânica, bactérias residuais são detetadas em aproximadamente metade dos dentes. (Xu *et al.*, 2009)

Citado por Ng *et al.* (2011), Ng *et al.* (2010) efetuou uma revisão sistemática, que inclui estudos publicados entre 1993 e 2007, na qual refere a que a taxa de sobrevivência de dentes após 2 a 10 anos do tratamento endodôntico está entre 86% e 93%.

O tecido orgânico pulpar remanescente e o exsudado proveniente do periodonto são fontes nutricionais utilizadas para garantir a sobrevivência das comunidades microbianas. Conseqüentemente, nichos de microrganismos em dentes necrosados ou com tratamento endodôntico, acumulam-se na região apical do canal, onde têm acesso a fluido tecidual. Em infecções prolongadas, as bactérias do canal radicular invadem a dentina adjacente através dos túbulos dentinários. (Zehnder, 2006)

A persistência das infecções depende da capacidade dos microrganismos se adaptarem a mudanças ambientais. Os principais mecanismos utilizados pelas bactérias são: a formação de um biofilme, modificações fisiológicas, alterar o seu material genético e criar subpopulações de células. (Oliveira *et al.*, 2014)

Uma das maiores dificuldades em eliminar o crescimento bacteriano no sistema canalar é o facto de as bactérias crescerem em biofilme. (Garcez *et al.*, 2007)

O biofilme é uma fina camada que se desenvolve quando as bactérias aderem a superfícies sólidas, como a dentina, e contem polissacarídeos extracelulares e outros materiais orgânicos, atuando como cola aglutinando as células. Os biofilmes bacterianos são difíceis de erradicar e mostram grande resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos. (Garcez *et al.*, 2007)

O sucesso depende de vários fatores: a anatomia do sistema canalar complexa e diversificada que compreende canais adicionais ao canal principal e não permitem acesso direto devido à sua posição e ao seu diâmetro; uma microflora polimorfa com resistência ou suscetibilidade antimicrobiana, incluindo bactérias anaeróbias, anaeróbias facultativas e aeróbias. (Garcez *et al.*, 2007)

Para reduzir o número de microrganismos do sistema canalar diferentes abordagens têm sido sugeridas, incluindo o uso de várias técnicas de instrumentação mecânica com limas que desbridam e dão forma ao canal, protocolos de irrigação por agentes desinfetantes e colocação de medicamentos intracanalares antimicrobianos entre consultas. (Garcez *et al.*, 2007; Mohammadi, 2008; Rahimi *et al.*, 2014)

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis é um organismo persistente que, apesar de ser uma pequena porção na flora de canais com infecção primária, desempenha um papel importante na etiologia de lesões perirradiculares persistentes. É frequentemente encontrada em casos de insucesso e pode sobreviver no canal radicular como microrganismo isolado ou como componente maioritário da flora. (Stuart *et al.*, 2006)

E. faecalis morfologicamente é um cocos, gram positivo e anaeróbio facultativo o que possibilita o seu crescimento na presença ou na ausência de oxigénio. (Arneiro *et al.*, 2014; Stuart *et al.*, 2006)

Estas bactérias têm a capacidade de sobreviver a ambientes extremos incluindo pH alcalino de 9,6 e altas concentrações de sais. Resistem a sais biliares, detergentes, metais pesados, etanol, e desidratação. Conseguem crescer em temperaturas entre 10 a 45° C e sobreviver a temperaturas de 60° C por 30 minutos. (Stuart *et al.*, 2006)

A persistência desta bactéria deve-se a fatores de virulência e sobrevivência: tolera períodos prolongados de privação nutricional; adere à dentina e penetra nos túbulos dentinários; altera respostas das células hospedeiras; suprime a ação dos linfócitos; possui enzimas líticas, citolisina, substrato de agregação, feromonas e ácido lipoteíco; utiliza o fluído crevicular como fonte nutricional; resiste a medicamentos intracanalares (Ca(OH)₂); compete com outras células bacterianas; forma biofilme. (Stuart *et al.*, 2006)

Têm surgido relatos da resistência da *E. faecalis* a antibióticos de modo que já não são esperados resultados ótimos no tratamento de infecções causadas pela mesma. (Arneiro *et al.*, 2014; Stuart *et al.*, 2006)

A bactéria *E. faecalis* não está presente na cavidade oral em situações habituais, no entanto, está associada a lesões perirradiculares devidas a infecções endodônticas primárias ou persistentes. A presença da *E. faecalis* é superior após falha no tratamento endodôntico comparativamente com infecções primárias. Estudos demonstraram que a prevalência deste microrganismo em dentes obturados com lesão perirradicular está entre os 24% a 77%. (Stuart *et al.*, 2006)

Diversos estudos são direcionados para obter uma eliminação eficaz da *E. faecalis* do sistema canal durante o tratamento endodôntico. O hipoclorito de sódio é considerado principal método de erradicação de todas as suas formas de apresentação. (Stuart *et al.*, 2006)

Irrigação

Vários estudos relatam que a preparação mecânica isoladamente é insuficiente para desinfecção de canais acessórios, anastomoses e ramificações. (Gernhardt *et al.*, 2004; Mohammadi, 2008; Rahimi *et al.*, 2014) Tecido pulpar residual, bactérias e resíduos dentinários podem persistir nas irregularidades dos canais. (Gernhardt *et al.*, 2004) Assim, surgiu a necessidade de uma desinfecção que não só eliminasse os microrganismos como também o tecido pulpar remanescente. (Mohammadi, 2008)

Idealmente os irrigantes endodônticos devem: ter um amplo espectro antimicrobiano e ter uma elevada eficácia contra microrganismos anaeróbios e facultativos organizados em biofilmes; dissolver tecido pulpar necrótico remanescente;

inativar endotoxinas; prevenir a formação de smear layer durante a instrumentação ou dissolvê-la uma vez que se tenha formado. Visto entrarem em contato com tecidos vitais, os irrigantes não devem ser tóxicos, nem cáusticos para os tecidos periodontais e ter reduzido potencial para causar uma reação anafilática. (Kandaswamy and Venkateshbabu, 2010; Zehnder, 2006)

Hipoclorito de Sódio

A utilização do hipoclorito de sódio (NaOCl) como solução desinfetante surgiu durante a 1ª Guerra Mundial. Desde 1919, a sua utilização é sugerida como principal irrigante na endodontia uma vez que abrange o maior número de requisitos de um irrigante ideal. (Mohammadi, 2008; Zehnder, 2006)

O NaOCl exibe um equilíbrio dinâmico observado na seguinte reação: (Estrela et al., 2002)



O NaOCl combinado com a água produz hidróxido de sódio e ácido hipocloroso. (Estrela et al., 2002)

Na presença de microrganismos e tecido orgânico ocorrem diversas reações (Anexo I, Figura I-1): reação de saponificação, neutralização de aminoácidos e reação de cloramina, que conduzem ao efeito antimicrobiano e ao processo de dissolução de tecidos. (Estrela et al., 2002)

O NaOCl atua como um solvente orgânico e de gordura, degradando ácidos gordos e transformando-os em sais de ácidos gordos e glicerol e, conseqüentemente, conduz à redução da tensão de superfície da solução. (Reação de saponificação) (Estrela et al., 2002)

O NaOCl neutraliza aminoácidos levando a formação de água e sais pela libertação de iões hidroxilo e assim, à redução do pH. (Reação de neutralização de aminoácidos) (Estrela et al., 2002)

Quando o ácido hipocloroso, uma substância presente na solução de NaOCl, entra em contato com o tecido orgânico, atua como solvente e liberta cloro, que se vai combinar com uma proteína do grupo amina para formar cloramina. (Reação de

Cloraminação) O ácido hipocloroso (HOCl-) e os iões hipoclorito (OCl-) levam à degradação de aminoácidos e hidrólise. As cloraminas resultantes interferem com o metabolismo celular. A cloramina é um forte oxidante e tem ação antimicrobiana, inibe enzimas bacterianas e leva a oxidação irreversível do grupo sulfidrílico, essencial nas enzimas bacterianas (Estrela *et al.*, 2002)

O NaOCl é uma base forte (pH>11). O pH elevado (ação dos iões hidroxilo) do NaOCl interfere com a integridade da membrana citoplasmática com uma inibição enzimática irreversível, alterações do metabolismo celular e degradação dos fosfolípidos observada numa peroxidação lipídica (Estrela *et al.*, 2002)

Assim, o mecanismo antimicrobiano das soluções de NaOCl é conseguido pelas características físico-químicas e pela reação com o tecido orgânico. (Estrela *et al.*, 2002)

O NaOCl tem como características principais um amplo espectro de ação antimicrobiana, ação não específica em todos os micróbios, capacidade esporicida, virucida e fungicida, ação proteolítica, efeitos dissolventes dos tecidos necróticos e vitais e componentes orgânicos da smear layer. Além disso, as soluções aquosas de NaOCl são baratas, facilmente disponíveis e têm um tempo de semi-vida razoável, podendo deteriorar-se com o tempo, a exposição à luz, com a temperatura e pela contaminação de iões metálicos. (Clarkson and Moule, 1998; Mohammadi, 2008; Rahimi *et al.*, 2014; Zehnder, 2006)

Por outro lado, o NaOCl apresenta algumas desvantagens como a sua toxicidade, ser extremamente corrosivo para os metais, ser uma base forte, hipertónico e ter um gosto desagradável. (Clarkson and Moule, 1998)

Em Endodontia, o NaOCl mostra um amplo espectro de atividade antimicrobiana contra microrganismos organizados em biofilmes e dispostos em túbulos dentinários de espécies difíceis de erradicar como *Enterococcus*, *Actinomyces* e *Candida*. (Rahimi *et al.*, 2014)

O NaOCl é comercializado em diversas concentrações (desde 1% a 6% (Clarkson and Moule, 1998) e tem sido controverso qual deve ser utilizada em Endodontia. O efeito antibacteriano e a capacidade de dissolução depende da concentração, porém, também a sua toxicidade é diretamente proporcional. (Zehnder, 2006)

A irrigação mais eficaz é relatada pelo NaOCl a 5,25% durante 40 min. Irrigação com hipoclorito entre 1,3% a 2,5% mostrou-se ineficaz em remover *E. faecalis* dos túbulos dentinários infetados. (Kandaswamy and Venkateshbabu, 2010)

Por outro lado, uma solução de NaOCl a 5,25% diminui significativamente o módulo de elasticidade e a resistência à flexibilidade da dentina humana, consequência da ação proteolítica na matriz de colagénio dentinária. (Kandaswamy and Venkateshbabu, 2010; Zehnder, 2006)

A redução da adesão observada entre sistemas adesivos e parede de dentina para restaurações definitivas pode ser também associada à remoção de fibrilhas de colagénio da superfície dentinária pelo NaOCl, impedindo a formação de uma correta camada híbrida durante a adesão. (Kandaswamy and Venkateshbabu, 2010)

Uma grande parte dos dentistas utiliza uma concentração de 5,25%, no entanto, têm surgido variados casos de irritações nos tecidos adjacentes ao canal radicular associados ao uso destas concentrações. (Rahimi *et al.*, 2014; Zehnder, 2006)

Vários investigadores mostraram que o NaOCl pode irritar os tecidos periapicais e periodontais. Em altas concentrações pode levar a alterações necróticas severas. (Gernhardt *et al.*, 2004) Assim, é sugerida a utilização do NaOCl com a devida precaução de modo a evitar a sua extrusão para o exterior do canal. (Gernhardt *et al.*, 2004)

Com o objetivo de aumentar a eficácia das soluções de NaOCl mais diluídas e prevenir a sua toxicidade são usadas varias técnicas: baixar o ph, aumentar a temperatura, bem como agitar o irrigante ou ativá-lo de outra maneira. Assim surgiram novas técnicas como o uso de lasers e aparelhos sónicos e ultrassónicos (Rahimi *et al.*, 2014).

Ativadores

Recentemente foram sugeridas novas abordagens na desinfeção canalar que incluem o uso de lasers. (Garcez *et al.*, 2007). Entre essas novas tecnológicas, surge a terapia fotodinâmica (PDT) também conhecida como desinfeção fotoativada (PAD, *photoactivated disinfection*) ou fotoquimioterapia. (Oliveira *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2009)

A PDT é uma estratégia antimicrobiana que envolve a combinação de um fotossensibilizador, não tóxico, numa localização exata, e uma fonte de luz visível de comprimento de onda apropriado. (Oliveira *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2009) O fotossensibilizador é excitado e reage com o oxigénio molecular para produzir espécies de oxigénio altamente reativo que induzem a lesão e morte dos microrganismos. A elevada carga positiva do fotossensibilizador contribui para uma rápida ligação e penetração nas células bacterianas. De modo que, os seus componentes mostram uma grande seletividade para a morte dos microrganismos quando comparado com as células do hospedeiro. (Garcez *et al.*, 2007)

A PDT foi descoberta na área da microbiologia há mais de 100 anos e tem sido utilizada principalmente no tratamento do Cancro e na Oftalmologia. No entanto, o seu desenvolvimento tem sido muito lento. Com a descoberta sobre a resistência aos antibióticos tem-se gerado um grande interesse como método alternativo a terapias antibióticas. A PDT representa um tratamento alternativo a patógenos resistentes a medicamentos e tem regressado como uma possível abordagem no tratamento de infeções resistentes a medicamentos. As bactérias resistentes são eficazmente eliminadas com a PDT e até a data não há relatos de resistência adquirida a PDT. (Kharkwal *et al.*, 2011)

O mecanismo de ação da PDT ocorre quando o fotossensibilizador, absorve os fótons da fonte luminosa e os seus eletrões transitam para um estado excitado. Na presença do oxigénio, o fotossensibilizador retorna ao seu estado fundamental e transfere a energia para o substrato, formando radicais livres de elevada citotoxicidade como o oxigénio reativo e superóxidos. (Oliveira *et al.*, 2014)

Estas espécies altamente reativas podem danificar seriamente os microrganismos através da oxidação irreversível dos componentes celulares, causando danos na membrana celular, mitocôndrias, núcleo e outros componentes celulares. (Oliveira *et al.*, 2014)

Existem dois mecanismos para explicar como o fotossensibilizador reage com as biomoléculas conduzindo à citotoxicidade. (Anexo I, figura I-2) A molécula de fotossensibilizador ao absorver a luz passa do estado fundamental para o seu estado excitado (estado singlete). De seguida, a molécula pode perder a mesma energia por fluorescência e voltar ao estado fundamental ou, após um cruzamento de intersistemas,

passar a estado triplete de longa duração. (Kharkwal *et al.*, 2011) A reação tipo I envolve a transferência de elétrons das moléculas do fotossensibilizador para o substrato, levando à produção de radicais livres que reagem rapidamente com o oxigênio resultando na produção de superóxido, radicais hidroxilo, e peróxido de hidrogênio. Na reação tipo II, o fotossensibilizador excitado transfere energia ao oxigênio levando a produção de espécies de oxigênio altamente reativas como o Oxigênio singleto. (Kharkwal *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2014)

Na PDT é difícil distinguir entre estes dois mecanismos de reação. A reação do tipo II é a aceita como a principal via de destruição microbiana. (Oliveira *et al.*, 2014)

Existem vários fotossensibilizadores associados ao laser mas a sua aplicação depende da capacidade de absorção de determinado comprimento de onda e intensidade de luz.

A maioria dos fotossensibilizadores são ativados por uma luz vermelha entre os 630 aos 700 nm, o correspondente a uma luz penetrante dos 0,5 cm aos 1,5 cm. (Rajesh *et al.*, 2011)

Os fotossensibilizadores usados na terapia fotodinâmica pertencem a diferentes grupos. Na terapia fotodinâmica, os fotossensibilizadores usados são azul toluidina O e azul de metileno, ambos com características químicas e físico-químicas semelhantes. (Oliveira *et al.*, 2014; Rajesh *et al.*, 2011)

Atualmente, as fontes de luz aplicadas na terapia fotodinâmica são: lasers Helio-neon (630nm), lasers díodo galio-alumínio-arsênio (630-690, 830, 906 nm) e laser Argon (488-514 nm). Os comprimentos de onda variam desde a luz azul dos lasers argon ou luz vermelha dos lasers Helio-neon, aos infravermelhos dos lasers Díodo. (Rajesh *et al.*, 2011)

Lasers de baixa potência, como o Helio-neon e o díodo são as fontes de radiação mais utilizadas na PDT para a redução de culturas de bactérias e fungos na cavidade oral. (Rajesh *et al.*, 2011) Os lasers Helio-Neon mostram resultados positivos na redução de várias culturas usando o azul toluidina e o azul-de-metileno. No entanto, os lasers díodo têm sido mais utilizados por serem mais compactos e facilmente manuseados, mais econômicos, versáteis e bem absorvidos pelos tecidos do organismo. (Oliveira *et al.*, 2014)

Recentemente, fontes de luz não laser como LEDs têm sido aplicadas com sucesso como fonte de energia alternativa por serem mais compactos, portáteis e económicos. (Oliveira *et al.*, 2014; Rajesh *et al.*, 2011)

A PDT tem sido estudada como uma técnica promissora na eliminação das bactérias patogénicas da cavidade oral que causam patologias endodónticas, periodontites, peri-implantites e caries. (Garcez *et al.*, 2007)

Esta técnica está a avançar rapidamente e vários estudos mostraram que as bactérias orais são-lhe suscetíveis, sugerindo a PDT como um bom coadjuvante nas técnicas de desinfeção em endodontia. (Arneiro *et al.*, 2014)

Acredita-se que a PDT não substitui os antimicrobianos mas complementa o tratamento de infeções orais, acelerando e diminuindo o custo do tratamento. (Rajesh *et al.*, 2011)

Quando o componente fotossensibilizador é aplicado no sistema canalicular ele adere à bactéria residual do canal principal, dos canais acessórios, dos istmos e dos túbulos dentinários. (Xu *et al.*, 2009) Quando ativado, o agente fotoativado tem um amplo espectro de ação inativando todas as classes de microrganismos: Gram positivo, Gram negativo, fungos, vírus, parasitas e ainda formas de vida altamente resistentes como os esporos bacterianos. (Kharkwal *et al.*, 2011)

A PDT apresenta atributos que fazem desta, uma boa técnica para redução bacteriana intracanalicular: é biologicamente estável, segura para os tecidos humanos, tem a capacidade de eliminar microrganismos em biofilmes, é fácil de aplicar, não provoca dor, e é económica quando comparada com laser de alta potência. (Oliveira *et al.*, 2014)

2. OBJETIVOS

- Observar se o uso de uma solução de NaOCl a 5% combinado com terapia fotodinâmica tem uma capacidade bactericida superior à irrigação convencional apenas com NaOCl a 5%.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

- Observar se o uso de uma solução de NaOCl a 2,5% combinado com terapia fotodinâmica tem uma capacidade bactericida semelhante ao uso de uma solução de NaOCl a 5% combinado com a terapia fotodinâmica.
- Observar se o uso de uma solução de NaOCl a 2,5% combinado com terapia fotodinâmica tem uma capacidade bactericida semelhante ao uso de a irrigação convencional apenas com NaOCl a 5%.
- Observar se o uso de irrigação convencional com uma solução de NaOCl a 2,5% tem uma capacidade bactericida semelhante ao uso de uma irrigação convencional com NaOCl a 5%.

3. HIPÓTESES DE TRABALHO

- Hipótese alternativa (H1): O NaOCL a 5% numa irrigação combinada com terapia fotodinâmica, no interior de canais infetados com *Enterococcus faecalis*, tem uma eficácia bactericida superior a uma irrigação convencional.
- Hipótese nula (H0): O NaOCL a 5% numa irrigação combinada com terapia fotodinâmica, no interior de canais infetados com *Enterococcus faecalis*, tem uma eficácia bactericida igual ou inferior à irrigação convencional e não ativada, com seringa e agulha com a respetiva solução.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação da amostra de dentes

Para a realização deste estudo, procedeu-se à recolha de 81 dentes unirradiculares com os seguintes parâmetros: apenas um canal, sem grandes curvaturas e conservados em água corrente.

Para limpar a superfície externa dos dentes recorreu-se ao uso de ultrassons.

De seguida, procedeu-se à uniformização da amostra a um comprimento de 15mm abaixo da junção amelocementaria. Todos os dentes foram cortados com um disco de tungsténio colocado em peça de mão.

Antecedendo a instrumentação, o comprimento dos canais foi estabelecido. Em cada dente, introduzindo-se uma lima k #10 até esta sair pelo forâmen apical e recuou-se um milímetro a esta medição. A via de permeabilidade foi criada com limas k #10 e #15.

Posteriormente, os canais foram instrumentados com um sistema de instrumentação mecanizada. Foi utilizado o sistema de instrumentação Protaper Universal seguindo a sequência recomendada pelo fabricante (S1, Sx, S1, S2, F1, F2, F3). Entre cada lima, irrigou-se com hipoclorito de sódio 2,5% com seringas de 5ml e para finalizar utilizou-se EDTA para remover a smear layer e expor os túbulos dentinários.

A superfície externa dos dentes foi pintada com verniz de diferentes cores consoante o grupo onde se inseria.

Os dentes foram então colocados em mangas e esterilizados em autoclave a 134°C durante 50 minutos.

Ao longo do protocolo, foram excluídos 25 dentes da amostra inicial por não cumprirem requisitos necessários para a realização do mesmo: dentes cuja junção amelocementaria se encontrava a menos de 15 mm do ápex e dentes onde não se conseguiu obter uma via de permeabilidade, ficando uma amostra de 56 dentes.

Constituição dos grupos teste e dos grupos controlo

Os 56 dentes foram divididos por quatro grupos teste (n=40) e por quatro grupos controlo por cada grupo teste (n=16). Cada grupo era constituído por 10 dentes e cada grupo controlo por 4 dentes.

Cada grupo teste testava um método de desinfeção diferente: no grupo 1 (n=10) testou-se a capacidade de desinfeção do hipoclorito de sódio a 5%; no grupo 2 (n=10) testou-se a capacidade de desinfeção do hipoclorito de sódio a 2,5%; no grupo 3 (n=10) testou-se a capacidade de desinfeção do hipoclorito de sódio a 5% coadjuvado com a PDT; no grupo 4 (n=10) testou-se a capacidade de desinfeção do hipoclorito de sódio a 2,5% coadjuvado com a PDT.

De modo a verificarmos as condições do ensaio por cada grupo teste, realizou-se um grupo controlo, cada um constituído por 4 dentes: três inoculados com a estirpe referência e um com meio de cultura estéril (Brain Heart Infusion broth (Scharlau)). O controlo 1 (n=1) colocou em teste as condições de incubação, ou seja, se a estirpe inoculada se mantinha viável ao longo das 48 h de incubação; o controlo 2 (n=1) testou se o tiosulfato de sódio não tinha acção letal sobre a estirpe controlo; no controlo 3 (n=1) testou-se a capacidade inibitória do tiosulfato de sódio sobre o hipoclorito de sódio; no controlo 4 (n=1) testou-se se a esterilidade do meio de inoculação (BHib) e as condições de manipulação.

Tabela 1: Grupos Teste

Grupos Teste	
Grupo 1	Hipoclorito de sódio 5%
Grupo 2	Hipoclorito de sódio 2,5%
Grupo 3	Hipoclorito de sódio 5% e PDT
Grupo 4	Hipoclorito de sódio 2,5% e PDT

Tabela 2: Grupos Controlo

Grupo controlo	
Controlo 1	Inoculado
Controlo 2	Inoculado irrigou-se com Tiosulfato de sódio
Controlo 3	Inoculado irrigou-se com mistura de Tiosulfato de sódio e Hipoclorito de sódio
Controlo 4	Meio estéril

Preparação da estirpe referência

Para a realização dos ensaios de infecção utilizou-se como microrganismo infectante a estirpe referência de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

A estirpe de *E. faecalis* em estudo foi inoculada em agar columbia suplementado com 5 % de sangue de carneiro (COS) (bioMérieux), sendo posteriormente incubada a 37° C durante 24 h (1ª passagem). Após período de incubação e confirmação da pureza da cultura através de coloração de Gram, isolou-se uma colónia para nova placa de COS e incubou-se durante 24 h a 37° C (2ª passagem).

Para os protocolos de infecção, só se utilizaram culturas de *E. faecalis* com duas passagens prévias em meio de cultura sólido (COS).

Curva de calibração

A determinação do número de ufc/ml numa amostra de turbidez desconhecida, pode ser calculado através da elaboração de uma curva de calibração. Esta curva foi construída através da relação densidade óptica (600 nm) *versus* número de ufc/ml calculado após diluição de uma suspensão inicial.

A partir de uma cultura de *E. faecalis* com 24 h de crescimento, procedeu-se à preparação de uma suspensão de turbidez desconhecida em 9 ml de soro fisiológico a 0,9 %. Seguidamente, transferiu-se 1 ml de soro fisiológico estéril (branco) e 1 ml da suspensão inicial para duas cuvets de espectrofotometria de forma a proceder à leitura da densidade óptica (d.o. = 600 nm) utilizando o aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Posteriormente, procedeu-se à elaboração de diluições decimais de base 10 (volume final = 5 ml), até esgotamento do inóculo, de acordo com as leituras de d.o. previamente efetuadas. Inoculou-se 100 µL das diluições (10^{-4} a 10^{-7}) em meio de Triptona Soya Agar (TSA) (Liofilchem), à superfície e em duplicado e incubou-se a 37° C durante 24 h. Finalmente, de forma a registar os valores de d.o. das primeiras três diluições (10^{-1} a 10^{-3}), transferiu-se 1 ml de soro fisiológico estéril (branco) e 1 ml das respectivas diluições para quatro cuvets e procedeu-se à leitura da sua densidade óptica (d.o. = 600 nm). Após período de incubação, efetuou-se a contagem de todas as placas que contivessem entre 15 e 150 unidades formadoras de colónias/ml (ufc/ml). O protocolo foi repetido três vezes em três dias consecutivos.

O cálculo do número de unidades formadoras e presentes em cada um das suspensões iniciais (dia 1, 2 e 3) foi determinado de acordo com a fórmula:

$$\text{ufc/ml} = \text{média de número de colônias} \times \text{inverso da diluição} \times \text{factor diluição}^*$$

*Factor de diluição só é aplicável quando o volume inoculado é diferente de 1 ml.

Inoculação

Preparou-se uma suspensão de *E. faecalis* em 5 ml de soro fisiológico a 0,9%, a partir de uma cultura com 24 h, e transferiu-se 1 ml de soro fisiológico estéril (branco) e 1 ml da suspensão inicial para duas cuvetes de espectrofotometria. Mediu-se a d.o (600 nm) da suspensão inicial e ajustou-se a sua concentração, com BHib, para 2×10^8 ufc/ml. Seguidamente e de forma a criar um ambiente de atmosfera húmida durante o período de incubação, transferiu-se 100 µL de água estéril para microtubos estéreis de 1,5 ml. Em seguida, transferiram-se os dentes teste (n=10) e os dentes controlo (n=4) para os mesmos microtubos. Posteriormente, procedeu-se à inoculação do conduto radicular de cada um dos dentes teste e três dos dentes controlo (1, 2 e 3) com 10 µL da suspensão preparada anteriormente e o controlo 4 com 10 µL de meio de BHib estéril. Incubou-se os microtubos a 37 °C durante 48 h de forma a permitir a formação de um biofilme maduro.

Desinfecção com hipoclorito (Grupo 1 e Grupo 2)

A desinfecção foi feita para o grupo 1 com NaOCl a 5% e para o grupo 2 com NaOCl a 2,5%. Em ambos os grupos, irrigou-se cada um dos dentes teste com 0,2 ml de hipoclorito de sódio e deixou-se atuar por 20 s. O procedimento foi repetido por mais duas vezes.

Posteriormente, irrigou-se cada um dos dentes com 1 ml de tiosulfato de sódio a 5% e deixou-se atuar durante 1 minuto de modo a inibir a ação do NaOCl. Introduziram-se dois cones de papel esterilizados, consecutivamente, no conduto radicular e transferiu-se os cones e o dente para dois tubos individuais com 3 ml de meio BHib. Os tubos foram a incubar a 37° C durante 72 h.

Desinfecção com NaOCl e PDT (Grupo 3 e Grupo 4)

A desinfecção do grupo 3 e do grupo 4 foi feita com NaOCl a 5% e com NaOCl a 2,5%, ambos coadjuvados com PDT, respectivamente. Irrigou-se cada um dos dentes teste com 0,2 ml de hipoclorito de sódio e deixou-se actuar por 20 s. Este procedimento foi repetido mais duas vezes.

De seguida, irrigou-se cada um dos dentes com 1 ml de água destilada de forma a remover e/ou diminuir a presença do hipoclorito de sódio. Secou-se o conduto radicular com cones de papel e irrigou-se com fotossensibilizador (Azul de toluidina 0,1mg/ml) (FotoSan Agent low) até preencher todo o conduto canalar. Introduziu-se a ponta (endotip) do aparelho de ativação fotodinâmica (FotoSan 630 (CMSDental)) e ativou-se o corante (30 s, 2 x). Posteriormente, irrigou-se cada um dos dentes com 1 ml de água estéril e de seguida com 1 ml de tiosulfato de sódio e deixou-se atuar por 1 minuto. Introduziu-se dois cones de papel esterilizados, consecutivamente, no conduto radicular e transferiu-se os cones e o dente para dois tubos individuais com 3 ml de BHib. Os tubos foram a incubar a 37° C durante 72 h.

Controlos

Após a desinfecção, realizaram-se os grupos controlo do respetivo grupo teste:

Controlo 1: transferiu-se o dente diretamente para um tubo com 3 ml de BHib;

Controlo 2: irrigou-se o dente do com 1 ml de tiosulfato de sódio a 5 % durante 1 minuto sendo posteriormente transferido para um tubo com 3 ml de BHib;

Controlo 3: misturou-se 1 ml de tiosulfato de sódio a 5% com 0,6 ml hipoclorito de sódio (5 % ou 2,5 %) num microtubo de 1,5 ml e deixou-se actuar durante 1 minuto. Esta solução foi posteriormente utilizada para irrigar o dente durante 1 minuto, findo o qual se transferiu o dente para um tubo com 3 ml de BHib;

Controlo 4: transferiu-se o dente diretamente para um tubo com 3 ml de BHib.

Análise de eficácia da desinfecção experimental

Avaliou-se e registou-se as alterações na turbidez do meio às 24, 48 e 72 h.

No fim das 72 h, inoculou-se o conteúdo de todos os tubos com crescimento em meio selectivo e diferencial (Slanetz & Bartley agar (Liofilchem)) e incubou-se a 37° C

durante 48 h. No fim, confirmou-se a pureza da cultura através da avaliação do crescimento em SB e através de coloração de Gram.

Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS Inc, versão 18, Chicago, USA).

Comparam-se os resultados dos diferentes grupos experimentais pelo cruzamento de variáveis utilizando o teste do qui-quadrado. As diferenças com “p-value” inferiores a 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

5. RESULTADOS

Analisaram-se os resultados obtidos dentro de cada grupo em função da amostra utilizada (cones de papel ou dente). Este método comparativo foi utilizado para os quatro grupos experimentais.

Na tabela 3, podemos observar os resultados do grupo 1 respeitante à desinfecção dos dentes com NaOCl a 5%. Neste grupo pudemos encontrar 9 dentes e 1 cone com crescimento e 1 dente e 9 cones sem crescimento. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre cones e dentes ($p=0,000$) com crescimento, tendo-se calculado valores percentuais de crescimento de 10% para os cones e de 90% para os dentes.

Tabela 3: Resultados numéricos da desinfecção experimental por Amostra do Grupo 1.

Grupo 1	Amostra	Crescimento 24h		Crescimento 48h		Crescimento 72h		Sem crescimento	
NaOCl 5%	dentes	9	90%	9	90%	9	90%	1	10%
	cones	1	10%	1	10%	1	10%	9	90%

Nos resultados do grupo 2 (tabela 4) observamos um aumento do número de cones contaminados após as 48 h de 5 cones para 6 cones. Assim, estes resultados mostram um crescimento positivo em 10 dentes (100%) e em 6 cones (60%), com diferenças estatisticamente significativas ($p=0,025$).

Tabela 4: Resultados numéricos da desinfecção experimental por Amostra do Grupo 2.

Grupo 2	Amostra	Crescimento 24h		Crescimento 48h		Crescimento 72h		Sem crescimento	
NaOCl 2,5%	dentes	10	100%	10	100%	10	100%	0	0%
	cones	5	50%	6	60%	6	60%	4	40%

Na análise dos resultados do grupo 3 (tabela 5), observam-se 8 dentes (80%) e 1 cones (10%) com crescimento desde as 24 h com diferenças estatisticamente significativas ($p=0,002$).

Tabela 5: Resultados numéricos da desinfeção experimental por Amostra do Grupo 3.

Grupo 3	Amostra	Crescimento 24h		Crescimento 48h		Crescimento 72h		Sem crescimento	
NaOCl 5% + PDT	dentes	8	80%	8	80%	8	80%	2	20%
	cones	1	10%	1	10%	1	10%	9	90%

No grupo 4 (tabela 6), observa-se um crescimento em 10 dentes (100%) e em 3 cones (30%) com diferenças estatisticamente significativas ($p=0,001$).

Tabela 6: Resultados numéricos da desinfeção experimental por Amostra do Grupo 4.

Grupo 4	Amostra	Crescimento 24h		Crescimento 48h		Crescimento 72h		Sem crescimento	
NaOCl 2,5% + PDT	dentes	10	100%	10	100%	10	100%	0	0%
	cones	3	30%	3	30%	3	30%	7	70%

Os resultados foram também comparados entre grupos de modo a observarmos as diferenças do crescimento nos cones ou nos dentes de diferentes grupos.

Ao comparar as amostras de cones entre grupos em função do crescimento (gráfico 1) observamos um número de cones com crescimento de igual valor nos grupos 1 e 3 (10%). O grupo 2 e 4 apresentam um crescimento em 6 e 4 cones, respetivamente. Entre os quatro grupos pudemos encontrar diferenças estatisticamente significativas ($p=0,038$).

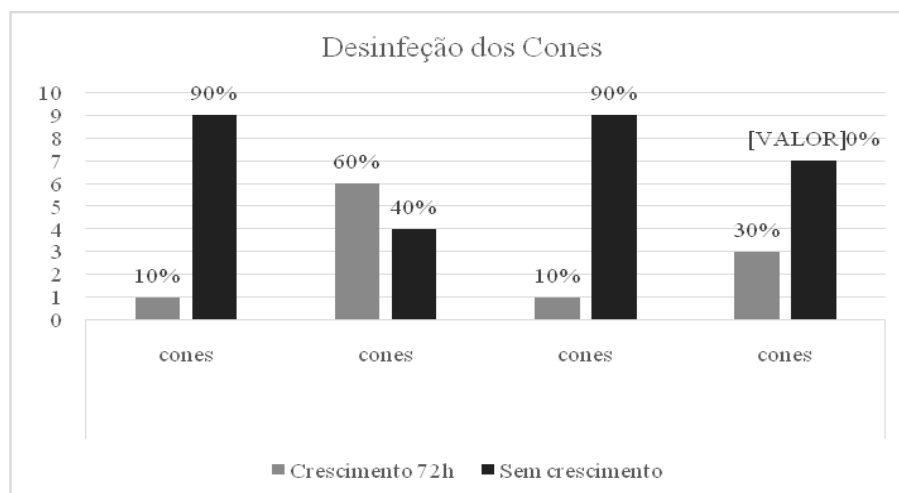


Gráfico 1: Comparação entre grupos da amostra de cones com crescimento e sem crescimento às 72h de incubação.

Quando comparamos as amostras de dentes entre grupos em função do crescimento (Gráfico 2) verificamos um crescimento máximo no total de 10 dentes nos grupos 2 e 4 (100%), um crescimento em 1 dente (10%) no grupo 1 e 2 dentes (20%) no grupo 3, não apresentando, contudo, diferenças significativas ($p=0,265$) entre si.

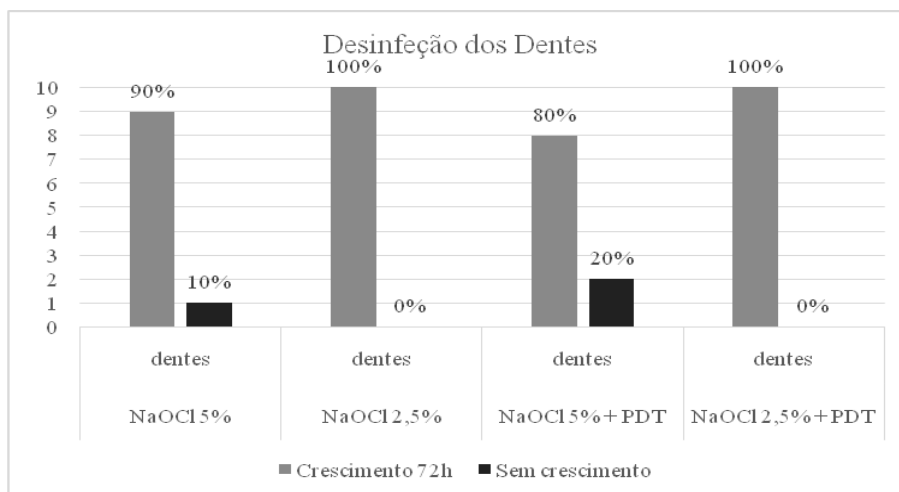


Gráfico 2: Comparação entre grupos da amostra de dentes com crescimento e sem crescimento às 72h de incubação.

Ao comparar o crescimento na amostra de cones ao fim de 24 h, 48 h e 72 h, observa-se que os resultados são iguais independentemente das horas no grupo 1, 3 e 4. No grupo 2, observa-se um aumento de cones com crescimento das 24 h para as 48 h.

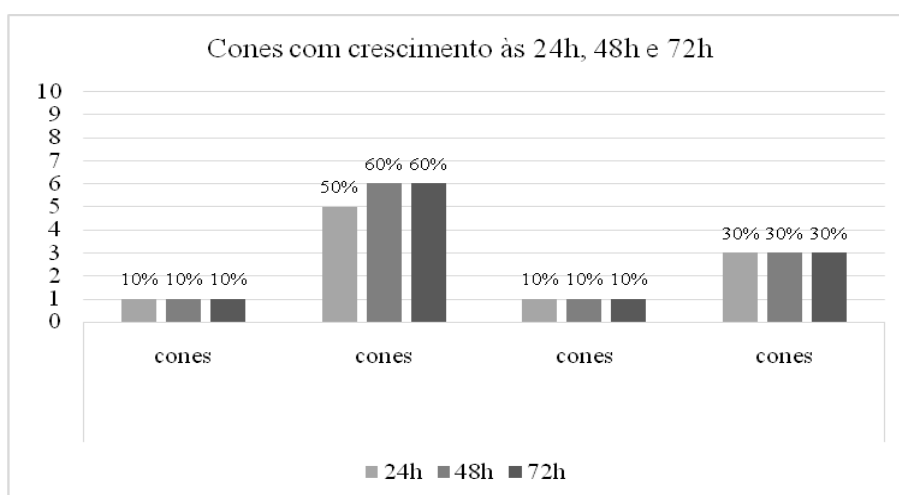


Gráfico 3: Comparação entre grupos da amostra de cones com crescimento às 24, 48 e 72h incubação.

Na amostra de dentes ao fim de 24 h, 48 h e 72 h, observa-se que os resultados não se alteram entre grupos.

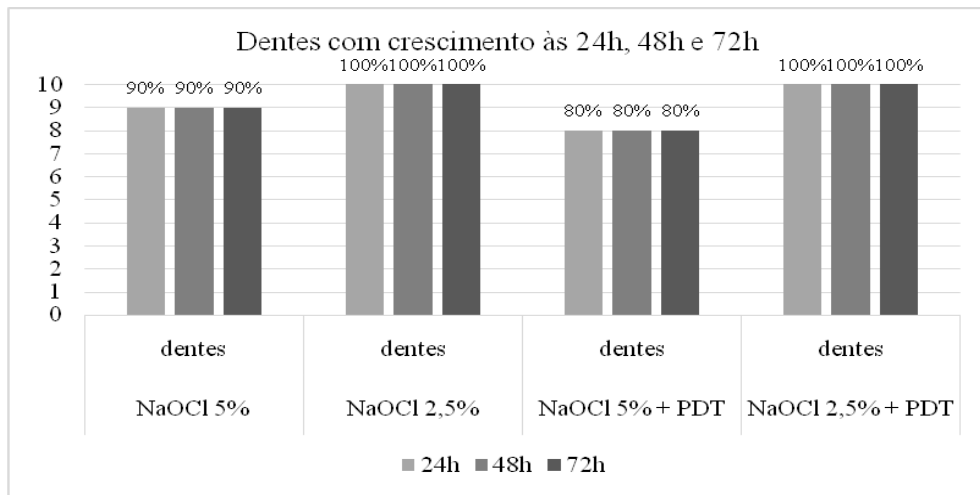


Gráfico 4: Comparação entre grupos da amostra de dentes com crescimento às 24, 48 e 72h de incubação.

6. DISCUSSÃO

A alta taxa de insucesso do tratamento endodôntico deve-se a re-infecção do canal radicular ou à inadequada eliminação da infecção primária. Segundo o estudo de Sjogren (1997) citado na FotoSanNewsletter (2011), a taxa de sucesso de dentes corretamente desinfetados é de 94% por outro lado, dentes cuja desinfecção não foi suficiente apresentam uma taxa de sucesso de 68%. Deste modo, é certo afirmar que o insucesso do tratamento está relacionado com o insucesso da desinfecção.

Os irrigantes convencionais, como o NaOCl, não são totalmente eficazes na eliminação bacteriana a não ser utilizando quantidades abundantes, e mesmo assim, é reportado uma quantidade significativa de canais que ainda contêm bactérias cultivadas após o tratamento. (Bonsor *et al.*, 2006)

Atualmente, têm surgido novos métodos para melhorar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico, a PDT tem sido estudada como um coadjuvante válido ao tratamento convencional na eliminação dos microrganismos. (FotoSanNewsletter, 2011)

Este estudo foi realizado no intuito de avaliar a eficácia da PDT como complemento da terapia convencional avaliando o seu efeito em duas concentrações de NaOCl, 5% e 2,5%.

Para criar um habitat para o crescimento bacteriano após inoculação, foram instrumentados dentes monorradiculares. Durante o protocolo de preparação dos dentes, a smear layer foi removida com EDTA, de modo a facilitar a penetração da bactéria durante a inoculação. (Fonseca *et al.*, 2008) O EDTA é um agente quelante com a propriedade de dissolver tecido orgânico de partículas de dentina prevenindo a sua acumulação nas paredes do canal ou removendo-a após formada. (Poggio *et al.*, 2011) A presença de smear layer nas paredes dos canais bloqueia a penetração de irrigantes para os túbulos dentinários. (Fonseca *et al.*, 2008)

A *E. faecalis* foi escolhida para a inoculação por ser uma bactéria comumente encontrada em infecções endodônticas persistentes. (Stuart *et al.*, 2006) Esta bactéria tem sido utilizada com sucesso como marcador microbiológico válido para estudos *in vitro* porque tem a capacidade de colonizar com sucesso o canal dentário, formar um biofilme, invadir os túbulos dentinários e resistir a alguns procedimentos do tratamento endodôntico. (Souza *et al.*, 2010)

Neste estudo, para assegurar a inoculação da mesma quantidade de *E. faecalis* em cada dente ajustou-se a suspensão a uma concentração de pré-inóculo, observada no espectrofotômetro, diluindo-a até a concentração pretendida (2×10^8 ufc/ml).

Após a inoculação dos canais radiculares, os dentes foram incubados durante 48h a 37° C com o objetivo de formar um biofilme nas paredes dos canais, mimetizando a infecção endodôntica. As bactérias que persistem em biofilme apresentam características que diferem de microrganismos isolados, incluindo uma maior resistência a agentes antimicrobianos. (Stojicic *et al.*, 2013) Na cavidade oral, as bactérias livres na saliva (organismos planctônicos) servem como fonte primária para formar uma estrutura organizada formada por camadas de bactérias. Comunidades microbianas organizadas em biofilmes são extremamente difíceis de erradicar com agentes microbianos e tornando-se resistentes. (Mohammadi, 2008) A eliminação de células bacterianas organizadas em biofilmes é 1000 vezes mais difícil que na sua forma planctônica. (Zand *et al.*, 2012)

O NaOCl tem sido recomendado como o irrigante de eleição pelas suas propriedades físico-químicas e pela ação antibacteriana; é eficaz na eliminação de resíduos dos canais dentários, dissolve matéria orgânica e tem um amplo espectro de atividade antimicrobiana. (Gernhard *et al.*, 2004, Poggio *et al.*, 2011) As soluções de NaOCl podem ser utilizadas em concentrações entre 0,5% a 5,25%. Estudos têm demonstrado que a concentração de 5,25% é a mais eficaz na eliminação dos microrganismos, porém elevadas concentrações acarretam com um maior risco de toxicidade. (Mohammadi, 2008) Atualmente, não existe consenso na escolha da concentração de NaOCl a ser utilizada em endodontia. O NaOCl é extremamente tóxico em elevadas concentrações e tende a induzir irritação dos tecidos por contacto. (Mohammadi, 2008)

De acordo com estes dados, o nosso estudo consistiu na utilização de NaOCl a 5%, por ser o mais eficaz na atividade antimicrobiana e o mais utilizado na prática clínica, e o NaOCl 2,5%, por manter eficácia antimicrobiana, apesar de em menores quantidades, e por ser utilizado na prática clínica no âmbito de diminuir a probabilidade de toxicidade. De modo a aproximar o que é feito na cavidade oral, estabeleceu-se que, para o NaOCl, seriam feitas três aplicações, com um volume de 20 µl por cada dente e que seria deixado a atuar dentro do canal durante 20 segundos. A ação do NaOCl foi

posteriormente inibida com uma solução de tiosulfato de sódio a 5% durante 1 minuto para evitar qualquer ação residual.

Diversos estudos indicam que a PDT mostra eficácia antibacteriana quando utilizada isoladamente. (Bumb *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2011; Xhevdet *et al.*, 2014; Yildirim *et al.*, 2013) No entanto, no presente estudo a PDT foi utilizada após a desinfecção convencional, que é o principal propósito da sua utilização, como coadjuvante do tratamento endodôntico e não como alternativa. (Bergmans *et al.*, 2008)

Existem várias variáveis a ter em conta no desenvolvimento de um protocolo com PDT, incluindo a fonte de luz, o fotossensibilizador e as técnicas de aplicação de luz. (Arneiro *et al.*, 2014) A PDT baseia-se na neutralização de um fotossensibilizador, como o azul de toluidina O (TBO), que se liga à membrana bacteriana onde é ativado por uma fonte de luz a um comprimento de onda específico. (Poggio *et al.*, 2011) Os componentes da PDT não são tóxicos de maneira que representam um tratamento seguro que não resulta em nenhuma alteração ou dano excessivo do tecido vizinho quando a luz é de baixa intensidade. (Xhevdet *et al.*, 2014)

Neste estudo foi utilizado o FotoSan 630 (CMS Dental). O FotoSan é um dos mais recentes dispositivos de PDT introduzidos na endodontia. (Poggio *et al.*, 2011) O fotossensibilizador utilizado neste aparelho é o TBO e a luz é LED num comprimento de onda entre os 620-640nm. Para a distribuição de luz é introduzida uma ponta cônica de diâmetro 0,5mm no interior do canal, em toda a sua extensão. A ponta pré-fabricada não difere das fibras óticas relatadas noutros estudos, permitindo a emissão de luz em direções horizontais e verticais. (Nunes *et al.*, 2011; Xhevdet *et al.*, 2014)

O fotossensibilizador absorve a energia luminosa libertando-a para transformar oxigénio em espécies reactivas de oxigénio (ROS). (FotoSanNewsletter, 2011) As ROS são radicais livres de oxigénio que destroem a membrana bacteriana e causam rapidamente a morte dos microrganismos. (Xhevdet *et al.*, 2014) Cada fotossensibilizador reage num comprimento de onda específico ou seja, um tipo de fotossensibilizador trabalha com uma luz específica. (FotoSanNewsletter, 2011) O espectro de absorção do TBO é 630nm. O TBO é um composto corante do grupo das fenotiazinas considerado um eficaz agente fotossensibilizador na inativação de organismos patogénicos. (Vaziri *et al.*, 2012) Este fotossensibilizador tem elevada

afinidade para fosfonatos, lípidos e proteínas da membrana de modo que, a membrana bacteriana é alvo da fotodestruição mediada pelo TBO. (Zand *et al.*, 2012)

O FotoSan é caracterizado pela vibração da ponta. As ROS são extremamente reactivas, o que significa que tem um tempo de vida ultra-curto (nanossegundos). Isto significa que as ROS apenas podem matar bactérias próximas ao local onde se formam. Na prática, o fotossensibilizador deve estar ligado aos microrganismos. A razão da vibração na ponta é criar micro flutuações do fluido no canal e assim aumentar a probabilidade da molécula de TBO contactar com o microrganismo. (FotoSanNewsletter, 2011)

Neste estudo, para o protocolo de utilização da PDT seguiram-se as indicações do fabricante.

De modo a verificar a eficácia dos diferentes procedimentos de desinfeção, utilizaram-se métodos de cultura bacteriológica. Procedeu-se a colocação dos dentes e dos cones de papel em respectivos tubos de ensaio com 5 ml de BHib estéril.

A utilização de cones de papel esterilizados foi utilizada para transferir o conteúdo do interior do canal após a irrigação. Este método tem como vantagem poder ser utilizado tanto *in vitro* como *in vivo*. Como desvantagem, só os microrganismos que se encontram no canal principal podem ser retirados, não removendo os que estão no interior de ramificações apicais, canais acessórios e anastomoses. Deste modo, trata-se de uma amostra do canal principal e não do real sistema de canais, com as suas irregularidades, istmos, delta apicais e canais acessórios. Por outro lado, ao remover o cone de papel apenas uma parte das bactérias remanescentes terão sido desprendidas, assim, para minimizar esse risco procedemos à recolha de 2 cones de papel por cada dente.

A recolha do próprio dente teve como objetivo tentar corrigir as falhas da recolha de cones. Conseguindo por isso um dado mais real do estado de desinfeção do dente e ao mesmo tempo conseguindo comparar os dados das amostras de cones de papel.

A turbidez ótica do meio BHib foi o indicador da presença bacteriana ao fim de 24 h, 48 h e 72 h de incubação.

Posteriormente, a pureza das amostras foi confirmada com análise macroscópica e microscopia das colônias através do cultivo em meio Slanetz & Bartley e através do método de coloração Gram.

Realizaram-se 4 grupos controle: os controles 1, 2, e 3 são controles positivos que nos garantem a viabilidade da bactéria utilizada (controle 1) e a eficácia (controle 3) e ausência de toxicidade da solução inibidora (controle 2); o controle 4 é um controle negativo por mostra a ausência de contaminação durante os procedimentos realizados. Todos os tubos correspondentes aos controles positivos apresentaram uma turbidez ao fim de 72 h, assim como o tubo correspondente ao controle negativo se manteve sem crescimento no intervalo de 72 h.

No grupo 1, utilizamos para a desinfecção o NaOCl a 5% no qual pudemos observar um crescimento de 90% na amostra de dentes e de 10% na amostra de cones. O NaOCl a 5% tem uma elevada eficácia na eliminação de *E.faecalis*, porém, a completa eliminação depende não só da concentração utilizada como também da duração em que é aplicado. No nosso estudo aplicamos o irrigante 3x 20 segundos, num total de 60 segundos, aproximando o que é realizado na prática clínica. Retamozo *et al.* (2010), demonstra que para uma completa erradicação da *E. faecalis*, num biofilme de 4 semanas, com uma concentração de 5,25% é necessário 40 minutos. Esta afirmação pode explicar porque não foi conseguido uma completa desinfecção, no entanto é necessário ter em consideração que os 40 minutos dizem respeito a uma cultura de 4 semanas e no nosso estudo utilizamos uma cultura de 48 h.

O fato dos dentes apresentarem uma contaminação mais elevada (90%) que os cones pode ser explicado pelo reduzido alcance do NaOCl nos túbulos dentinários. Wong *et al.* (2014), verificou que a capacidade de penetração do NaOCl melhora com o aumento da concentração, no entanto, a completa erradicação das bactérias dos túbulos dentinários é dificilmente conseguida apenas com irrigação de NaOCl com agulha e seringa. Mais que outras bactérias, a *E. faecalis* consegue penetrar até >500µm. (Wong *et al.*, 2014)

No grupo 2 foi estudado a eficácia de uma solução de NaOCl a 2,5%. Nesta concentração obtivemos valores mais elevados de contaminação, 100% de dentes e 60% de cones contaminados. Estudos relatados na revisão de Mohammadi (2008), defendem a eficácia do NaOCl 2,5% na eliminação da *E.faecalis* porém, diferentes

concentrações implicam diferentes tempos de ação. Retamozo *et al.* (2010), demonstra que para uma completa erradicação da *E. faecalis*, num biofilme de 4 semanas, com uma concentração de 2,5% é necessário mais de 40 minutos.

Após testarmos as diferentes concentrações de NaOCl, recorremos a PDT como coadjuvante para verificar se haveria uma melhor eficácia que com o NaOCl isolado.

No grupo 3, testamos a concentração de NaOCl 5% utilizando posteriormente o aparelho FotoSan 630. Os valores obtidos neste grupo foram 80% de crescimento nos dentes e 10% nos cones. A maioria dos estudos relatam que a PDT isolado possui um efeito antimicrobiano (Bergmans *et al.*, 2008; Bumb *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2008; Xhevdet *et al.*, 2014; Yildirim *et al.*, 2013), porém foi verificado que tem uma menor capacidade antimicrobiana que o NaOCl 5%. (Poggio *et al.*, 2011) Souza *et al.* (2010), mostra que a PDT utilizando fotossensibilizadores, como o TOB, não apresentam efeitos significativos como coadjuvantes da preparação químico-mecânica. Apenas observando os valores obtidos isoladamente não é possível distinguir se este efeito se deve ao NaOCl ou à PDT. Posteriormente, na discussão iremos comparar estes dados.

O grupo 4 foi criado no intuito de verificar se o NaOCl a 2,5% coadjuvado com PDT atingiria uma maior eficácia. Caso o efeito deste tipo de desinfecção atingisse valores maiores ou iguais ao NaOCl 5%, tornar-se-ia uma boa alternativa para minimizar os efeitos de toxicidade, por diminuir a concentração, do NaOCl no tratamento endodôntico. Neste grupo houve um crescimento em 30% dos cones e 100% dos dentes. Estes valores são comparados mais à frente na discussão.

Ao analisarmos os resultados da desinfecção experimental, verificamos que na desinfecção de cada grupo existe uma tendência para os cones apresentarem uma melhor desinfecção que a amostras dos dentes. Estas diferenças entre as amostras de cones e dentes mostraram-se estatisticamente significativas ($p < 0,05$) independentemente do método de desinfecção em causa.

Comparando as amostras de dentes entre cada grupo, verificamos que não existem diferenças estatisticamente significativas. ($p > 0,05$).

Durante o protocolo de inoculação, foram colocados 100 μ L de água estéril nos microtubos para manter uma atmosfera húmida e evitar a desidratação da *E. faecalis*. Posteriormente, foram colocados os dentes e feita a inoculação via canal. Sabendo que, a maioria dos dentes se mantinha em contacto directo com a água e tendo em conta

os resultados obtidos, surge a hipótese que durante a inoculação terá havido extravasamento de inóculo para a água esterilizada e desta para a superfície externa do dente. Deste modo, os resultados obtidos através das amostras de dentes pode não ser viável.

Porém, no grupo 1 (NaOCl 5%) e no grupo 2 (NaOCl 5% + PDT) observamos uma ausência de crescimento em 1 e 2 dentes, respetivamente. Este resultado pode ser explicado pela maior eficácia antimicrobiana do NaOCl a 5% e pelo aumento da eficácia do NaOCl quando coadjuvado com PDT verificado noutros estudos. (Bonsor *et al.*, 2006; Poggio *et al.*, 2011; Vaziri *et al.*, 2012). Por outro lado, alguns dos dentes quando colocados nos microtúbulos ficaram aquém da água, de forma que estes dentes possam não ter sido contaminados exteriormente. No entanto, este dados, como relatado anteriormente, não são estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Ao contrário da análise comparativa dos dentes, as amostras de cones apresentam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0,05$)

Como observado nos grupos 1 e 2 e descrito na literatura (Zehnder, 2006), uma maior concentração de NaOCl apresenta uma maior eficácia antimicrobiana.

Neste estudo, observamos um menor crescimento nos grupos que utilizaram uma concentração de NaOCl 5% (grupo 1 e 3). Podemos verificar que o uso de PDT como complemento ao NaOCl 5% não apresenta melhoria na eficácia do NaOCl 5% como indicado noutros estudos. (Seal *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2010) Contrariamente ao nosso estudo, Poggio *et al.* (2011) mostra um maior resultado antibacteriano é conseguido com a utilização de NaOCl coadjuvado com o Fotosan, concluído que o Fotosan é considerado um dispositivo ideal no fim do tratamento dos canais melhorando os resultados de soluções irrigadores convencionais. Poggio *et al.* (2011), mostra que o FotoSan utilizado por mais tempo que o recomendado pelo fabricante (90vs30) conduz a uma, significativa, maior redução bacteriana. No nosso estudo utilizamos a aplicação de luz durante 60 segundos (2 x 30 segundos), o recomendado pela marca (CMS Dental) para tratamento endodôntico, menos que no estudo de Poggio *et al.* (2011) o que pode explicar a diferença de resultados.

Por outro lado, os grupos com NaOCl 2,5% (grupo 2 e 4) apresentam diferenças. O grupo do NaOCl 2,5% apresenta uma maior contaminação que o grupo NaOCl 2,5% com PDT, 6 e 3 cones contaminados, respetivamente. A diferença observada indica que o

uso de PDT complementa a desinfecção com NaOCl como relatado em diversos estudos. (Bonsor *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2014; Poggio *et al.*, 2011). Quando comparamos a eficácia do NaOCl 5% com o NaOCl 2,5% com PDT observamos que apesar da eficácia do NaOCl 2,5% melhorar, não chega para se equiparar ao efeito antimicrobiano do NaOCl 5%. Poggio *et al.* (2011), refere que a eficácia do NaOCl a 5% é maior que a eficácia da PDT. Sendo estes dados, a eficácia do NaOCl 2,5% e da PDT somadas são inferiores à eficácia do NaOCl 5%.

O crescimento foi verificado após 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Na amostra de dentes, o crescimento observado às 24 h foi igual ao observado às 72 h em todos os grupos. No grupo 1, 2 e 3, o crescimento na amostra de cones é igual entre as 24 h e as 72 h. No grupo de NaOCl 2,5% observa-se um aumento de 5 para 6 cones entre as 24 h e as 72 h. Verificou-se que o NaOCl a 2,5% poderá ter reduzido o número de bactérias no interior do canal porém, não o eliminou por completo. Acredita-se que as bactérias em pequeno número não foram capazes de criar turvação no meio ao fim de 24 h e apenas com o seu crescimento foi possível verificar a contaminação às 48h.

Visto ainda permanecerem bactérias nos canais é necessário melhorar e aprimorar os parâmetros do PDT.

A eliminação incompleta das bactérias após a PDT pode ser devido a uma baixa concentração de oxigênio disponível no interior do canal, especialmente nos tubulos dentinários e irregularidades do canal.

Por sua vez, o aumento da concentração do fotossensibilizador e o aumento da intensidade e tempo de exposição da luz são parâmetros que poderão aumentar a eficácia da PDT. (Fimple *et al.*, 2008; Poggio *et al.*, 2011)

Outro parâmetro a definir seria o tempo entre a aplicação do fotossensibilizador e a sua ativação de modo que as moléculas do fotossensibilizador alcançassem os microrganismos alvo.

No nosso protocolo, utilizou-se o irrigante anteriormente a PDT. A água destilada foi o componente utilizado para a remoção do fotossensibilizador do canal de modo a não aumentar o número de aplicações do NaOCl comparativamente aos outros grupos. Apesar de ainda permanecerem bactérias no interior dos canais, o sua população foi reduzida de modo que a utilização do NaOCl após a PDT é sugerida para futuros estudos.

7. CONCLUSÃO

A utilização de uma solução irrigante de NaOCl a 5% combinada com a terapia fotodinâmica em canais infectados com *Enterococcus faecalis* tem uma capacidade bactericida equivalente à irrigação convencional apenas com NaOCl a 5%

O NaOCl a 5% obteve uma desinfecção em 90%

O NaOCl a 2,5% obteve uma desinfecção em 10%

O NaOCl a 5% coadjuvado com PDT obteve uma desinfecção em 90%

O NaOCl a 2,5% coadjuvado com PDT obteve uma desinfecção em 30%

O NaOCl a 2,5% coadjuvado com PDT tem uma eficácia inferior ao NaOCl a 5%.

Assim, conclui-se que os diferentes métodos resultaram em diferenças estatisticamente significativas.

Visto que a PDT é uma terapia não tóxica para os tecidos, a sua coadjuvação com concentrações baixas de NaOCl foi estudada como alternativa às elevadas concentrações de NaOCl. Porém, a sua eficácia mantém-se inferior à do NaOCl a 5% utilizado isoladamente. O NaOCl a 5% continua a ser o método mais eficaz equiparando-se ao seu uso com PDT.

A PDT apresenta-se como um método com elevado potencial em melhorar a desinfecção intracanal. No entanto, parâmetros devem ser estudados e aprimorados de maneira a aumentar a sua eficácia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahangari Z, Samiee M, Yolmeh MA, Eslami G. Antimicrobial Activity of Three Root Canals Irrigants on *Enterococcus Faecalis*: Na in Vitro Study. *Iran Endod J* 2008 Spring; 3(2): 33–37.

Arneiro RAS, Nakano RD, Antunes LAA, Ferreira GB, Fontes KBFC, Antunes LS. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of Oral Science* 2014, Vol. 56, No.4, 277-285.

Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual Effectiveness of Final Irrigation Regimens on *Enterococcus faecalis*-infected Root Canals. *J Endod* 2011; 37: 1121-1123.

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Meerbeek BV, Quirynen M, Lambrechts P. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *International Endodontic Journal* 2008; 41: 227-239.

Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *British Dental Journal* 2006: 201:101-105.

Bonsor SJ, Nichol R, Reid TMS, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An *in vivo* study). *British Dental Journal* 2006; 200: 337-341.

Bumb SS, Bhaskar DJ, Agali CR, Himanshu P, Gupta V, Singh V, Kadtane S, Chandra S. Assessment of Photodynamic Therapy (PDT) in Disinfection of Deeper Dentinal Tubules in a Root Canal System: An In Vitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2014 Nov; 8(11): ZC67-ZC71.

Clarkson RM and Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Australian Dental Journal* 1998; 43:(4).

Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. *Braz Dent J* 2002; 13(2): 113-117.

Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner ACR, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008 June; 34(6): 728-734.

Fonseca MB, Júnior POT, Pallota RC, Filho HF, Denardin OVP, Rapoport A, Dedivitis RA, Veronezi JF, Genovese WJ, Ricardo ALF. Photodynamic Therapy for Root Canals Infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomedicine and Laser Surgery* 2008; 26 (3): 209-213.

FotoSanNewsletter, 2011 August.

Garcez AD, Ribeiro MS, Tegos GP, Nuñez SC, Jorge AOC, Hablin MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined With Conventional Endodontic Treatment to Eliminate Root Canal Biofilme Infection. *Lasers Surg Med* 2007 January; 39(1): 59-66.

Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy on Patients with Necrotic Pulps and Periapical Lesion. *J Endod* 2008 February; 34(2): 138-142.

Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *International Endodontic Journal* 2004; 37: 272-280.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep; 20(3):340-349.

Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J Conserv Dent* 2010 Oct-Dec; 13(4): 256-264.

Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med*. 2011 September; 755-767.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International Dental Journal* 2008; 58(6) 329-341.

Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R, Pagonis TC, Stashenko PP, Soukos NS. Endodontic photodynamic therapy *ex vivo*. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):217-222.

Nunes MR, Mello I, Franco GCN, Medeiros JMF, Santos SSF, Habitante SM, Lage-Marques JL, Raldi DP. Effectiveness of Photodynamic Therapy Against *Enterococcus faecalis*, With or Without the Use of an Intracanal Optical Fiber: An In Vitro Study. *Photomedicine and Laser Surgery* 2011; 29 (12): 803-808.

Oliveira BP, Aguiar CM, Camara AC. Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontic infections. *Eur J Dent* 2014;8:424-30.

Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, Imbriani M, Visai L. Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs* 2011; 34 (9): 889-897.

Rahimi S, Janani M, Lotfi M, Shahi S, Aghbali A, Pakdel MV, Milani AS, Ghasemi N. A Review of Antibacterial Agents in Endodontic Treatment. *Iranian Endodontic Journal* 2014;9(3):161-168.

Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol* 2011 Oct-Dec; 15(4): 323–327.

Retamozo B, Shabahan S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2010 Mar; 36(3):520-3.

Seal GJ, NG Y.-L, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *International Endodontic Journal* 2002; 35: 268-274.

Sorares JÁ, Pires Junior DR. Influence of sodium Hypochlorite-Based Irrigants on the Susceptibility of Intracanal Microbiota to Biomechanical Preparation. *Braz Dent J* 2006 17(4): 310-316.

Souza CL, Brito PRR, Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira EJJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. *JOE* 2010 February; 36 (4): 292-296.

Stojicic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *International Endodontic Journal* 2013; 46: 649-659.

Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue Dissolution by Sodium Hypochlorite: Effect of Concentration, Temperature, Agitation, and Surfactant. *J Endod* 2010; 36: 1558-1562.

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; 32:93-98.

Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R, Nasab AN, Naseri M. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2,5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. *Dent Rest J* 2012 Sep-Oct; 9(5): 613-618.

Wong DTS, Cheung GSP. Extension of Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite into Dentinal Tubules. *J Endod* 2014; 40: 825-829.

Xhevdet A, Stubljarić D, Kriznar I, Jukić T, Skvarc M, Veranić P, Ihan A. The Disinfecting Efficacy of Root Canals with Laser Photodynamic Therapy. *J Lasers Med Sci* 2014; 5(1): 19-26.

Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, Kent R, Soukos NS. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: Safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod*. 2009 November; 35(11): 1567-1572.

Yao N, Zhang C, Chu C. Effectiveness of Photoactivated Disinfection (PAD) to Kill *Enterococcus faecalis* in Planktonic Solution and in an Infected Tooth Model. *Photomedicine and Laser Surgery* 2012; 1-6.

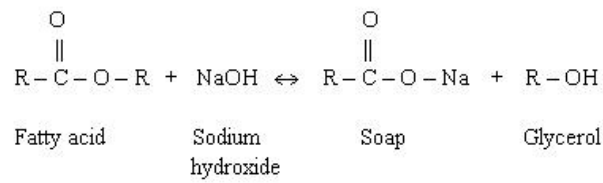
Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent* 2013; 7: 469-73.

Zand V, Milani AS, Amini M, Barhaghi MHS, Lotfi M, Rikhtegaran S, Sohrabi A. Antimicrobial Efficacy of Photodynamic Therapy and Sodium Hypochlorite on Monoculture Biofilms of *Enterococcus faecalis* at Different Stages of Development. *Photomedicine and Laser Surgery* 2012; 32(5): 1-6.

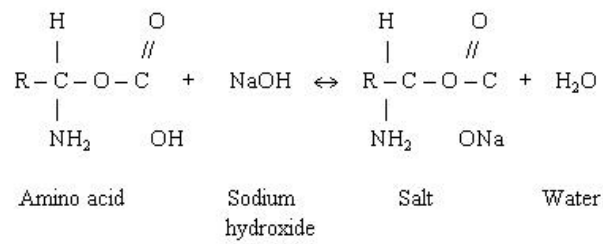
Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod* 2006;32: 389 –398.

ANEXO I- Introdução

Scheme 1. Saponification reaction.



Scheme 2. Amino acid neutralization reaction.



Scheme 3. Chloramination reaction.

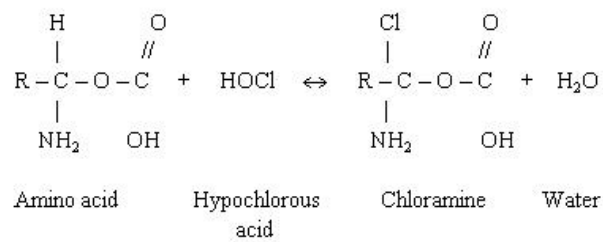


Figura I-1: Reações do NaOCl (Estrela *et al.*, 2000)

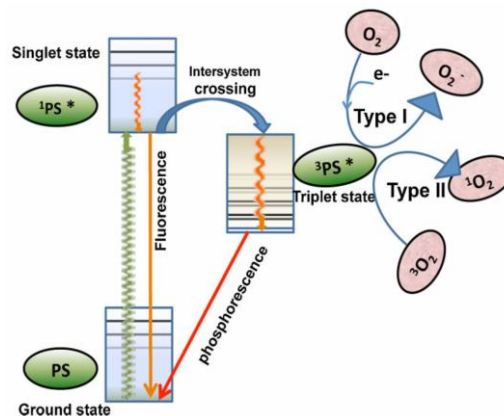


Figura I-2: Mecanismos fotoquímicos da PDT (Kharkwal *et al.*, 2011)

ANEXO II – Metodologias

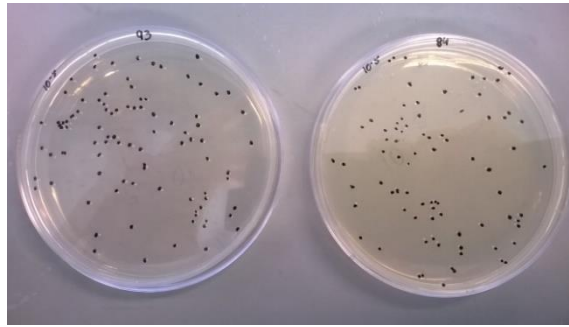


Figura II-1: Contagem de Unidades Formadoras de Colônia

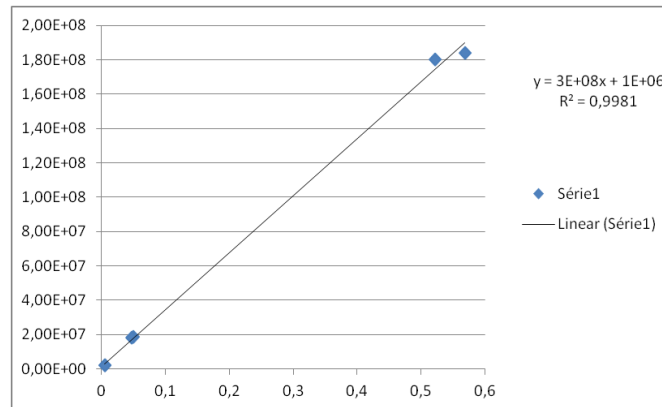


Gráfico II-1: Gráfico de regressão da curva de calibração.



Figura II-2: Uniformização da amostra de dentes a 15mm



Figura II-3: Câmara de fluxo laminar



Figura II-4: Aspeto dos tubos após procedimento de desinfecção de um grupo



Figura II-5: Aspeto dos tubos após 72h: sem turvação e com turvação

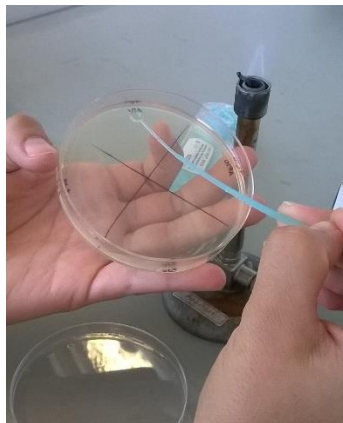


Figura II-6: Distribuição do conteúdo dos tubos com crescimento em meio de Slanetz & Bartley (SB)

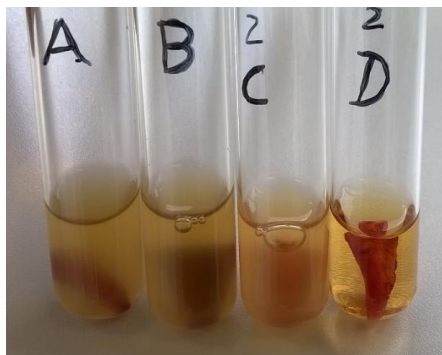


Figura II-7: Aspeto dos tubos do grupo controle após 72h de incubação

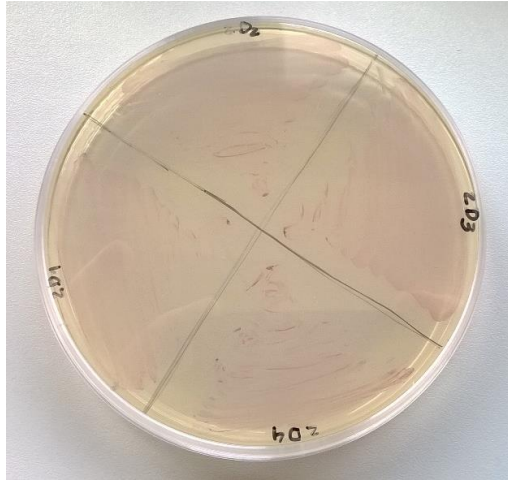


Figura II-8: Aspeto de cultura de *E. faecalis* em meio Slanetz & Bartley (SB) após 48h de incubação

ANEXO III – Análise Estatística com o Teste Qui-Quadrado

Tabela III-1: Análise Estatística das amostras do Grupo 1

Testes qui-quadrado

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	12,800 ^a	1	,000		
Correção de continuidade ^b	9,800	1	,002		
Razão de verossimilhança	14,723	1	,000		
Teste Exato de Fisher				,001	,001
Associação Linear por Linear	12,160	1	,000		
N de Casos Válidos	20				

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 5,00.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabela III-2: Análise Estatística das Amostras do Grupo 2

Testes qui-quadrado

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	5,000 ^a	1	,025		
Correção de continuidade ^b	2,813	1	,094		
Razão de verossimilhança	6,556	1	,010		
Teste Exato de Fisher				,087	,043
Associação Linear por Linear	4,750	1	,029		
N de Casos Válidos	20				

a. 2 células (50,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2,00.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabela III-3: Análise Estatística das Amostras do Grupo 3

Testes qui-quadrado

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	9,899 ^a	1	,002		
Correção de continuidade ^b	7,273	1	,007		
Razão de verossimilhança	11,016	1	,001		
Teste Exato de Fisher				,005	,003
Associação Linear por Linear	9,404	1	,002		
N de Casos Válidos	20				

a. 2 células (50,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 4,50.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabela III-4: Análise Estatística das Amostras do Grupo 4**Testes qui-quadrado**

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Qui-quadrado de Pearson	10,769 ^a	1	,001		
Correção de continuidade ^b	7,912	1	,005		
Razão de verossimilhança	13,681	1	,000		
Teste Exato de Fisher				,003	,002
Associação Linear por Linear	10,231	1	,001		
N de Casos Válidos	20				

a. 2 células (50,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 3,50.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabela III-5: Análise Estatística do Crescimento da Amostra de Cones dos Diferentes Grupos**Testes qui-quadrado**

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	8,401 ^a	3	,038
Razão de verossimilhança	8,373	3	,039
Associação Linear por Linear	,024	1	,876
N de Casos Válidos	40		

a. 4 células (50,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2,75.

Tabela III-6: Análise Estatística do Crescimento das Amostras de Dentes dos Diferentes Grupos**Testes qui-quadrado**

	Valor	df	Significância Sig. (2 lados)
Qui-quadrado de Pearson	3,964 ^a	3	,265
Razão de verossimilhança	4,801	3	,187
Associação Linear por Linear	,070	1	,791
N de Casos Válidos	40		

a. 4 células (50,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é ,75.

ANEXO IV – Meios de crescimento de *Enterococcus faecalis*

Tabela IV: Protocolo para a realização dos meios de crescimento de *E.faecalis* utilizados no estudo.

Meio de cultura	Procedimento	Temperatura/ Tempo de esterilização
Brain Heart Infusion broth (Scharlau)	Pesar 37 g para 1 l de água destilada. Homogeneizar e esterilizar. Distribuir em tubo (3 ml) em condições de esterilidade.	121°C/15 min
Slanetz & Bartley Agar (Liofilchem)	Pesar 44,5 g para 1 L de água destilada estéril em condições assépticas. Aquecer até à ebulição e distribuir imediatamente em placas (15 ml / placa) em condições de esterilidade. Não autoclavar. Colocar uma placa em estufa para confirmar esterilidade do meio.	
Tryptona Soya Agar (Liofilchem)	Pesar 40 g para um litro de água destilada. Homogeneizar e aquecer até à ebulição. Esterilizar. Distribuir em placa de Petri (15 ml/placa). Colocar uma placa na estufa para confirmar esterilidade do meio.	121°C/15 min
Soro fisiológico	Pesar 0,9 g de cloreto de sódio (Scharlau) para 1 L de água destilada. Homogeneizar e esterilizar. Distribuir em tubo (10 ml) em condições de esterilidade	121°C/15 min