UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**DESINFECÇÃO DA DENTINA RADICULAR PELA
IRRADIAÇÃO DOS LASERS DE Nd:YAG, Ho:YAG E
Er:YAG: UM MODELO *IN VITRO***

SILVIA CRISTINA MAFRA CECCHINI

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o Título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

São Paulo

2001

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**DESINFECÇÃO DA DENTINA RADICULAR PELA
IRRADIAÇÃO DOS LASERS DE Nd:YAG, Ho:YAG E
Er:YAG: UM MODELO *IN VITRO***

SILVIA CRISTINA MAFRA CECCHINI

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o Título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador:

Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi

São Paulo
2001

Data da Defesa: 5/7/2001

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha família,

Meu pai, Renato,

a quem dedico esta tese,

que não mediu esforços na minha formação. Pelo imensurável apoio e orientação.

Te admiro e amo muito.

Minha mãe, Vilma (*in memorian*),

pela dedicação e amor.

Eternamente presente em meu coração.

Minha irmã, Renata,

pelo apoio e amizade.

Aos amigos que se tornaram minha família nestes três últimos anos,

Hafid Abaibou,

por tornar este projeto possível através do apoio e orientação.

Geoffrey Okada e Nooshin Noghreian,

por todo o apoio e companheirismo.

Ao meu orientador,

Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi,

a quem devo as conquistas na endodontia. O agradecimento profundo pela confiança, orientação e pelo apoio. A minha eterna gratidão, respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Mahmoud Torabinejad, que abriu as portas da Loma Linda University para o desenvolvimento deste projeto e pela sua orientação.

Aos Profs. Leif K. Bakland e Joel M. White pela imensa colaboração, pelas sugestões e pelos comentários.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, sempre presente em todas as etapas de minha carreira, pelas decisivas sugestões, e por incentivar e apoiar o meu desenvolvimento. Minha eterna gratidão.

À Profa. Dra. Denise Zezell, cara e especial para mim, pela colaboração e pelo incondicionável apoio.

AGRADECIMENTOS

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela formação e oportunidade de crescimento profissional.

Loma Linda University, Laboratório de Microbiologia, pela utilização de sua facilidades.

Prof. Dr. Carlos Munoz e Neil Jessop pelas idéias, pela orientação e ajuda no preparo dos espécimes e utilização do Laboratório de Materiais Dentários.

Shahrokh Shabahang, pelo fornecimento do microrganismo *E. faecalis*.

John M. Hough, pela realização do preparo histológico.

Richard Tinker, pelo auxílio na parte gráfica.

Prof. Dr. Jay S. Kim, pela realização da análise estatística e colaboração.

Prof. Dr. James D. Kettering, pelos comentários.

Prof. Dr. George Javor pela orientação na realização da espectroscopia.

Geoffrey T. Okada, Robert Handysides e Zubaida, pelo auxílio no experimento.

George V. Summers, Maria Regina Machado, Luzia Moraes e Cida, pela colaboração nas correções editoriais do manuscrito.

Sony Thomas e Johnathan Wee, pelo apoio constante destes amigos.

Cátia T. Santos, pelo apoio dado à pós-graduação.

Neuza Mazzoni e Ana Maria de Souza, pelo cuidado e apoio.

Tomas Haney e Continuum Biomedical (Dublin, CA), pela concessão do equipamento de laser, assim como também **Convergent Laser Technologies** (Oakland, CA), pela doação da fibra óptica para o experimento.

Coordenadoria de Bolsas e Auxílio no Exterior - Capes, pelo auxílio e apoio, através da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

American Association of Endodontists, através de sua Fundação, pelo auxílio e apoio.

Loma Linda University, pelo auxílio e apoio.

SUMÁRIO

p.

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO 01

2 REVISÃO DA LITERATURA 05

2.1 Papel das bactérias na patologia pulpar e periapical 05

2.2 Profundidade de penetração bacteriana nos túbulos dentinários..... 12

2.3 Instrumentação e agentes quimioterápicos 16

2.4 Medicação intracanal: hidróxido de cálcio 20

2.5 Aplicação da luz laser em canais radiculares 28

2.5.1 Redução bacteriana intracanal pela luz laser 38

3 PROPOSIÇÃO 53

4 MATERIAL E MÉTODOS 54

5 RESULTADOS 72

6 DISCUSSÃO 84

7 CONCLUSÕES 98

REFERÊNCIAS 100

SUMMARY

APÊNDICES

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 4.1 - Preparado dos corpos de prova. (A) Remoção da coroa por um disco rotatório diamantado sob refrigeração a água; (B) porção restante da raiz colocada em um torno..... 55
- FIGURA 4.2 - Preparado dos corpos de prova. (A) Remoção do cimento e da dentina até a obtenção de um diâmetro externo de 6 mm; (B) broca de 2 mm de diâmetro utilizada para alargar o canal; (C) corte da porção apical para obter o comprimento de 12 mm 56
- FIGURA 4.3 - Aparência e dimensões de um corpo de prova preparado ... 57
- FIGURA 4.4 – Corpo de prova preparado 58
- FIGURA 4.5 - (A) Corpos de prova mantidos em frascos com 20 mL de caldo de tripticase de soja, 10^7 *E. faecalis* e 20 ì g/mL de cloranfenicol; (B) cultivo em meio bile esculina. 60
- FIGURA 4.6 - Microscopia óptica mostrando os túbulos dentinários do espécime colonizado por *E. faecalis*..... 61
- FIGURA 4.7 - Microscopia óptica mostrando os túbulos dentinários do espécime não exposto a *E. faecalis*..... 62
- FIGURA 4.8 - (A) Laser pulsado de Ho:YAG a 2,1 µm; (B) laser pulsado de Nd:YAG a 1,06 µm; e (C) laser pulsado de Er:YAG a 2,94 µm 65

FIGURA 4.9 - (A) Fibra óptica para os lasers de Nd:YAG e Ho:YAG; (B) fibra óptica para o laser de Er:YAG 66

FIGURA 5.1 - Redução porcentual para todos os grupos tratados 78

FIGURA 5.2 - Redução porcentual para os grupos tratados como um todo.81

FIGURA 5.3 - Espectro de absorção pelo microrganismo *E. faecalis*, que compreende os comprimentos de onda no ultravioleta e visível. 82

FIGURA 5.4 - Espectro de absorção da luz laser pelo microrganismo *E. faecalis*, que compreende os comprimentos de onda do infravermelho próximo 83

FIGURA 6.1 - Espectro de absorção da água e hidroxiapatita 88

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 4.1 - Grupos-controle.....	67
TABELA 4.2 - Grupos experimentais	69
TABELA 5.1 - Redução bacteriana proporcional para cada grupo tratado...	73
TABELA 5.2 - Análise estatística por meio do teste U de Mann-Whitney	77
TABELA 5.3 - Redução bacteriana proporcional para cada grupo como um todo	79
TABELA 5.4 - Análise estatística por meio do teste U de Mann-Whitney; comparação entre os grupos como um todo	80
QUADRO Ap. 3.1 - Água estéril (espécime não infectado) - controle negativo (CN1) para o Grupo 1	
QUADRO Ap. 3.2 – Iodo em solução de iodeto de potássio (KI_3) - controle negativo (CN2) para o Grupo 1	
QUADRO Ap. 3.3 - Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 1	

QUADRO Ap. 3.4 - Grupo 1A: laser de hólmio:YAG laser a 50 mJ, 15 Hz e 33 J/cm^2 , por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.5 - Grupo 1B: laser de hólmio:YAG a 50 mJ, 15 Hz e 66 J/cm^2 , por 120 segundos; sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.6 - Água estéril (espécime não infectado) - controle negativo (CN1) para o Grupo 2

QUADRO Ap. 3.7 - KI_3 - controle negativo (CN2) para o Grupo 2

QUADRO Ap. 3.8 - Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 2

QUADRO Ap. 3.9 - Grupo 2A: laser de neodímio:YAG laser a 50 mJ, 10 Hz e 29 J/cm^2 , por 60 segundos, sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.10 - Grupo 2B: laser de neodímio:YAG laser a 100 mJ, 10Hz e 58 J/cm^2 , por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.11 - Grupo 2C: laser de neodímio:YAG laser a 100 mJ, 10Hz e 116 J/cm^2 , por 120 segundos; sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.12 - Água estéril (espécime não infectado) – controle negativo (CN1) para o Grupo 3

QUADRO Ap. 3.13 - KI_3 - controle negativo (CN2) para o Grupo 3

QUADRO Ap. 3.14 - Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 3

QUADRO Ap. 3.15 - Grupo 3A: laser de érbio:YAG a 25 mJ, 10 Hz e $16\text{J}/\text{cm}^2$, por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.16 - Grupo 3B: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e $32\text{J}/\text{cm}^2$, por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.17 - Grupo 3C: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e $64\text{J}/\text{cm}^2$, por 120 segundos; sem refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.18 - Água estéril (espécime não infectado) – controle negativo (CN1) para o Grupo 4

QUADRO Ap. 3.19 - KI_3 – controle negativo (CN2) para o Grupo 4

QUADRO Ap. 3.20 - Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 4

QUADRO Ap. 3.21 - Grupo 4A: laser de érbio:YAG a 25 mJ, 10 Hz e $16\text{J}/\text{cm}^2$, por 60 segundos, refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.22 - Grupo 4B: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e $32\text{J}/\text{cm}^2$, por 60 segundos, refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.23 - Grupo 4C: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e $64\text{J}/\text{cm}^2$, por 120 segundos, refrigeração com água/ar

QUADRO Ap. 3.24 - Água estéril (espécime não infectado) - controle negativo (CN1) para o Grupo 5

QUADRO Ap. 3.25 - KI_3 – controle negativo (CN2) para o Grupo 5

QUADRO Ap. 3.26 - Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 5

QUADRO Ap. 3.27 - Grupo 5: hidróxido de cálcio por sete dias

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ArF - fluoreto de argônio

Ca(OH)₂ - hidróxido de cálcio

Ca²⁺ - íon cálcio

CO₂ - dióxido de carbono

CW - *continuous wave* (onda contínua)

DNS - diferença não-significativa

EDTA - etilenodiamino tetra-acetato

Er:YAG - érbio:ítrio, alumínio, granada

Er:YSGG – érbio:ítrio, escândio, gálio, granada

HA - hidroxiapatita

H₂PO₄⁻ - íon dihidrogenofosfato

HCO₃⁻ - íon hidrogenocarbonato

He-Ne - hélio neônio

HF - fluoreto de hidrogênio

Ho:YAG - hólmio:ítrio, alumínio, granada

Hz - hertz

J - joule

J/cm² - joule/centímetro quadrado

J/s - joule/segundo

KBr - brometo de potássio

KI₃ - iodo em solução de iodeto de potássio

KrF - fluoreto de criptônio

LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*;

amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

LPS - lipopolissacarídio

MEV - microscopia eletrônica de varredura

Min - minuto

mJ/p - milijoule/pulso

mm – milímetro

ms - milissegundo

NaOCl - hipoclorito de sódio

Nd:YAG - Neodímio:ítrio, alumínio, granada

Nd:YAP - Neodímio:ítrio, alumínio, perovskita

NIR - infravermelho próximo

nm - nanômetro

°C – grau Celsius

pH – potencial hidrogeniônico

PMT - *physical modification threshold* (limiar de modificação física)

rpm - revoluções por minuto

s - segundo

TSA – Tryptic Soy Agar (ágar de tripticase de soja)

TSB - Tryptic Soy Broth (caldo de tripticase de soja)

u.f.c. - unidades formadoras de colônias

UV - ultravioleta

W - watt

XeCl - cloreto de xenônio

α - alfa

μ g/mL- micrograma/mililitro

μ L- microlitro

μ m- micrômetro

μ s- microssegundo

RESUMO

DESINFECÇÃO DA DENTINA RADICULAR PELA IRRADIAÇÃO DOS LASERS DE Nd:YAG, Ho:YAG E Er:YAG: UM MODELO *IN VITRO*

A provável causa do insucesso da terapia endodôntica é a persistência de microrganismos colonizando os túbulos dentinários. Para reduzir o risco de insucesso e, se possível, o tempo despendido no tratamento endodôntico, novos equipamentos e materiais são constantemente desenvolvidos. O objetivo desta investigação foi estudar o efeito da irradiação laser intracanal na desinfecção dos túbulos dentinários de dentes bovinos recém-extraídos, utilizando-se um modelo *in vitro*. Os grupos irradiados pelos vários lasers foram comparados ao tratamento com hidróxido de cálcio, freqüentemente utilizado como medicação intracanal. O cimento radicular foi removido, o canal preparado e os dentes, cortados, resultando em 180 corpos de prova padronizados. Para promover a colonização bacteriana, os corpos de prova foram incubados, a 37°C, em frascos contendo caldo de tripticase de soja e *Enterococcus faecalis*, o qual continha um plasmídeo que permitiu o seu crescimento em um meio seletivo com cloranfenicol. Os corpos de prova foram divididos em cinco grupos experimentais e três grupos-controle. Para irradiação foram utilizados os lasers pulsados de: Ho:YAG a 2,1 µm; Nd:YAG (1,06 µm); e Er:YAG (2,94 µm) com e sem refrigeração ar/água. Os

grupos tratados receberam três parâmetros diferentes de irradiação com cada tipo de laser: energia abaixo do limiar de modificação física (*physical modification threshold* - 1/2 do PMT) por 60s; no limiar (PMT) por 60s; e, acima do limiar (120s). O Grupo 5 recebeu sete dias de tratamento com hidróxido de cálcio. Como controles, três espécimes para cada grupo receberam água estéril (controle negativo), três receberam KI₃, após exposição à bactéria (controle negativo) e três não receberam tratamento após exposição à bactéria (controle positivo). A quantidade de bactérias foi estimada mediante a contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c.). De modo a avaliar, paralelamente, se os comprimentos de onda laser utilizados no experimento poderiam ser absorvidos pelo *E. faecalis*, foram obtidos espectros de absorção no UV, VIS e IR, por meio de espectroscopia. A análise estatística mostrou uma redução bacteriana como segue: Ho:YAG > hidróxido de cálcio > Nd:YAG > Er:YAG com refrigeração ar/água > Er:YAG sem refrigeração ar/água. Houve uma significativa redução bacteriana no grupo irradiado pelo Ho:YAG no limiar de modificação – PMT (50 mJ, 10 Hz, 66 J/cm², por 120s), seguida pelo Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz, 33J/cm², por 60s e pelo grupo que recebeu hidróxido de cálcio. Os dois últimos grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas. O espectro de absorção pelas bactérias (*E. faecalis*) nas faixas dos comprimentos de onda do UV e VIS apresentou picos de absorção em 361 nm e em 377 nm (UV). Já o infravermelho próximo revelou uma baixa absorção pelo microrganismo testado.

1 INTRODUÇÃO

Um das principais considerações na terapia endodôntica é a completa limpeza dos canais radiculares no intuito de eliminar ou pelo menos reduzir de forma significativa a presença de bactérias. A importância do preparo químico-cirúrgico como principal método de redução da população bacteriana dos canais radiculares tem sido apoiada por experimentos *in vitro*, os quais demonstraram que a instrumentação e irrigação do canal, seguidas de medicação intracanal levam a uma dramática redução da microbiota (Byström & Sundqvist, 1981). Entretanto, uma possível causa de insucesso é a persistência de infecção do canal radicular por bactérias, colonizando os túbulos dentinários.

O microambiente nos túbulos dentinários radiculares é anaeróbio e favorece o crescimento de um seletivo grupo de bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas. As bactérias presentes nos canais radiculares podem colonizar os túbulos dentinários e canais acessórios, onde estão protegidas da ação de ambos, da instrumentação e de solução irrigante. Além disso, as bactérias remanescentes dentro do sistema de canais radiculares não são acessíveis à defesa do hospedeiro ou à administração sistêmica de agentes antimicrobianos (Siqueira Jr. & Lopes, 1999).

Resultados clínicos aceitáveis têm sido atribuídos ao uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal (Heithersay, 1975; Tronstad, 1992). Entretanto, Haapasalo & Ørstavik (1987) relataram que a pasta de hidróxido de cálcio (Calasept, Swedia, Knivsta, Suécia) falhou em eliminar *Enterococcus faecalis* dos túbulos dentinários. Safavi *et al.* (1990) demonstraram que o gênero *Enterococcus faecium* permaneceu viável nos túbulos dentinários após períodos relativamente extensos de tratamento com solução de hidróxido de cálcio e soro fisiológico. Ørstavik & Haapasalo (1990) observaram que o hidróxido de cálcio pode levar até dez dias para desinfetar os túbulos dentinários contaminados por bactérias anaeróbias facultativas. Entretanto, outros autores observaram que o hidróxido de cálcio é ineficiente contra enterococos (Stevens & Grossman, 1983; Byström *et al.*, 1985; Haapasalo & Ørstavik, 1987; Siqueira Jr. & Uzeda, 1996).

As bactérias presentes em ramificações, istmos e irregularidades dos canais radiculares podem também estar protegidas da ação do hidróxido de cálcio. Portanto, um período curto de medicação com hidróxido de cálcio elimina principalmente as bactérias em contato direto com esse material, tais como as bactérias presentes no canal principal ou na dentina circumpulpar. Essas áreas também são comumente afetadas pelos procedimentos químico-cirúrgicos (Siqueira Jr. & Lopes, 1999; Molander *et al.*, 1998).

A realização de um completo tratamento endodôntico em sessão ou consulta única tem sido descrita a partir de 1887, quando Dodge relatou um método de obturação imediata dos canais radiculares que tiveram uma

porção da polpa removida. A terapia endodôntica em sessão única tem se tornado uma prática popular e comum na endodontia contemporânea de forma a ser aceita rapidamente (Landers & Calhoun, 1980). As principais vantagens desse método são as reduzidas sessões, o aumento da eficiência do operador e a conveniência para o paciente. Além disso, há uma reduzida necessidade de refamiliarização à morfologia do canal e prevenção da nova colonização bacteriana entre consultas (Oliet, 1983). A técnica endodôntica em uma sessão parece ser o tratamento de escolha para dentes com polpa viva e quando não há a presença de uma área radiolúcida perirradicular (Fava, 1994). Existe ainda controvérsia se dentes com polpa necrótica e patologias perirradiculares quanto a serem tratadas em uma sessão única, devido à questão da desinfecção do canal. Nesse sentido, a necessidade de métodos de tratamento que possam aumentar a taxa de sucesso e, se possível, também reduzir o tempo despendido na terapia endodôntica tem estimulado o contínuo desenvolvimento de novos equipamentos e materiais. Entre estes equipamentos, os diferentes tipos de lasers têm sido testados em endodontia com variáveis graus de sucesso (Stabholz, 1998).

Um dos principais objetivos da terapia endodôntica é limpar extensivamente o canal radicular de forma a remover o tecido necrótico e atingir a desinfecção. Com esse intuito, os lasers têm sido utilizados em conjunto com a terapia endodôntica convencional para a redução microbiana e para a modificação da superfície do canal radicular.

Embora muitos autores (White *et al.*, 1991; Stabholz *et al.*, 1993a; Gutknecht *et al.*, 1996b, 1997; Gouw-Soares *et al.*, 2000) tenham demonstrado que a utilização de diferentes lasers pode levar a uma significativa redução do número de microrganismos no canal radicular, existem poucos relatos sobre a eficácia de lasers na desinfecção dos túbulos dentinários.

Como o tratamento endodôntico em sessão única tem se tornado uma prática popular e comum, a utilização da irradiação laser intracanal poderia ser benéfica como complemento à instrumentação químico-cirúrgica.

O estudo do efeito da irradiação laser intracanal na desinfecção dos túbulos dentinários é oportuno, sendo necessário desenvolver modelo experimental que permita compará-lo ao efeito da medicação intracanal, diante das bactérias persistentes à terapia endodôntica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papel das bactérias na patologia pulpar e periapical

A íntima relação entre microrganismos e a patologia pulpar e/ou perirradicular foi demonstrada no estudo clássico em ratos por Kakehashi *et al.*, em 1965. Após a exposição das polpas dentais à cavidade oral com microbiota normal, desenvolveram-se necrose pulpar, abscessos e lesões perirradiculares. Em contraste, não ocorreu nenhuma mudança patológica em animais livres de germes (gnotobióticos).

Em 1976, Sundqvist demonstrou, em situações clínicas, a associação bactéria e patologia periapical, quando analisou dentes traumatizados com necrose pulpar, com e sem lesões periapicais. Culturas positivas foram encontradas em todos os dentes que exibiram radiograficamente lesões perirradiculares. Porém, não foi obtida nenhuma cultura positiva em dentes com tecidos periapicais normais.

Möller *et al.*, em 1981, também mostraram a relação causa e efeito entre infecção pulpar e o desenvolvimento de lesão periapical. Os autores selaram assepticamente polpas necróticas em canais radiculares de macacos. Não foi observada nenhuma reação inflamatória nos tecidos

apicais desses animais. Em contraste, a colocação de tecido pulpar propositadamente infectado elicitou a destruição periapical. A severidade da inflamação pulpo/periapical foi diretamente relacionada com o total conteúdo microbiano dos canais radiculares e com o tempo pelo qual os tecidos periapicais foram expostos aos microrganismos (Korzen *et al.*, 1974). A infecção pulpar parece ser um pré-requisito absoluto para o desenvolvimento de inflamação periapical. Os produtos bacterianos por si sós são capazes de causar patologia periapical (Sundqvist *et al.*, 1989; Möller *et al.*, 1981).

A principal causa da patologia pulpar e/ou periapical é a presença de cárie dental. Outras portas de entrada para bactéria podem se dar por intermédio de fraturas dentais, microinfiltração em restaurações e, possivelmente, por meio de canais laterais associados à doença periodontal. Devido à reduzida circulação colateral dentro da polpa, os mecanismos de defesa normais do hospedeiro, tais como inflamação e imunidade, são comprometidos e a cavidade pulpar se torna um reservatório para microrganismos.

Os tipos de microrganismos encontrados em polpas infectadas dependem fundamentalmente do meio de cultura e da técnica utilizados para coleta das amostras. Investigações iniciais utilizaram predominantemente técnicas aeróbias, enquanto mais tarde os pesquisadores começaram a enfatizar o papel dos microrganismos anaeróbios. Infecções endodônticas são polimicrobianas em que cada espécie bacteriana apresenta diferentes fatores de virulência. Estudos

microbianos de canais radiculares infectados cronicamente mostram que a população microbiana é predominantemente anaeróbia e Gram-negativa (Sundqvist, 1976; Farber & Seltzer, 1988). Por sua vez, Sundqvist (1992) isolou *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Streptococcus* a partir de canais radiculares infectados. Ademais, estudos longitudinais em animais experimentais demonstraram que a proporção de microrganismos anaeróbios estritos aumenta e os organismos facultativos decrescem com o tempo (Fabricius *et al.*, 1982). Além disso, a região apical dos canais radiculares contém um maior número de microrganismos anaeróbios em comparação à região coronária.

Baumgartner & Falkler (1991) investigaram os 5 mm apicais de canais radiculares infectados em dentes com polpas expostas por cáries e com lesões periapicais. Os gêneros predominantemente isolados foram: *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* pigmentados, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* não pigmentados, *Veillonella*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mutans*. Dos 50 gêneros isolados, a maioria (68%) foi anaeróbia estrita. A adaptação metabólica para microrganismos anaeróbios estritos deve ocorrer em ambiente de baixo potencial de redução-oxidação provido pelo tecido necrótico pulpar e pelo tecido perirradicular. Em estudo recente realizado por Sundqvist *et al.* (1998), 54 dentes com canais radiculares obturados e lesões periapicais persistentes foram selecionados para retratamento. A análise microbiológica da microbiota do canal radicular revelou a presença de organismos Gram-positivos, principalmente *Enterococcus faecalis*.

Os microrganismos são muito versáteis e alguns podem sintetizar produtos, tais como toxinas, cápsulas e enzimas extracelulares, capazes de modificar o equilíbrio do processo infeccioso em favor de outros microrganismos. Interações bacterianas positivas, quer de suporte mútuo, quer competitiva, ajudam a determinar a natureza da microbiota emergente. Associações fortes e positivas foram observadas entre *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*, entre *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *Wolinella (Campylobacter) recta* e entre *Prevotella intermedius* e *P. micros* em canais radiculares (Sundqvist, 1992). Algumas combinações são claramente mais virulentas que outras; espécies de *Bacteroides* (*Prevotella* e *Porphyromonas*), *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus* estão fortemente relacionadas com o aumento da destruição periapical (Sundqvist, 1994). Um estudo interessante foi conduzido por Fabricius *et al.*, em 1982, avaliando a habilidade de 11 linhagens bacterianas, em várias combinações, para induzir reações periapicais. A microbiota oral isolada de macacos com periodontite apical experimental consistiu de oito linhagens: *Bacteroides oralis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus milleri*, *E. faecalis*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces bovis* e *Propionibacterium acnes*. Essas linhagens foram então inoculadas em proporções iguais em 12 canais radiculares. Paralelamente, 63 canais foram inoculados com outras combinações ou linhagens separadas. Após seis meses, *Bacteroides oralis* predominaram na maioria dos canais radiculares, mas não foram isolados novamente em nenhum dos canais radiculares quando inoculados em

culturas puras. *Enterococcus*, entretanto, sobreviveram como cultura pura em todos os canais. As infecções mistas mostraram uma maior capacidade de induzir periodontite apical, como foi revelado por exame radiográfico.

Sundqvist *et al.*, em 1989, focalizaram o papel de *Bacteroides* pigmentados de preto em canais radiculares infectados e encontrou 33% das amostras contendo um ou mais espécimes de organismos. *Bacteroides intermedia* e *Bacteroides endodontalis* (mais tarde classificados como *Prevotella intermedius* e *Porphyromonas endodontalis*, respectivamente) constituíram as espécies isoladas mais comuns. Mais da metade dos canais radiculares que continham *Bacteroides* pigmentados de preto foi associada a abscessos apicais agudos e a drenagem purulenta.

Bacteroides e outros microrganismos produzem um conjunto de fatores de virulência que contribuem para a sua patogenicidade, incluindo enzimas proteolíticas, citotoxinas e hemolisinas (Holt & Bramanti, 1991). As bactérias produzem ambos, as enzimas que são fatores de espalhamento e proteases que neutralizam imunoglobulinas e os componentes do sistema complemento. As bactérias anaeróbias também produzem cadeias-curtas de ácidos graxos, tais como os ácidos propiônico, butírico e isobutírico. Pesquisas têm mostrado que o ácido butírico estimula a produção de interleucina-1, a qual está associada à reabsorção óssea e à patologia perirradicular (Eftimiadi *et al.*, 1991). As endotoxinas de microrganismos Gram-negativos devem também ser consideradas fatores de virulência. Em particular, LPS tem sido correlacionado à estimulação de reabsorção óssea (Umezue *et al.*, 1989). No experimento realizado por Dwyer & Torabinejad

(1981), endotoxinas de *E. coli* foram introduzidas em canais de dentes despulpados de gatos. Os resultados indicaram que as endotoxinas podem ter um papel indutor na produção de lesões periapicais.

As bactérias e seus produtos estão usualmente envolvidos em periodontites periapicais agudas, mas a presença de bactérias nos tecidos periapicais em periodontites apicais crônicas assintomáticas é ainda controversa. Estudo em microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de placa bacteriana em ápices seccionados cirurgicamente, de dentes refratários ao tratamento endodôntico (Tronstad *et al.*, 1990a). *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Propionibacterium (Arachnia) propionica* e *Prevotella intermedia* foram identificados utilizando-se métodos imuno-histoquímicos em cortes de lesões perirradiculares (Happonen, 1986; Barnett *et al.*, 1990). Esses estudos indicam que a patologia perirradicular se desenvolve em resposta à presença de microrganismos, de produtos microbianos e de seus produtos de decomposição. A extensão da reação inflamatória perirradicular depende da severidade do irritante, da duração e de fatores do hospedeiro.

Estudos têm sugerido que enterococos são importantes agentes para o insucesso endodôntico, embora não estejam presentes usualmente ou em grande número de dentes que não receberam tratamento endodôntico prévio (Byström *et al.*, 1985; Sundqvist *et al.*, 1998). Entretanto, Molander *et al.* (1998) examinaram microbiologicamente cem dentes obturados endodonticamente os quais apresentavam lesões periapicais. Organismos facultativos anaeróbios predominaram, correspondendo a 69% das

linhagens bacterianas identificadas, mas enterococos estavam presentes em 32% dos dentes investigados. Em condições similares, Möller (1966) e Sundqvist *et al.* (1998) isolaram *E. faecalis* em 29% e 38% dos canais que apresentaram microrganismos pós-terapia endodôntica recuperáveis, respectivamente. Siren *et al.*, em 1997, investigaram a relação entre os achados bacteriológicos e os procedimentos clínicos. Amostras foram obtidas utilizando-se cones de papel inseridos na porção apical do canal. Os resultados mostraram a presença de um maior número de bactérias entéricas, como *E. faecalis*, em canais radiculares que permaneceram sem selamento, em casos com um maior número de consultas e em casos de retratamento.

Em recente trabalho realizado por Dahlén *et al.* (2000), os autores relataram a presença de enterococos em todos os 29 dentes com tratamento endodôntico prévio e persistência de infecção. Em 17 dos dentes hidróxido de cálcio havia sido utilizado como medicação intracanal.

Peciuliene *et al.* (2000) isolaram na população lituana o microrganismo *E. faecalis* em canais que haviam sido previamente tratados endodonticamente e apresentavam áreas radiolúcidas periapicais. Dos 25 dentes avaliados, 20 apresentavam culturas positivas, sendo que 70% dessas culturas continham *E. faecalis*. Os canais foram instrumentados com auxílio de hipoclorito de sódio (2,5%) e EDTA (17%), e uma segunda colheita microbiológica foi realizada. Sete dentes ainda apresentavam culturas positivas sendo que em cinco destas o *E. faecalis* se apresentou como monoinfecção.

Noda et al., em 2000, analisaram o exsudato de canais radiculares que apresentavam áreas radiolúcidas periapicais e haviam recebido tratamento endodôntico prévio. Todos os dentes apresentavam um quadro de sintomatologia espontânea, com exsudato intracanal. O material foi colhido dos canais radiculares com cones de papel, e a análise microbiológica detectou 12 espécies bacterianas, entre elas *Bacteroides* e *Enterococcus*, com um predomínio da última.

2.2. Profundidade de penetração bacteriana nos túbulos dentinários

Apesar do aumento da eficiência dos métodos utilizados para eliminação bacteriana pela instrumentação dos canais radiculares ou pela utilização de medicação intracanal, alguns dentes com patologia pulpar e/ou perirradicular não respondem favoravelmente ao tratamento. A resistência das bactérias que invadiram o sistema de canais radiculares é usualmente a causa desses insucessos. Os microrganismos podem, de fato, colonizar espaços que não são acessíveis à instrumentação e à medicação. Shovelton, em 1964, encontrou bactéria em túbulos dentinários de 74% dos dentes infectados, os quais foram examinados por microscopia óptica.

Os microrganismos presentes em túbulos dentinários, após tratamento endodôntico, podem permanecer inativos em canais acessórios ou podem morrer ou se multiplicar, utilizando *debris* orgânicos e materiais remanescentes nos canais acessórios (Morse, 1971). A última possibilidade foi rejeitada por Grossman (1981), que considerou serem poucos os

microrganismos sobreviventes encontrados entre o cimento e os materiais de obturação. Entretanto, Tronstad *et al.* (1990b) confirmaram o papel das bactérias no insucesso de tratamentos endodônticos. Um estudo *in vitro* de Torabinejad *et al.* (1990) mostrou que bactérias podem infiltrar o sistema de canais radiculares entre a parede dentinária e o material obturador após três dias de exposição a um fluido contendo bactéria (similar à saliva), e poderiam atingir a área apical após 24 horas.

Kouchi *et al.*, em 1980 analisaram a penetração microbiana nos túbulos dentinários de canais radiculares que haviam sido deixados abertos. A análise por imunofluorescência detectou a presença de *Streptococcus mutans* nos túbulos dentinários a uma distância de 493 a 524 µm.

Ao analisar pela MEV a ação de diferentes irrigantes nas bactérias presentes em túbulos dentinários, Gutierrez *et al.* (1990) observaram a penetração bacteriana a 250 µm do canal radicular. Perez *et al.* (1993a) observaram a penetração de *Streptococcus sanguis* em túbulos dentinários de dentes bovinos a uma profundidade de 792 µm.

Exames em microscopia eletrônica de varredura conduzidos, por Sen *et al.* (1995), revelaram que cocos e bacilos foram capazes de penetrar de 10 a 150 µm dentro dos túbulos dentinários, além da presença de fungos. Siqueira Jr. *et al.*, em 1996, observaram, também pela MEV, diferentes profundidades de penetração das diferentes espécies bacterianas, com uma maior penetração por *E. faecalis*, *Actinomyces israeli* e *Propionibacterium acnes*. Entretanto, ao realizar culturas sob condições anaeróbias, Ando & Hoshino (1990) recuperaram bactérias na dentina infectada em

profundidades de 0,5 a 2,0 mm. A dentina infectada profundamente apresentou principalmente cocos e bacilos Gram-positivos anaeróbios. A microbiota das camadas profundas de dentina radicular apresentou-se similar à camada s profundas de lesões cariosas da dentina coronária.

A idéia de que bactérias remanescentes no canal radicular é inócua está sujeita a debate. Akpata (1976) sugeriu que, embora a esterilidade do canal não seja sempre obtida, pequenos números de microrganismos provavelmente não são capazes de promover uma nova contaminação do canal radicular ou influenciar o prognóstico da terapia endodôntica. Tais afirmações estão de acordo com Peters *et al.* (1995). Entretanto, Sjögren *et al.* (1997) reportaram um aumento estatístico significativo na taxa de insucesso de dentes obturados que apresentavam um pequeno número de bactérias viáveis remanescentes no tempo de obturação. O fator decisivo de maior importância, o qual afeta o resultado a longo prazo, pode ser a persistência de contaminação no canal radicular (Nair *et al.*, 1990; Ørstavik & Haapasalo, 1990). Em 1994, Oguntebi postulou que a infecção residual nos túbulos dentinários e a microinfiltração são fatores importantes na presença de lesões periapicais persistentes.

Em 2000, Peters *et al.* avaliaram a penetração bacteriana em túbulos dentinários de dentes bovinos e observaram a penetração numa maior profundidade do microrganismo *E. faecalis*, quando comparado à espécie *A. israeli*. Peters *et al.* (2001) realizaram outro estudo *in vitro*, em que a dentina radicular de 20 dentes (dois grupos de localidades distintas) apresentava áreas radiolúcidas periapicais prévias à extração. A dentina de

três diferentes áreas entre a polpa e o cimento (A, B e C) foram cultivadas. Adicionalmente a dentina de oito dentes foi analisada histologicamente. As mais freqüentes espécies bacterianas encontradas foram: *Prevotella intermedia*, *Prevotella prevotti*, *Prevotella buccae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas asacharolytica*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus micros*, *Actinomyces israeli*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus acnes* e *Lactobacillus acidophilus*. Em 77% das amostras dentinárias de uma localidade (Amsterdã) e 87,5% das amostras de Glasgow foram detectadas bactérias. Em uma maior distância da polpa (camada C), 62% das amostras apresentaram bactérias. Nas camadas mais próximas da polpa um maior número de bactérias anaeróbias e bacilos Gram-positivos foi encontrado, assim como um grande número de espécies bacterianas. As secções histológicas mostraram uma penetração bacteriana em cinco dos oito dentes. Segundo os autores, parece claro que as bactérias estão presentes em regiões dentinárias profundas próximas ao cimento, e o método de cultura anaeróbia é mais sensível que o histológico para esta detecção.

2.3 Instrumentação e agentes quimioterápicos

Stewart, em 1955, dividiu a terapia dos canais radiculares em três fases: preparação químico-mecânica, controle microbiano e obturação. De acordo com este autor, a limpeza químico-cirúrgica do canal é uma das

fases mais importantes da terapia endodôntica. Schilder (1974) introduziu o conceito de limpeza e modelagem (*cleaning and shaping*). Limpeza refere-se à remoção de substâncias orgânicas, microbiota, produtos bacterianos, nódulos pulpare, denso colágeno e materiais produzidos durante a instrumentação do canal. A modelagem refere-se à preparação do sistema de canais radiculares para receber uma obturação tridimensional. Embora os objetivos da limpeza e da modelagem sejam diferentes, esses procedimentos são usualmente completados de forma simultânea, com os mesmos instrumentos e medicações.

Um série de estudos clássicos salientou a eficácia da instrumentação dos canais radiculares na remoção de resíduos (*debris*) e tecidos pulpare (Byström & Sundqvist, 1981; Byström *et al.*, 1983, Byström & Sundqvist, 1985; Moodnik, 1976; Bolanos & Jensen, 1980; Klayman & Brilliant, 1975; Davis, 1972). Todos esses estudos identificaram tecidos pulpare remanescentes, *debris* e uma camada de magma dentinário nas paredes dos canais radiculares. Davis *et al.* (1972) encontraram muitas variações na anatomia dos canais radiculares após a produção de modelos de silicone de canais instrumentados e a observação em microscopia. A maioria dos canais não haviam sido nem tocadas pelos instrumentos durante o preparo dos canais. Byström & Sundqvist (1981) encontraram, em metade dos canais radiculares estudados, a presença de bactérias após um único tratamento, embora houvesse uma considerável redução na contagem bacteriana.

A técnica de instrumentação inclui o uso de limas, ultra-som e instrumentos rotatórios. A utilização de medicamentos inclui irrigantes como o hipoclorito de sódio e EDTA, medicação intracanal com hidróxido de cálcio e uma série de outros medicamentos.

Várias soluções irrigantes têm sido usadas ao longo dos anos, incluindo: água tamponada, solução fisiológica isotônica, clorexidina, ácido cítrico, EDTA, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e solução anestésica.

Durante o preparo químico-cirúrgico dos canais radiculares, o hipoclorito de sódio atua como agente antibacteriano (Harrison & Hand, 1981), dissolvendo os tecidos necróticos e pulpaes (Hand *et al.*, 1978), e inativando endotoxinas (Butler, 1982). Salzgeber & Brilliant (1977) também demonstraram que o hipoclorito de sódio é capaz de atingir o canal radicular em sua extensão em canais preparados por técnica seriada.

O hipoclorito de sódio continua a ser o mais comum e efetivo agente químico (Harrison *et al.*, 1990; Baumgartner & Cuenin, 1992). Cavalleri *et al.* (1989) obtiveram sucesso na eliminação de um grande número de microrganismos, principalmente bactérias Gram-negativas, através de repetida irrigação intracanal com hipoclorito de sódio. Entretanto, bactérias Gram-positivas, tais como *Streptococcus lactis* e *Aerococcus*, persistiram, devido provavelmente às condições ambientais, tal como o pH ácido.

A associação do hipoclorito de sódio com a solução de EDTA também parece aumentar a limpeza dos canais radiculares, a partir de sua capacidade de remoção da parte orgânica e inorgânica do magma dentinário, respectivamente (Baumgartner & Mader, 1987).

Ohara *et al.* (1993) avaliaram os efeitos de vários irrigantes em seis bactérias anaeróbias. A solução de clorexidina foi capaz de eliminar completamente as bactérias após um minuto, o hipoclorito de sódio a 5,25% após 15 minutos, e a solução de EDTA após uma semana. A solução de hidróxido de cálcio não apresentou efeito contra as bactérias testadas após um intervalo de uma semana. Outro estudo realizado por Jeansonne & White (1994) demonstrou que a solução de clorexidina a 2% foi tão eficiente como a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% na redução microbiana de canais radiculares. Entretanto, de acordo com Heling & Chandler (1998), as propriedades de dissolução tecidual fazem do hipoclorito de sódio a solução de escolha como irrigante.

Túbulos dentinários de canais radiculares humanos infectados com *E. faecalis* foram instrumentados e receberam irrigação com: grupo 1 – hipoclorito de sódio a 5%, seguido de EDTA a 10%; ou grupo 2 – EDTA a 10%, seguido de hipoclorito de sódio a 5%. O exame histológico do primeiro grupo revelou infecção residual estendendo-se a partir do lúmen do canal até uma profundidade média de 300 µm. Os dentes que receberam EDTA e subsequente irrigação com hipoclorito de sódio apresentaram uma

área de túbulos livre de microrganismos, até uma profundidade média de 130 μm (Berutti *et al.*, 1997).

Kuruvilla & Kamath, em 1998, acrescentam que a utilização das soluções de gluconato de clorexidina a 0,2% e hipoclorito de sódio (2,5%), quando utilizadas em conjunto, podem levar a um melhor efeito bactericida do que quando utilizadas separadamente.

Em estudo recente realizado por Siqueira Jr. *et al.* (2000), os autores avaliaram *in vitro* a redução bacteriana produzida pela instrumentação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (1%, 2,5% e 5,25%) em dentes inoculados com *E. faecalis*. Todas as soluções reduziram o número de microrganismos, embora eles não tenham sido completamente eliminados. Não houve diferença estatística significativa entre as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Outro estudo foi realizado por Buck *et al.* (2001), em que os autores avaliaram, *in vitro*, a capacidade de redução bacteriana de três soluções irrigantes nos túbulos dentinários de 12 canais radiculares. Os canais foram instrumentados, esterilizados e inoculados com uma suspensão de *E. faecalis*. As soluções irrigantes avaliadas foram: o hipoclorito de sódio a 0,5%, a solução de EDTA a 0,2% e clorexidina a 0,12% (Peridex). Embora as soluções irrigantes tenham sido colocadas nos canais radiculares por apenas um minuto, o hipoclorito de sódio mostrou uma maior redução bacteriana. Nenhuma das soluções promoveu uma redução microbiana completa.

Os lubrificantes são usados durante o procedimento de penetração inicial e facilitam os movimentos do instrumento dentro dos canais. RC Prep, Endo PTC, glyoxide e hipoclorito de sódio são lubrificantes usuais.

Em recente estudo realizado por Heling *et al.* (1999), os autores reportaram também o efeito antibacteriano do creme de peróxido de uréia (RC Prep), freqüentemente utilizado durante o preparo químico-cirúrgico.

2.4 Medicação intracanal: hidróxido de cálcio

A razão para o uso de medicação intracanal é da melhora da desinfecção do canal radicular e a redução da microbiota abaixo dos níveis atingidos durante a instrumentação do canal. Através da permanência no canal entre consultas, o curativo pode prevenir a nova infecção do canal radicular e reduzir o risco de proliferação de bactérias residuais.

Portanto, embora a preparação mecânica por si só é capaz de reduzir o número de microrganismos em canais radiculares infectados, não se pode esperar uma eliminação consistente de todos os microrganismos. A irrigação com hipoclorito de sódio aumenta a atividade bactericida e a remoção de tecido pulpar remanescente. Entretanto, numa série de artigos publicados em 1981, 1983 e 1985, Byström & Sundqvist relataram que mesmo após a cuidadosa instrumentação mecânica e a utilização de um agente antimicrobiano, metade dos canais radiculares, tratados em uma sessão, abrigou bactérias. Esse fato salienta a necessidade de se criar um

ambiente antimicrobiano sob certo período de tempo, o que tem sido demonstrado em razão da alta alcalinidade do hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2).

O hidróxido de cálcio tem sido utilizado na terapia endodôntica desde 1920, quando Hermann descreveu o seu uso como agente antimicrobiano no tratamento de dentes desvitalizados. Na terapia endodôntica contemporânea, o hidróxido de cálcio é uma medicação intracanal normalmente utilizada.

O hidróxido de cálcio tem demonstrado ser capaz de eliminar bactérias dentro dos canais radiculares (Safavi *et al.*, 1985; Sjögren *et al.*, 1991; Byström *et al.*, 1985). A utilização de Ca(OH)_2 , com suas propriedades antimicrobianas (Byström *et al.*, 1985) e de dissolução tecidual (Hasselgren *et al.*, 1988), foi também avaliada por Sjögren *et al.* (1991).

Byström *et al.* (1985) mostraram que a pasta de Ca(OH)_2 efetivamente eliminou microrganismos em canais radiculares infectados, quando o curativo foi mantido por quatro semanas. Entretanto, o período de tempo para clinicamente se obter uma melhor desinfecção com a pasta de Ca(OH)_2 está ainda incerto. Reit & Dahlén (1988) encontraram 26% de persistente infecção após duas semanas de medicação intracanal, e Ørstavik *et al.* (1991) reportaram que 8 em 23 canais ainda apresentaram-se infectados após uma semana de medicação. Em um estudo realizado por Sjögren *et al.* (1991), uma semana de medicação resultou numa ausência total de microrganismos. Entretanto, neste estudo a instrumentação

recebeu o acréscimo de três minutos de irrigação com ultra-som antes da colocação de Ca(OH)_2 .

Siqueira Jr. & Uzeda (1996) avaliaram a capacidade de desinfecção das pastas de hidróxido de cálcio em túbulos dentinários de dentes bovinos contaminados com bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas (*A. Israeli*, *F. nucleatum* e *E. faecalis*). Os espécimes foram expostos a pastas de hidróxido de cálcio misturada com soro fisiológico ou com paramonoclorofenol canforado. Esta última resultou em completa desinfecção dos túbulos dentinários após um dia, enquanto, ao ser misturado com soro fisiológico, não houve redução bacteriana após uma semana.

Estrela et al. (1999) avaliaram a atividade antimicrobiana da medicação de Ca(OH)_2 em espécimes inoculados com *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosas*, separadamente ou em mistura. A medicação foi utilizada por 48 horas, 72 horas e 7 dias. Os autores não obtiveram redução bacteriana nos grupos tratados.

O alto pH da pasta de Ca(OH)_2 (aproximadamente 12,5) é responsável pelo efeito destrutivo da membrana celular bacteriana e estruturas protéicas (Siqueira Jr. & Lopes, 1993). Em um artigo de Esberard et al. (1996), os autores sugeriram que após a pasta de Ca(OH)_2 ser colocada dentro de canais radiculares de dentes extraídos, houve um aumento no pH da superfície das cavidades preparadas nas raízes dentais. O pH aumentou rapidamente por três dias, permanecendo em cerca de 10,0

durante um período de observação de 120 dias. Um estudo prévio (Nerwick *et al.*, 1993) mostrou que os íons hidroxila, derivados do curativo intracanal de Ca(OH)_2 , difundem em questão de horas para o interior da dentina radicular, todavia são necessários sete dias para atingir a dentina radicular externa, e duas a três semanas para atingir níveis elevados. Entretanto, os íons hidroxila não se difundem de forma significativa pela completa superfície radicular, totalmente coberta por cimento.

A permeabilidade e a capacidade-tampão da dentina são fatores-chave a afetar a difusão de íons hidroxila através da dentina radicular. O tamponamento pode ocorrer quando doadores de prótons (tais como H_2PO_4^- e HCO_3^-), presentes na camada hidratada de hidroxiapatita, fornecem prótons adicionais para manter o pH inalterado. Os íons hidroxila poderiam também ser absorvidos na camada hidratada, diminuindo então, a difusão por meio dos túbulos dentinários. Esses achados estão de acordo com estudos realizados por Çalt *et al.* (1999), os quais demonstraram a liberação de Ca^{2+} a partir de pastas de Ca(OH)_2 através da dentina radicular, mas sem aumento do pH do meio, o que indica que os íons hidroxila não se difundiram para fora da dentina.

Safavi & Nichols, em 1993, também demonstraram a habilidade do Ca(OH)_2 para degradar e desintoxicar o LPS bacteriano residual quando utilizado como medicação intracanal por um período de pelo menos sete dias. Os mesmos autores conduziram testes *in vitro* avaliando o efeito do Ca(OH)_2 em lipopolissacarídeos bacterianos (endotoxina). Eles descobriram que níveis de ácidos graxos livres eram mais elevados em amostras

tratadas com Ca(OH)_2 , indicando que ocorre uma degradação do LPS. A liberação lenta de íons hidroxila produz um prolongado efeito antibacteriano (Sjögren *et al.*, 1991). Em uma recente revisão da literatura realizada por Siqueira Jr. & Lopes (1999), os autores argumentaram que os possíveis mecanismos de ação do Ca(OH)_2 se devem à liberação de íons hidroxila em um ambiente aquoso. O seu efeito letal na célula bacteriana deve-se provavelmente ao dano à sua membrana citoplasmática, à desnaturação protéica e ao dano ao DNA. Íons hidroxila induzem peroxidação de lipídios, resultando na destruição de fosfolipídios, componentes estruturais da membrana celular. A alcalinização promovida pelo Ca(OH)_2 induz a quebra da ligação iônica que mantém a estrutura terciária protéica. Essas mudanças resultam freqüentemente na perda da atividade enzimática e no êxtase do metabolismo celular (Voet & Voet, 1995). O íon hidroxila reage com o DNA bacteriano e induz a sua ruptura (Imlay & Linn, 1988).

O hidróxido de cálcio tem sido recomendado como medicação intracanal devido ao seu efeito antibacteriano (Byström & Sundqvist, 1985), anti-reabsortivo (Tronstad *et al.*, 1981) e à sua capacidade de dissolução tecidual (Hasselgren *et al.*, 1988). O pH alcalino do Ca(OH)_2 , pH de 8 a 11, neutraliza o ambiente ácido encontrado em canais radiculares contaminados. Adicionalmente, a abundância de íons cálcio poderia ativar o sistema complemento e provocar uma resposta imunológica, bem como ativar ATP-ase dependente de cálcio, facilitando a formação óssea (Tronstad *et al.*, 1981).

Algumas bactérias podem sobreviver em ambiente com pH de 8-9, fator esse importante devido ao fato de que o Ca(OH)_2 nem sempre elimina bactéria quando em contato com fluidos teciduais. O pH de 11,5 pode ser neutralizado para 8-9, permitindo a sobrevivência de algumas bactérias (Atlas, 1997; Marsh *et al.*, 1993).

Com relação ao número de visitas para a realização do tratamento endodôntico, o que inclui a utilização de uma medicação intracanal, é lógico esperar-se um maior índice de sucesso em visitas múltiplas, devido à maior eficiência na eliminação de bactérias do canal radicular e túbulos dentinários. Entretanto, a maioria dos estudos falha em indicar uma diferença significativa no índice de sucesso da terapia endodôntica (Soltanoff, 1978; Oliet, 1983; Pekruhn, 1986).

Em 1996, Caliskan & Sen conduziram um estudo prospectivo controlado, envolvendo 172 casos clínicos. Todos os dentes tratados em consultas múltiplas receberam Ca(OH)_2 como medicação intracanal. Os controles foram realizados em um período de dois a cinco anos, e o sucesso baseou-se na completa resolução das lesões periapicais. Todos os dentes nos quais a medicação havia sido extruída ou confinada ao canal radicular não apresentaram diferenças nos padrões de resolução. O índice de resolução completa das áreas radiolúcidas periapicais foi de 80,8%, enquanto a resolução incompleta abrangeu 7,6% dos casos. A inclusão de um grupo com visita única teria complementado a coleta de dados desse estudo.

Sjogren *et al.* (1997) enfatizaram a importância da completa eliminação das bactérias do sistema de canais radiculares previamente à obturação. Os autores utilizaram técnicas anaeróbias para a realização desse estudo. Em um controle após cinco anos da terapia endodôntica, 94% dos casos com culturas negativas prévias à obturação apresentaram resolução completa. Em contraste, apenas 68% dos casos com culturas positivas prévias à obturação apresentaram resolução. A partir desses resultados, os autores concluíram que a eliminação das bactérias dos canais radiculares não poderia ser obtida em uma consulta única e salientaram a importância da utilização da medicação intracanal entre consultas.

Um estudo prospectivo realizado por Trope *et al.*, em 1999, avaliou (após 13 meses) a resolução radiográfica de 103 dentes com áreas radiolúcidas apicais tratados em consulta única ou múltipla, com a única diferença de que o grupo-controle foi tratado em duas consultas e sem a utilização de medicação intracanal. Embora esse estudo não tenha demonstrado diferenças em resolução das áreas radiolúcidas apicais entre visitas únicas e múltiplas (64 e 74%, respectivamente), o percentual de resolução do grupo-controle foi claramente inferior. Esse fato enfatiza a importância da medicação intracanal em casos de múltiplas consultas. O pequeno número de amostras e a ausência de inclusão do critério clínico podem ser as possíveis falhas desse estudo.

Existe um reduzido número de estudos histológicos comparando a resolução perirradicular em dentes tratados em uma única ou em várias

consultas. Leonardo *et al.* (1995) investigaram histologicamente a resolução de lesões periapicais criadas em cachorros, as quais receberam as duas formas de tratamento. Os resultados obtidos após nove meses mostraram a presença de uma reação inflamatória mais severa, uma resolução mais lenta, e maior número de áreas de reabsorção no tratamento realizado em uma consulta única. Entretanto, durante o estudo, o irrigante utilizado não foi o mesmo para os dois grupos. O grupo que recebeu tratamento completo em uma única consulta foi irrigado com hipoclorito de sódio a 0,5%, enquanto no outro grupo utilizou-se hipoclorito de sódio a 5,25% e peróxido de hidrogênio a 3%.

Katebzadeh *et al.*, em 1999, estudaram o papel da obturação dos canais radiculares na resolução de periodontites apicais, comparando esta em dentes infectados que foram medicados ou não com Ca(OH)_2 . Lesões periapicais foram induzidas e divididas em dois grupos. O exame histológico após seis meses mostrou, de forma significativa, menos inflamação no grupo tratado com Ca(OH)_2 quando comparado ao grupo em visita única, em que não foi utilizada medicação. Os autores concluíram que a desinfecção com Ca(OH)_2 promoveu um quadro de menor inflamação do que somente a obturação dos canais radiculares.

2.5 Aplicação da luz laser em canais radiculares

Após o desenvolvimento do laser de rubi por Maiman em 1960; Stern & Sognnaes (1964) foram os primeiros investigadores a estudar os

efeitos da irradiação com o laser de rubi em tecidos duros dentais. Estudos iniciais dos efeitos de lasers em tecidos duros dentais foram baseados simplesmente no uso empírico de disponíveis lasers e no exame das modificações teciduais mediante várias técnicas. Numerosos estudos avaliaram o efeito da irradiação laser dentro dos canais radiculares, alguns apenas como terapia suplementar.

Weichman & Johnson (1971) se apresentam entre os primeiros autores a sugerir a utilização de lasers em endodontia. Um estudo preliminar foi realizado na tentativa de selar externamente o orifício do canal radicular na região apical utilizando os lasers de Nd:YAG e CO₂. Embora o objetivo não tenha sido atingido, informações relevantes foram obtidas. Em 1972, Weichman *et al.* sugeriram a ocorrência de mudanças químicas e físicas na dentina irradiada. Os mesmos comprimentos de onda foram utilizados em associação com diferentes materiais numa tentativa de selar internamente a constrição apical.

De acordo com Stabholz (1998), existem três principais áreas em endodontia para a utilização de lasers: 1) o periápice; 2) o sistema de canais radiculares; e 3) a dentina extra-radicular. A ação de diferentes tipos de irradiação nos canais radiculares — laser de CO₂ (Zakariasen *et al.*, 1986), laser de Nd:YAG (Levy, 1992), laser de argônio (Moshonov *et al.*, 1995b), laser de excimer (Pini *et al.*, 1989), laser de Ho:YAG (Nuebler-Moritz *et al.*, 1997), laser de diodo (Moritz *et al.*, 1997b), laser de Nd:YAP (Blum *et al.*, 1997) e, mais recentemente, o laser de Er:YAG (Mehl *et al.*, 1999) — tem sido investigada.

Diferente do laser de CO₂, os lasers de Nd:YAG, argônio, excimer, diodo, hólmio e érbio podem ser conduzidos através de uma fibra óptica, sendo mais acessível em diferentes áreas e estruturas da cavidade oral, o que inclui os canais radiculares. A técnica requer o alargamento dos canais radiculares por métodos convencionais previamente à introdução da fibra óptica dentro do canal. O diâmetro da fibra óptica utilizada dentro do canal radicular varia de 200 µm a 400 µm, o equivalente às limas de números 20 a 40.

Dederich *et al.*, em 1984, utilizaram o laser de Nd:YAG para irradiar as paredes dos canais radiculares de cinco dentes caninos. Após serem seccionados longitudinalmente e o tecido necrótico removido, áreas circulares planas foram criadas na parede dos canais e irradiadas pelo laser de Nd:YAG através de uma fibra óptica de 600 µm, com potências médias de 10 a 90 W, 0,1 a 0,9s. A análise realizada por microscopia eletrônica de varredura mostrou fusão, recristalização e uma superfície dentinária glazeada. Os autores salientam este efeito poderia levar a uma redução na permeabilidade dentinária.

Bahcall *et al.*, em 1992, investigaram a utilização do laser pulsado de Nd:YAG (emitindo no comprimento de onda de 1,064 µm) nos tecidos perirradiculares, quando empregados para a limpeza dos canais radiculares de dentes de cachorro. Vinte e quatro raízes de 12 dentes vitalizados foram divididas em dois grupos (tratamento endodôntico convencional e com o laser de Nd:YAG). Os dentes foram avaliados radiografica e histologicamente após 1, 15 e 30 dias. Os resultados mostraram que o

laser de Nd:YAG causou necrose das células do ligamento periodontal um dia após o tratamento, o que não ocorreu após o tratamento endodôntico convencional. Após 15 dias de tratamento, ambos os grupos apresentaram um maior número de osteoclastos e osteócitos, e apenas no grupo tratado pelo laser observaram-se áreas de reabsorção óssea. Após 30 dias, áreas de reabsorção óssea, anquilose e áreas de remodelamento foram observadas neste último grupo, enquanto os dentes tratados convencionalmente apresentaram características morfológicas normais. Os autores, entretanto, utilizaram parâmetros de irradiação excessivos (3W, 25 Hz, 30s). Esse estudo é um bom exemplo de que os parâmetros laser devem ser adequados e constituem um dos fatores para a segurança e a eficiência do tratamento.

De acordo com Levy (1992) e Goodis *et al.* (1993), o laser de Nd:YAG, em combinação com a instrumentação manual, é capaz de produzir um canal radicular mais limpo com ausência de magma dentinário. Em seu estudo, Levy utilizou 32 dentes divididos em dois grupos. Ambos os grupos foram instrumentados convencionalmente, sendo que o segundo grupo foi irradiado pelo laser pulsado de Nd:YAG, em energia de 150 mJ, através de uma fibra óptica de 200 µm, e na presença de refrigeração a água. Goodis *et al.* (1993) utilizaram o laser de Nd:YAG no modo de emissão pulsado (potências médias de 2 e 3 W, frequências de 20 e 30 Hz, respectivamente) e contínuo (5 e 10 W) por dez segundos. Após a instrumentação mecânica convencional, os dentes foram irradiados,

seccionados longitudinalmente e observados por microscopia eletrônica de varredura.

O efeito da irradiação do laser de Nd:YAG na superfície dentinária de ápices seccionados (1,0-3,0 W, 20 Hz, 10s) e na dentina intra-radicular (1-2,25 W, 20 Hz, 10-20s) foi observado por Lage-Marques (1995). Áreas de fusão e recristalização foram observadas (Lage-Marques, 1995; Lage-Marques *et al.*, 1995).

A profundidade de selamento produzida pelo laser de Nd:YAG em amostras de dentina seccionada foi avaliada por Liu *et al.* (1997). A profundidade de selamento foi de 4 µm, quando irradiadas na potência média de 30 mJ e 10 Hz de frequência, através de uma fibra óptica de 400µm.

Kimura *et al.* (1999) avaliaram a infiltração apical de corantes (rodamina) após a instrumentação e irrigação com NaOCl a 5,25% e peróxido de hidrogênio a 3%, seguidas da irradiação intracanal pelos lasers de Nd:YAG (2 W, 20 Hz, 200 mJ, por 2 segundos), argônio (0,3 W – emissão contínua – por 3 segundos) ou Er:YAG (50 mJ, 4 Hz, por 5 segundos, com refrigeração água/ar). A obturação foi realizada pela técnica de condensação lateral com guta-percha e cimento. Apenas o grupo irradiado pelo laser de Nd:YAG, em que se utilizou um corante prévio à irradiação, não apresentou infiltração em todas as amostras. Todos os lasers promoveram limpeza das paredes dos canais radiculares. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Gekelman *et al.* (2000), onde a irradiação do laser de Nd:YAG, no terço apical do canal

radicular, previamente à obturação, contribuiu para melhorar a qualidade do selamento apical.

O índice de infiltração por corantes na região apical, quando da irradiação do laser de Nd:YAG (100 mJ, 15 Hz) e Er:YAG (120 mJ, 10 Hz), também foi avaliado por Carvalho, em 1999, o qual constatou uma maior infiltração quando da irradiação do laser de érbio.

Uma das preocupações com relação à segurança durante a utilização de lasers é o aquecimento da superfície radicular irradiada, o que pode causar dano aos tecidos de suporte circunjacentes. Estudos avaliando mudanças morfológicas na região da constrição apical, assim como análises histológicas dos tecidos periapicais, foram apresentados por Koba *et al.* (1998). Cento e noventa e dois canais radiculares de cachorros (dentes anteriores e posteriores) foram instrumentados convencionalmente e irradiados pelo laser de Nd:YAG. Os autores mantiveram a fibra óptica do laser de Nd:YAG numa posição estacionária, 1 mm do forame apical (1W, 15 Hz por 2, 3 ou 4 segundos e 2 W, 15 Hz por 2 segundos). A infiltração de células inflamatórias foi observada em todos os grupos após duas semanas, incluindo o grupo-controle. A extensão da inflamação periapical, observada após o tratamento com o laser em 1 W por 2 segundos, se apresentou semelhante à do grupo -controle. Entretanto, os autores observaram a carbonização na parede dos canais radiculares irradiados em todos os grupos, com exceção do grupo irradiado em potência média de 1W por 2 segundos.

Em um segundo trabalho publicado em 1999, Koba *et al.* também avaliaram histologicamente os efeitos do laser de Nd:YAG pulsado na região apical de canais radiculares contaminados em cachorros, após duas, quatro e 8 semanas. Os parâmetros utilizados nesse estudo foram a potência média de 1 W, frequência de 30 Hz por 1 ou 2 segundos, e 2 W, 30 Hz por 2 segundos. Tinta preta foi pincelada no canal radicular com o auxílio de um cone de papel previamente à irradiação do laser de Nd:YAG. O grau de inflamação (em quatro e oito semanas) reportado no grupo irradiado pelo laser na potência média de 2W, 30 Hz de frequência (0,67 mJ/pulso) por dois segundos foi significativamente menor que no grupo-controle.

Uma técnica considerada ideal por Gutknecht *et al.* (1996a) é a irradiação da superfície apical em direção coronária de forma contínua e circular. Diferentes iniciadores (utilizados no intuito de aumentar a absorção da luz laser pelo tecido) em associação com o laser de Nd:YAG foram testados por Zhang *et al.* (1998). Tinta preta foi um efetivo iniciador para este laser, mas o canal radicular foi modificado de forma inconsistente, possivelmente como consequência da falta de uniformidade na distribuição do iniciador ou da irradiação laser dentro dos canais.

Sob microscopia eletrônica de varredura, Cecchini *et al.* (1998, 1999) observaram a dentina intracanal irradiada pelos lasers de Er:YAG (2,94 μm , 40 e 80 mJ, 10 Hz, de forma circular apico-cervical por 8-11 segundos) e Nd:YAG (1,064 μm , 60 e 100 mJ, 10 e 15 Hz, estacionária por 3s e ápico-cervical por 8-11 segundos). Diferentes níveis de limpeza, a remoção do

magma dentinário e as mudanças morfológicas foram obtidos de acordo com os níveis de energia e as taxas de repetição. O laser de Er:YAG a 80mJ, 10 Hz, foi o mais eficiente para a remoção de *debris*, produzindo uma superfície mais limpa, com um maior número de túbulos dentinários expostos, quando comparado aos outros tratamentos a laser e ao grupo-controle — ausência de tratamento com o laser. Uma diminuição dessa capacidade foi observada quando a energia utilizada por esse laser foi de 40mJ. A dentina das amostras irradiadas pelo laser de Nd:YAG apresentou fusão e recristalização, assim como remoção do magma dentinário. As paredes do canal radicular irradiadas pelo laser de Er:YAG apresentaram-se livres de *debris*, do magma dentinário e bem como apresentaram túbulos dentinários abertos, como relatado recentemente por Takeda *et al.* (1998a,b). Áreas cobertas por *debris* residual foram observadas onde a luz laser não contactou a superfície do canal radicular. A avaliação pela MEV demonstrou, nesse estudo, diferentes padrões de modificação como resultado dos diferentes mecanismos de interação por estes dois comprimentos de onda. Os mesmos autores avaliaram o aumento de temperatura produzido por esses lasers na superfície radicular. Os lasers de Er:YAG e Nd:YAG, quando irradiados experimentalmente em movimentos circulares a 2 mm/s, produziram aumentos de temperatura na superfície radicular de 5 °C. A irradiação estacionária com o laser de Nd:YAG a 1 mm do forame apical produziu temperaturas acima de 5 °C, mas, abaixo de 10°C, somente para os grupos em que a energia laser foi de 100 mJ para 10 ou 15Hz.

A eficácia da irradiação com o laser de argônio na remoção de *debris* do sistema de canais radiculares foi avaliada por Moshonov *et al.*, em 1995b. Uma fibra óptica de 300 μ m foi inserida dentro do canal radicular de dentes unirradiculares até o seu comprimento de trabalho, após a limpeza e a modelagem convencionais. O laser foi ativado enquanto a fibra era removida a partir do ápice até o orifício radicular (2 W, 15 Hz, por 5 segundos, largura de pulso de 100 ms). As análises em MEV revelaram que a quantidade de *debris* foi significativamente menor do que a apresentada pelo grupo-controle.

Uma das limitações no tratamento com laser foi demonstrada por Harashima *et al.* (1998), em que a fibra óptica do laser (argônio) não contatou as paredes do canal; áreas limpas na superfície do canal radicular se apresentaram intercaladas com áreas cobertas por *debris* residual. O acesso a áreas com curvas severas e o custo do equipamento são outros fatores limitantes (Kimura *et al.*, 2000).

Em um estudo realizado por Takeda *et al.* (1998a), 36 canais radiculares foram instrumentados convencionalmente e foram divididos em dois grupos. Um dos grupos foi irradiado pelo laser de Er:YAG na potência média de 1 W, energia de 100 mJ/pulso e frequência de 10 Hz por 3 e 5 segundos. As paredes do canal radicular irradiadas pelo laser de Er:YAG apresentaram-se livres de *debris* e esfregaço dentinário, bem como os túbulos dentinários mostraram-se abertos. Uma maior limpeza dos canais radiculares foi observada também por Frentzen *et al.*, em 2000, após a irradiação com o laser de Er:YAG (50 mJ/ 2 Hz, em quatro ciclos), e por

Kesler *et al.* (2000), após a irradiação intracanal pelo laser de Er:YAG na energia de 500 mJ e frequência de 10 Hz. Matsuoka *et al.* (2000), utilizando energias de 136 a 230 mJ com o laser de Er:YAG, demonstrou a produção de áreas limpas, mas irregulares. Uma maior limpeza foi observada com energias de irradiação maiores.

Comprimentos de onda emitidos na porção do visível do espectro eletromagnético parecem ser promissores em endodontia. O laser de ArF excimer (193 nm) apresenta-se adequado para a remoção seletiva de *debris* necróticos do canal radicular, deixando para trás paredes dentinárias lisas, sem rachaduras e fissuras (Wilder-Smith, 1993, comunicação pessoal). Em um estudo realizado por Stabholz *et al.* (1993b), o laser de XeCl (308 nm) foi irradiado em amostras de dentina seccionada em densidades de energia de 0,5 a 7,0 J/cm², 25 Hz de frequência, por 4 segundos). Em parâmetros até 1J/cm² de densidade de energia, o laser de excimer foi capaz de fundir e fechar os túbulos dentinários, enquanto acima de 4J/cm² a exposição de túbulos dentinários foi observada.

O laser de alexandrita (377 nm – UV), em desenvolvimento na Alemanha, tem mostrado ser capaz de remover seletivamente cálculos e cáries dentais. Esse laser parece ser promissor em redução bacteriana (Hennig *et al.*, 1998), e para possíveis aplicações futuras em periodontia e endodontia.

2.5.1 Redução bacteriana intracanal pela luz laser

O principal objetivo para a utilização da irradiação laser intracanal é a redução bacteriana usualmente obtida pelo aumento de temperatura. A remoção de *debris* pela irradiação laser também deve resultar em uma menor quantidade de bactérias dentro do canal radicular.

White *et al.* (1991) reportaram uma redução bacteriana nas superfícies dentinárias seccionadas contaminadas com 10 µL de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *B. stearothermophilus* após a irradiação com o laser de Nd:YAG. Os parâmetros de irradiação utilizados foram 0,3; 0,5; 1,5; ou 3,0 W de potência média, com tempo de exposição de 20 segundos e 2 minutos. Após a irradiação os espécimes foram transferidos para um meio de transporte e submetidos ao procedimento microbiológico de cultura e contagem de colônias u.f.c. Quando irradiados com potência média de 0,5W por 2 minutos, houve uma redução do número de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, enquanto *B. stearothermophilus* se apresentou mais resistente à irradiação da luz laser. Após 20 segundos houve apenas uma limitada redução bacteriana.

Tseng *et al.* (1991) obtiveram um efeito bacteriano em placas dentais sobre a superfície radicular pela irradiação com o laser de Nd:YAG. Dentes recém-extraídos foram divididos em dois grupos: no primeiro, a área testada foi limpa mecanicamente, e no segundo grupo a área foi irradiada com uma fibra óptica em não-contato em potências médias de 0,7-0,5 W, por 1 minuto, e com a fibra óptica em contato a 1,75 W, 20 Hertz por 30 segundos. Os espécimes foram observados por microscopia eletrônica de varredura. Bactérias isoladas foram observadas na superfície irradiada pelo

laser de Nd:YAG na potência média de 0,7 W. Poucas bactérias foram observadas quando tratadas com a potência média de 1,5 W e a 1,75W nenhuma bactéria foi observada. Um grande número de bactérias estavam presentes nas superfícies limpas mecanicamente.

Goodis *et al.* (1993) mostraram que o mesmo laser é capaz de remover o magma dentinário e poderia ocasionalmente alterar as paredes dentinárias radiculares.

Em 1994, Hardee *et al.* estudaram o efeito do laser de Nd:YAG em canais radiculares contaminados. Cinquenta canais de dentes unirradiculares extraídos foram preparados, esterilizados e então inoculados com esporos do *Bacillus stearothermophilus*. Os espécimes foram tratados somente com o laser de Nd:YAG, apenas com o hipoclorito de sódio (0,5%) ou a combinação de ambos os tratamentos. Após os procedimentos de tratamento os canais radiculares foram lavados com água destilada para recuperação dos esporos, em seguida procedeu-se à diluição seriada e eles foram incubados em ágar sangue, tendo sido determinado o número de unidade formadoras de colônias (u.f.c.). Os parâmetros laser foram: 3 W, 20Hz (180-360 J), com movimentos circulares partir do orifício ao ápice e deste de volta ao orifício, por 1-2 minutos, em canais molhados. A análise dos resultados revelou uma redução de u.f.c. entre os grupos tratados, mas não houve diferença significativa entre eles. A desinfecção completa não foi atingida em nenhum dos grupos. Não foi possível, entretanto, concluir que a utilização do laser nessas condições, sozinho ou associado a 0,5% NaOCl, foi mais efetiva que somente a 0,5% NaOCl na redução bacteriana.

Um estudo similar foi conduzido por Fegan & Steiman, em 1995. Os autores utilizaram os mesmos parâmetros laser, assim como a associação com hipoclorito de sódio (neste estudo a concentração foi de 5,25%). Os grupos incluíram instrumentação manual, instrumentação com ultra-som e tratamento com laser. Os tratamentos foram realizados, em sua totalidade, na presença de água destilada ou hipoclorito de sódio. Todos os grupos tratados com hipoclorito de sódio efetivamente inibiram o crescimento do bacilo, enquanto com a instrumentação manual e com o ultra-som e água destilada não se observou desinfecção efetiva dos canais radiculares. Embora o laser de Nd:YAG tenha sido efetivo na inibição do crescimento do *Babillus stearothermophilus*, os autores não levaram em conta a fraca absorção do laser de Nd:YAG por água ou hipoclorito de sódio. A presença de soluções no canal radicular pode ter afetado a interação da luz laser com a superfície dentinária, diminuindo sua capacidade de eliminação bacteriana.

Moshonov *et al.*, em 1995a, em estudo *in vitro*, avaliaram a redução bacteriana do laser de Nd:YAG. Setenta e cinco dentes foram instrumentados convencionalmente, esterilizados, selados em sua região apical com cera e contaminados com o microrganismo *E. faecalis*. Os espécimes foram divididos em seis grupos: grupo 1 – não-contaminados; grupo 2 – espécimes contaminados; grupo 3 – contaminados e irradiados pelo laser de Nd:YAG (4,5 W por dois ciclos de 15 segundos na região apical e 15 segundos na região coronária, num tempo de irradiação total de 1 minuto); grupo 4 – contaminados e irradiados pelo laser de Nd:YAG (com

a utilização de um corante de nigrosin a 1%); 5 – contaminados e irradiados pelo laser de Nd:YAG (com a utilização de um corante de nigrosin a 1% e spray de água /ar); grupo 6 – contaminados e tratados com a solução de hipoclorito de sódio a 1%. Os autores relataram redução significativa do número de bactérias pelo laser de Nd:YAG, enquanto o grupo tratado com hipoclorito de sódio apresentou a completa eliminação desse microrganismo. A análise pela MEV mostrou que o laser foi capaz de limpar parcialmente as paredes dos canais radiculares.

Rooney *et al.* (1994) investigaram o efeito bactericida do laser de Nd:YAG utilizando um modelo de laboratório. No experimento, os autores utilizaram capilares de vidro com um diâmetro de 1,13 mm e 20 mm de comprimento. Os modelos foram inoculados com uma suspensão de *E. faecalis* e divididos em dois grupos. O primeiro foi irradiado com o laser de Nd:YAG com potência média de 0,3 a 3 W, por 20 a 60 segundos (energia total de 9 a 75 J); no segundo grupo utilizou-se um corante (*Suomi ink*) e a irradiação da luz laser a 0,3-3 W por 10 a 30 segundos (6 a 37,5 J). Os resultados mostraram, no primeiro grupo, que em energias totais inferiores a 30 J houve apenas um reduzido efeito bactericida. Acima deste valor, houve um gradual decréscimo do número de bactérias conforme a energia total foi elevada. Em dois espécimes irradiados com energias totais de 60 J e 75 J, não houve crescimento bacteriano em cultura. O grupo que recebeu corante apresentou um efeito bactericida maior do que o primeiro grupo, quando comparados com os mesmos parâmetros de irradiação. Sob energias totais de irradiação de 25 J e 37,5 J, não houve crescimento

bacteriano em cultura. Os resultados foram relatados em “*log kill*”, que é a taxa de eliminação microbiana baseada na u.f.c. do grupo-controle, dividido pelo u.f.c. do grupo irradiado. Para uma melhor comparação, esses dados são transformados em logaritmo decimal, de forma a se obter uma curva logarítmica de redução bacteriana. Mas embora os autores tenham demonstrado o efeito bactericida do laser de Nd:YAG e sua relação com a quantidade de energia empregada, a interação entre a energia laser e a dentina do canal radicular foi ignorada.

Em um estudo *in vitro*, Gutknecht *et al.* (1996b) examinaram o efeito bactericida do laser pulsado de Nd:YAG a 1,5 W, 100 mJ, 15 Hz, por quatro períodos de 10 segundos, em 40 canais radiculares preparados *in vitro*. Uma fibra óptica de 300 µm foi utilizada para os dentes anteriores, e uma com 200 µm para os dentes posteriores. Nesse estudo o procedimento com o laser apresentou uma média de 99,91% de sucesso na eliminação de *E. faecalis*.

Em um estudo *in vivo* realizado por Moritz *et al.* (1997a), o laser de Nd:YAG foi utilizado com os mesmos parâmetros acima. Foram realizados exames microbiológicos em 30 canais radiculares que apresentavam radiograficamente uma área radiolúcida periapical, para avaliar a presença de estreptococos e estafilococos antes e após quatro e oito dias do tratamento com o laser de Nd:YAG. A fibra óptica de quartzo de 300 µm foi utilizada em movimentos helicoidais da região apical à cervical, em cinco ciclos de irradiação de 10 segundos, com 20 segundos de intervalo. A redução bacteriana acentuada foi observada em todos os casos após a

primeira irradiação. Dezenove canais radiculares mostraram um mínimo crescimento de estreptococos, e dez canais radiculares apresentaram um mínimo crescimento de estafilococos.

O efeito antibacteriano da irradiação com o laser de Nd:YAG em profundidade na dentina do canal radicular foi avaliado por Klinker *et al.* (1997). Após a esterilização, secções longitudinais de dentina com diferentes espessuras (100-1000 µm) foram inoculadas em um dos lados com 4 mL de uma suspensão de *Streptococcus mutans*. O lado oposto das secções dentinárias foi irradiado em quatro repetições de 10-20 segundos (de acordo com a área da amostra), utilizando-se o laser de Nd:YAG a 1,5W, 15 Hz, com uma fibra óptica de 200 µm em uma angulação de cerca de 5°. As bactérias remanescentes foram removidas da dentina por meio de vibração e foram colocadas em placas de Petri com meio seletivo para *Streptococcus mutans*. Quando comparadas com secções dentinárias não tratadas, a contagem u.f.c. revelou uma significativa eliminação de bactérias para todas as espessuras dentinárias após a irradiação laser, embora a intensidade da irradiação laser tenha decrescido após a penetração em 1.000 µm de dentina.

Em estudo realizado por Aun *et al.* (1999), canais instrumentados e inoculados com *Streptococcus sanguis* foram irradiados pelo laser de Nd:YAG em energia de 100 mJ, potência média de 1,5 W e taxa de repetição de 15 Hz. Os tempos de irradiação foram de 10, 20 e 30 segundos, sendo que a maior redução bacteriana foi observada com maior

tempo de irradiação. Todos os grupos experimentais apresentaram crescimento bacteriano.

Entretanto, em um experimento realizado por Berkiten *et al.* (2000) obteve-se uma redução de 86,3% das colônias formadas de *S. sanguis* (inoculado em canais radiculares *in vitro*) quando da irradiação pelo laser de Nd:YAG com potência média de 1,8 W e 30 HZ, e de 98,5% em potência média de 2,4 W. Outro organismo testado foi *Prevotella intermedia*, o qual apresentou uma completa redução microbiana em ambos os parâmetros de irradiação.

A eficácia da desinfecção do canal radicular *in vitro* pelo laser de hólmio:YAG foi investigada por Gutknecht *et al.* (1997) que relataram bons resultados na redução bacteriana. Sessenta canais radiculares foram preparados convencionalmente, esterilizados e divididos em seis grupos, contendo cinco canais de dentes posteriores e cinco canais de dentes anteriores. Os canais foram inoculados com 10^9 bactérias/mL de *Enterococcus faecalis* e irradiados com o laser de Ho:YAG, emitindo no comprimento de onda de 2,1 μm (duração de pulso de 200 μs) através de uma fibra óptica de 320 μm . A fibra óptica foi introduzida até a região apical e a luz laser irradiada com potências médias de 0,5 a 4 W e taxa de repetição de 5 a 10 Hz, e movida em direção cervical em quatro ciclos de movimentos circulares, em um total de 30 segundos. Quatro outros grupos que receberam a suspensão de *E. faecalis*, e não foram tratados serviram de controle, contendo cada um quatro amostras. Uma redução bacteriana média da ordem de 99,98% foi obtida no grupo irradiado na potência média

de 2 W e 5 Hz de frequência. Nos grupos em que se empregou 1 W, 5 Hz e 1,5 W, 5 Hz, obteve-se 99,61% e 99,82% de redução bacteriana, respectivamente. Os grupos irradiados pela luz laser nas potências médias de 1 W; 1,5 W e 2 W, na frequência de 10 Hz, apresentaram 98,65%, 98,65% e 99,78% de redução bacteriana média, respectivamente.

Um experimento foi realizado por Gouw-Soares (2000) no intuito de avaliar a redução bacteriana em profundidade pelo laser de Ho:YAG. Cento e oitenta secções dentinárias de 100 µm, 300 µm e 500 µm de espessura foram inoculadas com *E. faecalis* e irradiadas em potência média de 1 W e frequências de 5 e 10 Hz, e em potências médias de 1,5 e 2 W a 5 Hz. Um grupo-controle não foi tratado, e um segundo grupo recebeu hipoclorito de sódio (0,9%) e peróxido de hidrogênio. Os grupos tratados pelo laser de Ho:YAG apresentaram uma maior redução bacteriana com valores máximos de 98,46% e mínimos de 83,65%.

A redução bacteriana por meio da irradiação do laser de diodo, emitindo a 810 nm, foi analisada por Moritz *et al.* (1997b). Após instrumentação convencional, 44 dentes extraídos foram autoclavados, receberam as suspensões de *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*, foram selados com Cavit e incubados por 48 horas a 37° C. O laser de diodo foi utilizado no modo de emissão pulsado em potências médias de 2W, 3 W e 4 W, e frequências de 10 e 20 milissegundos, em movimentos circulares num total de 25 segundos (cinco ciclos de cinco segundos cada). Os dentes foram incubados por 28 dias. Análises microbiológicas revelaram a completa eliminação bacteriana somente no grupo irradiado com 4 W de

potência média. A espectometria infravermelha realizada no mesmo estudo revelou um aumento de apenas 6° C na superfície radicular externa após a irradiação nesse parâmetro. Foram observadas fusão e recristalização na superfície dentinária em análise por microscopia eletrônica de varredura.

Moritz *et al.* (1997c) realizaram um estudo *in vivo* comparando a redução bacteriana promovida pelo laser de diodo e a obtida pelo tratamento endodôntico convencional. Dentes unirradiculares com polpas necróticas e com áreas radiolúcidas periapicais foram selecionados para o estudo. Esses dentes receberam instrumentação endodôntica mediante o uso de limas e irrigação com soro fisiológico. Após o preparo, utilizou-se um cone de papel para coleta do material para exame microbiológico. Para a irradiação intracanal com o laser de diodo (comprimento de onda de 818nm e 20 ms de largura de pulso) utilizou-se a potência média de 2 W e frequência de 50 Hz e uma fibra óptica de 400 µm de diâmetro, em cinco ciclos de 5 segundos cada. Os dentes foram selados, e após quatro dias novo exame microbiológico foi realizado. Após a coleta das amostras, uma segunda irradiação intracanal foi realizada, os dentes foram selados e o mesmo procedimento repetido em uma terceira sessão (após oito dias). No grupo-controle (dez pacientes), os dentes receberam a irrigação com peróxido de hidrogênio em vez de soro fisiológico. No primeiro exame microbiológico foram observados estreptococos em 40 dos dentes, e estafilococos em cinco amostras. Após a primeira irradiação do laser de diodo, observou-se o crescimento do microrganismo estreptococos em apenas sete canais, e em três canais para o microrganismo estafilococos.

Segundo os autores, quando comparado à técnica convencional, o laser de diodo é capaz de contribuir na desinfecção intracanal.

De acordo com Hibst *et al.* (1997), a utilização da luz laser com alta absorção, como a do laser de érbio, tende a localizar o aquecimento a uma fina camada da superfície da amostra. Minimizando a profundidade de absorção, há uma significativa redução do risco de dano térmico sub-superficial, desde que menos energia seja necessária para aquecer a superfície.

Mehl *et al.*, em 1999, avaliaram *in vitro* o efeito deste laser na redução bacteriana intracanal. Noventa dentes unirradiculares foram instrumentados, selados apicalmente e esterilizados. As suspensões de *Staphilococcus aureus* e *Escherichia coli* foram inoculadas em 40 dentes cada. Após duas horas, os canais foram irradiados pelo laser de Er:YAG na energia de 50 mJ, frequência de 15 Hz, por 15 ou 60 segundos. Dez dentes de cada grupo receberam a irrigação com hipoclorito de sódio a 1,25% por 2 minutos em vez de irradiação com o laser. Melhores resultados foram obtidos com a irrigação de NaOCl, seguida da irradiação da luz laser de Er:YAG por 60 segundos e, então, por 15 segundos.

Os mesmos parâmetros de irradiação (50 mJ, 15 Hz) com o laser de Er:YAG foram utilizados por Stephan *et al.* (1999). Os autores utilizaram uma fibra óptica de 320 µm com uma velocidade de rotaçãoápico-coronária dentro do canal radicular de 0,5 mm/s. Os espécimes foram divididos em sete grupos. Dois grupos receberam três ciclos de irradiação, sendo que num grupo o canal foi hidratado durante os intervalos; dois grupos

receberam seis ciclos de irradiação, sendo também um dos grupos hidratado; dois grupos-controle (positivo e negativo), e um grupo recebeu irrigação com hipoclorito de sódio. O crescimento bacteriano foi somente observado no grupo irradiado por três ciclos com o laser de Er:YAG, sem hidratação durante os intervalos. Em análise por MEV, efeitos térmicos foram observados na superfície dentinária nos grupos irradiados sem hidratação.

Moritz *et al.* (1999) analisaram *in vitro* o efeito dos lasers de Nd:YAG, Ho:YAG e Er:YAG em canais radiculares contaminados. Quarenta dentes instrumentados receberam a suspensão de *Escherichia coli* e *E. faecalis*, e foram divididos em seis grupos de cinco dentes, e um grupo-controle de dez dentes. Os canais foram irradiados nos mesmos parâmetros para os três tipos de laser: potências médias de 0,8 e 1,5 W e frequência de 10 Hz para ambas. O tempo de exposição foi de cinco ciclos de 5s cada, com um intervalo de 20s entre eles. Todos os lasers testados foram capazes de reduzir substancialmente a população bacteriana, com apenas mínimas diferenças em sua capacidade bactericida. No parâmetro de 1,5 W, 10 Hz, para o laser de Er:YAG, obtiveram-se os melhores resultados quanto à redução microbiana (99,64%), seguidos do laser de Nd:YAG (99,16%) e do laser de Ho:YAG (99,05%).

Gutknecht *et al.* (2000a) avaliaram o efeito antibacteriano do laser de Er:YAG durante a irradiação intracanal *in vitro*, de canais inoculados com uma suspensão de *E. faecalis*. Os parâmetros de irradiação foram de potência média de 50 mJ, frequência de 15 Hz, em quatro repetições de 10

segundos cada. Uma média de redução bacteriana de 98,8% foi obtida em canais radiculares irradiados. Em uma segunda etapa do experimento, secções dentinárias (de 100 µm, 300 µm e 500 µm) foram contaminadas com *E. faecalis* e irradiadas com o mesmo laser nos mesmos parâmetros. Uma redução bacteriana de 97,7% foi obtida pelas secções dentinárias de 100 µm e de 54% através de 500 µm. O mesmo experimento foi realizado com o laser de diodo (810 nm, 0,6 W, emissão contínua, com fibra óptica de 400 µm). Uma redução bacteriana na ordem de 74% foi obtida nas secções dentinárias de 500 µm (Gutknecht *et al.*, 2000b).

A redução microbiana pode ser obtida pelo aumento de temperatura, porém se a elevação térmica for igual ou superior a 10° C, podem ocorrer danos aos tecidos perirradiculares (Eriksson & Albrektsson, 1983). Recentemente, Cohen *et al.* (1996) conjecturaram que se o aumento de temperatura na superfície radicular for de 5° C ou abaixo deste valor, a probabilidade de dano ao ligamento periodontal, aos cementoblastos ou ao tecido ósseo alveolar é minimizada.

Efeitos térmicos e propriedades antimicrobianas do laser de Nd:YAG foram estudados por Ramskold *et al.* (1997), a fim de determinar níveis de energia seguros para o uso clínico e necessários para a desinfecção dos canais radiculares. Os resultados indicaram que ciclos de irradiação laser de 3 J/s por 15 segundos, seguidos de intervalos de 15 segundos, podem ser empregados continuamente por longos períodos sem risco de dano térmico aos tecidos circunvizinhos. Entretanto, durante o experimento, os dentes foram mantidos nas mãos do operador, o que não é capaz de

reproduzir condições *in vivo*. A melhor desinfecção foi obtida após quatro ciclos de irradiação (3 W, 50 Hz, 60 mJ, 15 segundos – cada ciclo).

Bachman *et al.*, em 2000, avaliaram a elevação térmica promovidas pelo laser de Nd:YAG na superfície externa de 32 dentes caninos. Energia de 100 mJ e frequências de 10 e 15 Hz foram utilizadas com uma fibra óptica de 300 µm estacionária por três segundos, seguida de movimentos circulares (quatro ciclos). Elevações térmicas na ordem de 3,2° C e 4,3° C foram obtidas para as frequências de 10 Hz e 15 Hz, respectivamente. Outro estudo foi realizado por Lee *et al.*, em 2000, em que os autores avaliaram o aumento de temperatura externa promovido em cilindros de dentes bovinos quando da irradiação do laser de Er:YAG (energias de 5 e 10 mJ com ou sem refrigeração água/ar). Uma menor elevação térmica foi obtida quando da utilização do spray de água.

Em resumo, a habilidade de certos lasers para a remoção de materiais orgânicos necróticos e remanescentes teciduais e para a redução microbiana parece ser altamente promissora em endodontia. Uma razão significativa para a utilização da irradiação laser intracanal é a redução bacteriana, usualmente atingida devido ao aumento de temperatura. Diversos estudos têm avaliado a efetividade dos lasers na desinfecção do canal radicular e estes reportam significativa redução *in vitro* do número de bactérias (Gutknecht *et al.*, 1996b; Klinke *et al.*, 1997), como já citado. Dessa forma, o desempenho desses equipamentos, com relação à segurança e à efetividade do comprimento de onda, dos níveis de energia e de sua relação com o aumento de temperatura, mudanças morfológicas e

redução microbiana, deve ser bem documentado para que eles possam ser utilizados no tratamento clínico.

É importante compreender que diferentes tipos de laser têm diferentes efeitos no mesmo tecido, e o mesmo laser irá interagir de forma diferente na dependência do tipo de tecido em questão (Apêndices 1 e 2). Precauções com relação à segurança durante a irradiação laser incluem o uso de óculos de segurança específicos para cada comprimento de onda (com filtro de densidade óptica compatível), colocação de avisos e utilização de bomba a vácuo próximo à área tratada – utilizada, por exemplo, em procedimentos em tecidos moles e preparos cavitários (Institute for Advanced Dental Technologies, 2000).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo da presente investigação foi estudar o efeito da irradiação laser intracanal na desinfecção dos túbulos dentinários, utilizando um modelo *in vitro*. Os grupos irradiados pelos vários lasers foram comparados ao tratamento com hidróxido de cálcio, utilizado como medicação intracanal entre consultas.

Em uma segunda etapa buscou-se determinar, por intermédio de espectroscopia, a absorção pelo microrganismo *E. faecalis*, nos comprimentos de onda do ultravioleta (200 nm) ao infravermelho próximo (3.000 nm).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação dos corpos de prova

Dentes bovinos, recém-extraídos, foram utilizados no experimento. Uma técnica modificada, a partir da técnica descrita por Haapasalo & Ørstavik (1987), foi utilizada para o preparo dos corpos de prova (Figuras 4.1 e 4.2). Os dentes foram mantidos em 0,5% NaOCl para a desinfecção de superfície. Dois terços de cada coroa foram removidos com um disco rotatório diamantado de 22 mm a 5.000 rpm sob refrigeração a água. A porção restante da raiz foi colocada em um torno, e uma peça cônica foi colocada na extremidade oposta para estabilizar o espécime. O torno foi movido a 1.500 rpm, e uma broca carbide foi cuidadosamente movida através do corpo de prova em rotação, até que todo o cimento fosse removido e o diâmetro externo atingisse a espessura de 6 mm. A peça cônica foi removida, e uma broca de 2 mm de diâmetro foi utilizada para alargar o canal do corpo de prova. A porção apical foi cortada de modo a obter o comprimento de 12 mm, finalizando a preparação mecânica do corpo de prova (Figuras 4.3 e 4.4).

FIGURA 4.1 - Preparado dos corpos de prova. (A) Remoção da coroa por um disco rotatório diamantado sob refrigeração a água; (B) porção restante da raiz colocada em um torno

FIGURA 4.2 - Preparado dos corpos de prova. (A) Remoção do cimento e da dentina até a obtenção de um diâmetro externo de 6 mm; (B) broca de 2 mm de diâmetro utilizada para alargar o canal; (C) corte da porção apical para obter o comprimento de 12 mm

Os corpos de prova foram estocados em água destilada para evitar a desidratação. O magma dentinário foi removido colocando-os em banho em ultra-som com EDTA, a 17% por 4 minutos, seguido de NaOCl a 5,25% (4 min).

FIGURA 4.3 - Aparência e dimensões do corpo de prova preparado

Os corpos de prova foram esterilizados imersos em água destilada, em autoclave por 40 min a 121° C. Eles foram transferidos para um caldo tripticase de soja (TSB - *Tryptic Soy Broth* - Difco, Laboratories, Detroit, MI) e incubados por 24 horas à 37 °C, como teste de esterilidade.

Enterococcus faecalis, contendo um plasmídeo (genes) que codifica a propriedade de resistência do *E. faecalis* ao cloranfenicol, foi utilizado como organismo teste. *E. faecalis* (ATCC4082) foi incubado a 37° C em caldo de tripticase de soja suplementado com 20 µg/mL de cloranfenicol. A densidade da suspensão foi checada por espectroscopia (Spectrophotometer

Figura 4.4 – Corpo de prova preparado. (A) Vista superior; (B) vista lateral; (C) vista angulada

Bechman DU650), de forma a se estabelecer a quantidade em μL da suspensão, correspondente a 10^7 *E. faecalis*, que deveria ser inoculada em cada corpo de prova.

No intuito de promover a colonização bacteriana, os corpos de prova foram mantidos em frascos individuais contendo 20 mL de caldo de tripticase de soja com 10^7 *E. faecalis*, 20 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol, e incubados a 37° C. As condições experimentais não foram estritamente anaeróbias, mas o procedimento limitou a quantidade de ar dentro dos frascos (Figura 4.5 A).

A utilização de *E. faecalis* resistente ao cloranfenicol permitiu o crescimento exclusivo destes cocos Gram-positivos. A pureza do *E. faecalis* foi bioquimicamente comprovada pelo cultivo em meio bile esculina (Difco laboratories, Detroit, MI, EUA) (Figura 4.5 B) e coloração Gram. O meio bile esculina muda de cor ou seja, para negro, quando em contato com os cocos Gram-positivos *E. faecalis*. A penetração bacteriana nos túbulos dentinários dos corpos de prova foi confirmada por exame histológico (microscopia óptica – Figuras 4.6 e 4.7).

4.2 Procedimento experimental

Os corpos de prova foram expostos ao *E. faecalis* por duas semanas (de acordo com Haapsalo & Ørstavik, 1987) previamente ao procedimento experimental. O caldo de tripticase de soja foi renovado a cada dois dias.

FIGURA 4.5 - (A) Corpos de prova mantidos em frascos com 20 mL de caldo de tripticase de soja, 10^7 *E. faecalis* e 20 μ g/mL de cloranfenicol; (B) cultivo em meio bile esculina

FIGURA 4.6 - Microscopia óptica mostrando os túbulos dentinários do espécime colonizado por *E. faecalis* (100X); coloração Hematoxilina & Eosina

FIGURA 4.7 - Microscopia óptica mostrando os túbulos dentinários do espécime não exposto a *E. faecalis* (CN1) (40X); coloração Hematoxilina & Eosina

Em preparação para o procedimento, os corpos de prova foram lavados duas vezes em água destilada estéril, e a superfície externa foi coberta com esmalte de unha.

De modo a estimar a quantidade de bactéria introduzida em cada corpo de prova, três de cada grupo foram colocados em novo caldo de tripticase de soja, suplementado com 20 µg/mL de cloranfenicol no momento do experimento. Estes corpos de prova foram então incubados por 24 horas a 37°C. O número de bactérias foi estimado pela contagem de unidades formadoras de colônias (u.f.c.) utilizando-se ágar tripticase de soja após a diluição. Essa diluição, 10 µL do caldo de tripticase de soja, em que se incluía a amostra após o tratamento, foi transferida para um *ependorf* com 990 µL de caldo de tripticase de soja, o que corresponde a uma diluição de 1:100 (10^{-2}). Dessa suspensão 100 µL foram transferidos para 900 µL de caldo de tripticase de soja (diluição 1:10, ou seja, 10^{-1}). Essa diluição foi feita novamente, obtendo-se uma diluição da ordem de 10^{-4} . Dessa última suspensão, 100 µL foram transferidos para ágar de tripticase de soja. Um total de três placas de Petri foi inoculado com 100 µL para cada corpo de prova e incubado por 24 horas a 37°C.

O número de unidades formadoras de colônias corresponde a quantidade encontrada em 100 µL; em 20 mL este número deve ser multiplicado por 2×10^2 . Para se obter o número contido na suspensão inicial, este último número deve ser multiplicado pelo respectivo fator de

diluição. A média obtida a partir destes corpos de prova foi utilizada para estimar o número de bactérias presentes em todos os corpos de prova.

Os corpos de prova restantes foram divididos em cinco grupos de tratamento e três grupos-controle. O grupo 1 foi irradiado pelo laser pulsado de Ho:YAG laser (largura de pulso - 100 μ s), emitindo em 2,1 μ m (Sunrise Technologies, Fremont, CA); o grupo 2 pelo laser pulsado de Nd:YAG (150 μ s), comprimento de onda de 1,06 μ m (Sunrise Technologies, Fremont, CA), e os grupos 3 e 4 pelo laser pulsado de Er:YAG (250 μ s) emitindo em 2,94 μ m (Continuum Biomedical, Santa Clara, CA) (Figura 4.8). O grupo 5 recebeu o curativo intracanal convencional, consistindo de hidróxido de cálcio (Pulpdent®) por sete dias.

Como controle: três corpos de prova para cada grupo tratado receberam água destilada estéril em vez da suspensão de *E. faecalis* (controle negativo – CN1; n = 15); três receberam iodo em solução de iodeto de potássio (KI₃) após a exposição bacteriana (controle negativo – CN2; n=15); e três não receberam tratamento após a exposição bacteriana (controle positivo – CP1; n = 15) (Tabelas 4.1 e 4.2).

A luz laser foi conduzida por uma fibra óptica de quartzo de 375 μ m de diâmetro para o laser de Er:YAG laser (15 mm de comprimento; fabricada pela Continuum Biomedical para este experimento), e de 300 μ m para os lasers de Nd:YAG e Ho:YAG (Figura 4.9).

Diferentes parâmetros de irradiação foram testados. Os grupos irradiados pelos lasers de Nd:YAG e Er: YAG receberam três diferentes

FIGURA 4.8 - (A) Laser pulsado de Ho:YAG a $2,1\ \mu\text{m}$; (B) laser pulsado de Nd:YAG a $1,06\ \mu\text{m}$; (C) laser pulsado de Er:YAG a $2,94\ \mu\text{m}$

FIGURA 4.9 - (A) Fibra óptica de quartzo (300 μm) para os lasers de Nd:YAG e Ho:YAG; (B) fibra óptica de quartzo (15mm de comprimento e 375 μm) para o laser de Er:YAG

TABELA 4.1 – Grupos-controle (três corpos de prova para cada grupo)

Grupo-controle	Condições Experimentais	Número de Amostras (n)
CN1 <u>Controle negativo</u>	Não exposto à bactérias; sem tratamento (água estéril)	15
CP1 <u>Controle positivo</u>	Exposição à bactérias; sem tratamento	15
CN2 <u>Controle negativo</u>	Exposição à bactérias; tratamento com KI ₃	15
<u>TOTAL</u>		45

parâmetros para irradiação (energia e frequência): energia abaixo do limiar de modificação física (*physical modification threshold* - 140 PMT) por 60 segundos, no limiar de modificação física (PMT) por 60 segundos, e acima do limiar de modificação física (dobrando o tempo de exposição — 120 segundos). Devido à limitação do aparelho de laser de Ho:YAG, este grupo recebeu a irradiação laser com energia abaixo do limiar de modificação

física (do PMT), por 60 segundos, e com os mesmos parâmetros durante 120 segundos (atingindo o limiar de modificação física) — Tabela 4.2.

A energia disponibilizada pela fibra óptica foi confirmada por um detetor óptico (Molelectron, Medford, OR).

Os canais foram secos com cone de papel absorvente antes do tratamento. Apenas um grupo (Er:YAG laser) foi sujeito a refrigeração com ar e água. Os espécimes foram irradiados por uma fibra óptica introduzida dentro dos canais simulados produzidos nos corpos de prova, e toda a superfície do canal radicular foi irradiada sob velocidade constante.

Os corpos de prova que receberam hidróxido de cálcio como tratamento (grupo 5) foram lavados duas vezes com água destilada e cobertos com esmalte de unha. Os canais foram então secos com cones de papel absorvente e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (Pulpdent®). Os corpos de prova medicados foram mantidos em condições de umidade relativa a 37° C e dentro de frascos fechados. Após sete dias, foram lavados com 5 mL de água destilada.

Após o tratamento, todos os corpos de prova (de todos os grupos) foram incubados em novo caldo de tripticase de soja, suplementado com 20 g/mL de cloranfenicol por 24 horas à 37° C. O número de bactérias remanescentes após o tratamento foi estimado como já descrito.

A eficácia dos vários regimes foi comparada utilizando-se o teste estatístico U de Mann-Whitney.

TABELA 4.2 - Grupos experimentais e número de corpos de prova

Grupo		Parâmetros		Tempo	Número de Amostras (n)
Ho:YAG (G1) Sem ar/água	G1A	P MT	50 mJ, 10Hz, 33 J/cm ²	60 s	10
	G1B	PMT	50 mJ, 10 Hz, 66 J/cm ²	120 s	10
Nd:YAG (G2) Sem ar/água	G2A	P MT	50 mJ, 10 Hz, 29 J/cm ²	60 s	10
	G2B	PMT	100 mJ, 10 Hz, 58 J/cm ²	60 s	10
	G2C	> PMT	100 mJ, 10 Hz, 119 J/cm ²	120 s	10
Er:YAG (G3) Sem ar/água	G3A	P MT	25 mJ, 10 Hz, 16 J/cm ²	60 s	10
	G3B	PMT	50 mJ, 10 Hz, 32 J/cm ²	60 s	10
	G3C	> PMT	50 mJ, 10 Hz, 64 J/cm ²	120 s	10

continua

conclusão					
Grupo		Parâmetros		Tempo	Número de Amostras (n)
Er:YAG (G4) ar/água	G4A	PMT	25 mJ, 10 Hz, 16 J/cm ²	60 s	10
	G4B	PMT	50 mJ, 10 Hz, 32 J/cm ²	60 s	10
	G4C	> PMT	50 mJ, 10 Hz, 64 J/cm ²	120 s	10
Ca(OH) ₂ (G5)				7 dias	10
<u>TOTAL</u>					120

4.3 Preparo das amostras e espectroscopia

De modo a avaliar a absorção dos lasers utilizados no experimento (1,064 μm ; 2,1 μm e 2,94 μm) pelo microrganismo *E. faecalis*, foram obtidos espectros de absorção que compreenderam os comprimentos de onda do ultravioleta (200 nm) ao infravermelho próximo (3.000 nm).

Os espectros de absorção no comprimento do ultravioleta e visível foram obtidos utilizando-se o meio seletivo de caldo de tripticase de soja com cloranfenicol inoculado com a cepa de *E. faecalis* (1 mL), em cubetas de vidro introduzidas no espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 9 (Norwalt,

Conn.). A absorção foi medida na faixa de comprimento de onda de 200 nm (ultravioleta) até 800 nm (visível), contra o ar.

Como a transmissão do vidro na faixa do espectro eletromagnético do infravermelho próximo é baixa, isto é, a cubeta de vidro utilizada para as medidas é capaz de absorver intensamente este comprimento de onda, a coleta de dados nesta faixa do espectro revelou-se impossível quando da utilização dessa cubeta. Em decorrência desse fato, 50 mL de caldo de tripticase de soja com cloranfenicol foram centrifugados por 20 minutos a 50.000 rpm (Sorvall RC5C *centrifuge*). Foi obtida uma película (*pellet*), a qual foi lavada duas vezes em água destilada. As bactérias suspensas em água destilada foram liofilizadas durante o período da noite. O pó obtido (160 mg) durante esse procedimento foi misturado com brometo de potássio (KBr) e comprimido em um módulo de forma a obter uma película, que por sua vez, foi colocada no espectrofotômetro. A absorção nos comprimentos de onda de 1.500 nm a 3.000 nm foi medida contra o ar.

5 RESULTADOS

A proporção de redução bacteriana para cada corpo de prova testado foi calculada pela fórmula:

$$\text{Proporção de redução} = \frac{\text{quantidade de redução}}{\text{média do controle}}$$

A média, o desvio padrão, o coeficiente de variação, os valores mínimo e máximo relativos à proporcional redução bacteriana para cada grupo tratado são apresentados na Tabela 5.1. Os grupos tratados pelo lasers de Ho:YAG (grupos 1A e 1B), Nd:YAG (grupos 2A, 2B e 2C) e hidróxido de cálcio (grupo 5) apresentaram diferenças estatísticas significativas ao nível de $\alpha=0,05$, quando comparados com o controle.

Os dados obtidos pela contagem das colônias para cada placa de Petri são apresentados no Apêndice 3.

O teste U de Mann-Whitney, não-paramétrico, baseado na proporção, foi utilizado para a análise dos resultados com nível de significância de $\alpha=0,05$, como está apresentado na Tabela 5.2.

TABELA 5.1 - Redução bacteriana proporcional [média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.)] para cada grupo tratado. Números negativos indicam aumento. CV = desvio padrão/média. Grupo 1 (Ho:YAG), grupo 2 (Nd:YAG), grupos 3 e 4 (Er:YAG sem e com refrigeração, respectivamente) e grupo 5 (Ca(OH)₂)

grupo	Média	Mediana	DP	CV	Mín.	Máx.
1A	0,7809	0,7765	0,0407	0,0017	0,7129	0,8418
1B	0,9305	0,9290	0,0228	0,0005	0,8940	0,9755
2A	0,5463	0,5340	0,1429	0,0204	0,3422	0,8065
2B	0,5212	0,5445	0,0814	0,0066	0,2970	0,6259
2C	0,6517	0,7235	0,1663	0,0277	0,1164	0,8710
3A	0,0481	0,0561	0,0557	0,0031	0,660	0,1212
3B	0,0032	0,0497	0,0923	0,0085	0,953	0,2107
3C	0,0866	0,0894	0,1077	0,0116	0,709	0,2920
4A	0,0908	0,0826	0,0739	0,0055	0,0274	0,2623
4B	0,1290	0,1282	0,0494	0,0024	0,0531	0,2221
4C	0,0874	0,0858	0,0484	0,0023	0,0195	0,1926
5	0,7509	0,7643	0,0456	0,0021	0,6569	0,8316

Uma redução bacteriana significativamente maior foi obtida no grupo 1A (irradiado pelo laser de Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 33J/cm², por 60 segundos) quando comparado com os demais grupos, à exceção do grupo 1B (irradiado pelo laser de Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz, 66J/cm², por 120 segundos), e do grupo 5 (tratado com hidróxido de cálcio). O grupo 1B apresentou uma redução bacteriana significativamente maior em comparação ao grupo 1A ($p < 0,0001$), mas não houve diferença significativa entre os grupos 1A e 5 ($p = 0,131$).

Uma redução bacteriana significativamente maior foi obtida no grupo 1B, quando comparado com os demais grupos ($p < 0,0001$). O grupo 2A (irradiado pelo laser de Nd:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 29 J/cm², por 60 segundos) e o grupo 2B, irradiado pelo laser de Nd:YAG a 100 mJ, 10 Hz e 58 J/cm², por 60 segundos, não apresentaram diferença estatística significativa ($p = 0,970$). O grupo 2A apresentou redução bacteriana significativamente menor, quando comparado aos grupos 1A, 1B, 2C (irradiado pelo laser de Nd:YAG à 100mJ, 10 Hz e 116 J/cm², por 120 segundos), e grupo 5 ($p = 0,001$, $p < 0,0001$, $p = 0,049$ e $p = 0,0010$, respectivamente). O grupo 2A apresentou uma maior redução bacteriana significativa quando comparado aos grupos restantes ($p < 0,0001$).

O grupo 2B apresentou, significativamente, maior redução bacteriana quando comparado aos grupos 3A-C, 4A-C. Os grupos 2C e 5 apresentaram a maior redução bacteriana significativa, em relação ao que o grupo 2B ($p = 0,07$, e $p < 0,0001$, respectivamente).

O grupo 2C apresentou a maior redução bacteriana significativa, quando comparado aos grupos 3A, 3B, 3C e 4A, 4B, 4C. O grupo 5 apresentou, significativamente, maior redução bacteriana ($p < 0,0001$) em relação ao grupo 2C. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos 3A (irradiado pelo laser de Er:YAG a 25 mJ, 10 Hz e 16 J/cm^2 , por 60 segundos; sem ar/água) e 3C (laser de Er:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 64 J/cm^2 , por 120 segundos; sem ar/água) ($p = 0,174$), mas o grupo 3A apresentou a menor redução bacteriana significativa quando comparado aos grupos 4A-C e 5 (valores de p apresentados na Tabela 5.2). O grupo 3A mostrou, significativamente, maior redução bacteriana em relação ao grupo 3B ($p = 0,019$).

O grupo 3B (laser de Er:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 32 J/cm^2 , por 60 segundos; sem assistência ar/água) apresentou, significativamente, menor redução bacteriana em relação aos grupos 3C, 4A, 4B e 4C, e o grupo 3C (laser Er:YAG a 50mJ, 10 Hz e 64 J/cm^2 , por 120 segundos; sem refrigeração ar/água) não apresentou diferença estatística significativa quando comparado aos grupos 4A, 4B e 4C (valores de p na Tabela 5.2). Entretanto, o grupo 5 apresentou, significativamente, maior redução bacteriana em relação ao grupo 3C ($p < 0,0001$). O grupo 4A não apresentou diferente redução bacteriana significativa, quando comparado aos grupos 4B e 4C ($p = 0,059$ e $0,821$, respectivamente), e apresentou menor redução bacteriana em relação ao grupo 5 ($p < 0,0001$). O grupo 4B apresentou maior redução bacteriana significativa, em relação ao 4C ($p = 0,31$), mas uma menor redução significativa, em relação ao grupo 5

($p < 0,0001$). Finalmente, o grupo 4C apresentou, significativamente, menor redução bacteriana que o grupo 5 ($p < 0,0001$).

Em resumo, o grupo 1B apresentou, significativamente, a maior redução bacteriana, seguido dos grupos 1A e 5, os quais não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (grupo 1B > grupo 1A = grupo 5). A redução porcentual para todos os grupos de tratamento podem ser observadas na Figura 5.1.

O teste U de Mann-Whitney, não-paramétrico, foi também utilizado para a avaliação das diferenças estatísticas entre os grupos tratados: Ho:YAG (grupo 1), Nd:YAG (grupo 2), Er:YAG sem refrigeração ar/água (grupo 3), Er:YAG com refrigeração ar/água (grupo 4) e hidróxido de cálcio (grupo 5). Os grupos tratados pelos lasers de Ho:YAG, Nd:YAG e hidróxido de cálcio apresentaram diferença estatística significativa (no nível de significância $\alpha = 0,05$) em redução bacteriana, como mostra a Tabela 5.3. A redução bacteriana proporcional (média, desvio padrão, valores mínimo e máximo) para cada grupo tratado está apresentado na Tabela 5.4.

O grupo 1 apresentou uma maior redução bacteriana significativa quando comparado aos outros quatro grupos ($p < 0,0001$). O grupo 2 mostrou, significativamente, maior redução que os grupos 3 e 4, mas menor redução significativa que o grupo 5 ($p < 0,0001$). O grupo 3 apresentou menor redução bacteriana significativa quando comparado aos grupos 4 e 5

($p < 0,0001$). O grupo 5 apresentou maior redução significativa quando comparado ao grupo 4. Em resumo, a redução bacteriana foi significativa para: grupo 1 > grupo 5 > grupo 2 > grupo 4 > grupo 3. A redução porcentual para os grupos tratados pode ser observada na Figura 5.2.

FIGURA 5.1 - Redução porcentual para todos os grupos tratados

TABELA 5.3 - Redução bacteriana proporcional [média, mediana, desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (Mín.) e máximo (Máx.)] para cada grupo como um todo. Números negativos indicam aumento. $CV = \text{desvio padrão} / \text{média}$. Grupo 1 (Ho:YAG), grupo 2 (Nd:YAG), grupos 3 e 4 (Er:YAG sem e com refrigeração, respectivamente) e grupo 5 (Ca(OH)_2)

Grupo	Média	Mediana	DP	CV	Mín.	Máx.
1	0,8557	0,8679	0,0822	0,0068	0,7129	0,9755
2	0,5731	0,5760	0,1451	0,0211	0,1164	0,8710
3	0,0438	0,0528	0,0945	0,0089	0,0953	0,2920
4	0,1024	0,0967	0,0608	0,0037	0,0274	0,2623
5	0,7509	0,7643	0,0456	0,0021	0,6569	0,8316

TABELA 5.4 - Análise estatística por meio do teste U Mann-Whitney, não-paramétrico, com nível de significância $\alpha = 0,05$. Comparação da redução bacteriana entre grupos como um todo

Grupos	2	3	4	5
1	G.1 > G.2 p < 0,0001	G.1 > G.3 p < 0,0001	G.1 > G.4 p < 0,0001	G.1 > G.5 p < 0,0001
2	_____	G.2 > G.3 p < 0,0001	G.2 > G.4 p < 0,0001	G.2 < G.5 p < 0,0001
3	_____	_____	G.3 < G.4 p < 0,0001	G.3 < G.5 p < 0,0001
4	_____	_____	_____	G.4 < G.5 p < 0,0001

FIGURA 5.2. Redução percentual para os grupos tratados como um todo

Análise em espectroscopia

Embora os dados obtidos pela espectroscopia tenham sido mais qualitativos do que quantitativos, o espectro de absorção pelas bactérias (*E. faecalis*) na faixa do comprimento de onda do ultravioleta e visível apresentou picos de absorção em 361 nm e em 377 nm (ambos no ultravioleta). Houve um decréscimo na absorção pelas bactérias conforme o comprimento de onda aumentou. Um decréscimo da absorção também ocorreu abaixo de 377 nm (Figura 5.3).

O espectro de absorção no comprimento de onda no infravermelho próximo revelou, de forma geral, uma baixa absorção pelas bactérias testadas (Figura 5.4).

FIGURA 5.3 – Espectro de absorção pelo microrganismo *E. faecalis* que compreende os comprimentos de onda no ultravioleta e visível

FIGURA 5.4 – Espectro de absorção pelo microrganismo *E. faecalis* que compreende os comprimentos de onda do infravermelho próximo

TABELA 5.2. Análise estatística por meio do teste U de Mann-Whitney não-paramétrico com nível de significância $\alpha=0,05$. Comparações dois a dois com relação à quantidade de redução bacteriana entre os grupos (NSD = nenhuma significativa diferença)

Grupos	1B	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4A	4B	4C	5
1A	1A < 1B p < 0,0001	1A > 2A p = 0,001	1A > 2B p < 0,0001	1A > 2C p = 0,008	1A > 3C p < 0,0001	1A > 3B p < 0,0001	1A > 3C p < 0,0001	1A > 4A p < 0,0001	1A > 4B p < 0,0001	1A > 4C p < 0,0001	NSD p = 0,131
1B	—	1B > 2A p < 0,0001	1B > 2B p < 0,0001	1B > 2C p < 0,0001	1B > 3A p < 0,0001	1B > 3B p < 0,0001	1B > 3C p < 0,0001	1B > 4A p < 0,0001	1B > 4B p < 0,0001	1B > 4C p < 0,0001	1B > 5 p < 0,0001
2A	—	—	NSD p = 0,970	2A < 2C p = 0,049	2A > 3A p < 0,0001	2A > 3B p < 0,0001	2A > 3C p < 0,0001	2A > 4A p < 0,0001	2A > 4B p < 0,0001	2A > 4C p < 0,0001	2A < 5 p = 0,0010
2B	—	—	—	2B < 2C p = 0,007	2B > 3A p < 0,0001	2B > 3B p < 0,0001	2B > 3C p < 0,0001	2B > 4A p < 0,0001	2B > 4B p < 0,0001	2B > 4C p < 0,0001	2B < 5 p < 0,0001
2C	—	—	—	—	2C > 3A p < 0,0001	2C > 3B p < 0,0001	2C > 3C p < 0,0001	2C > 4A p < 0,0001	2C > 4B p < 0,0001	2C > 4C p < 0,0001	2C < 5 p < 0,0001
3A	—	—	—	—	—	3A > 3B p = 0,019	NSD p = 0,174	3A < 4A p = 0,041	3A < 4B p < 0,0001	3A < 4C p = 0,023	3A < 5 p < 0,0001
3B	—	—	—	—	—	—	3B < 3C p = 0,0100	3B < 4A p = 0,001	3B < 4B p < 0,0001	3B < 4C p = 0,0010	3B < 5 p < 0,0001
3C	—	—	—	—	—	—	—	NSD p = 0,880	NSD p = 0,173	NSD p = 0,940	3C < 5 p < 0,0001
4A	—	—	—	—	—	—	—	—	NSD p = 0,059	NSD p = 0,821	4A < 5 p < 0,0001
4B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4B > 4C p = 0,031	4B < 5 p < 0,0001
4C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4C < 5 p < 0,0001

6 DISCUSSÃO

Os túbulos dentinários do canal radicular, na presença de bactérias, podem constituir um reservatório de crescimento bacteriano (Oguntebi, 1994). Ocasionalmente, estas bactérias remanescentes podem causar uma persistente infecção, que interfere com o resultado da terapia endodôntica. Bactérias localizadas dentro dos túbulos dentinários não são acessíveis às defesas do hospedeiro, de antibióticos administrados sistemicamente, e do preparo químico-cirúrgico (Siqueira Jr. & Lopes, 1999).

Estudos prévios têm demonstrado o efeito antibacteriano de diferentes métodos e medicações no tratamento de canais radiculares infectados (Byström & Sundqvist, 1981). O conhecimento da microbiota presente nos túbulos dentinários infectados, assim como o efeito dos diferentes tratamentos na remoção dessas bactérias, estão incompletos devido à deficiência das técnicas de obtenção de amostras utilizadas. Algumas técnicas de obtenção de amostras têm envolvido a trituração dentinária, um processo que pode interferir na recuperação dos microrganismos em suspensão. Outros investigadores tentaram remediar esse problema mediante a utilização de coloração bacteriana (Brown & Brenn, 1931) em secções dentinárias desmineralizadas e embebidas em

parafina (Langeland *et al.*, 1974; McKay, 1976). Todavia, Avery *et al.* (1982) mostraram que as colorações utilizadas não eram adequados para demonstrar a presença de bactérias Gram-negativas. Uma outra deficiência dessas técnicas é o problema de contaminação durante o experimento.

No presente estudo *E. faecalis* foi utilizado como organismo teste. A técnica laboratorial de indução de recombinação genética por um campo elétrico (*electroporation*) de uma bactéria Gram-positiva (*E. faecalis*), com um DNA plasmidial que carrega genes de resistência a antibiótico (Wirth *et al.*, 1986), permitiu o crescimento exclusivo destes cocos Gram-positivos em meio seletivo contendo cloranfenicol. Nesse sentido, a contaminação durante o experimento foi reduzida.

E. faecalis foi selecionado como organismo teste devido à sua prevalência e persistência em canais radiculares contaminados (Engstrom, 1964). Analisando o resultado de 4 mil culturas do conteúdo de canais radiculares, Winkler & Van Amerongen (1959) encontraram esse microrganismo como monoinfeção, indicando sua capacidade de resistência. Também foi o organismo mais persistente, pois vários dos estudos *in vitro*, analisando a efetividade do hidróxido de cálcio, utilizaram *E. faecalis* como organismo teste, por ser uma bactéria resistente e de crescimento rápido, freqüentemente isolado dos canais radiculares. Esta espécie bacteriana é uma das mais resistentes à mudança de temperatura e ao pH básico. De acordo com Witte *et al.* (1999), os enterococos são capazes de crescer em condições desfavoráveis como pH 9,6, e

subpopulações sobrevivem em temperatura de 60° C por 30 minutos. Isso torna *E. faecalis* muito resistente a diferentes condições ambientais.

Tem sido observado que o curativo com hidróxido de cálcio é ineficiente contra os enterococos (Stevens & Grossman, 1983; Haapasalo & Ørstavik, 1987; Siqueira Jr. & Uzeda, 1996). Assim, a sua freqüente persistência questiona o uso rotineiro do hidróxido de cálcio como medicação intracanal (Molander *et al.*, 1998). Vários estudos demonstraram que o hidróxido de cálcio exerce efeito antimicrobiano (Byström *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1991; Georgopoulou *et al.*, 1993). Esses efeitos foram observados quando essa substância em solução estava em contato direto com as bactérias. Em tais condições a concentração de hidróxido de cálcio deve ser muito alta, atingindo níveis incompatíveis à sobrevivência bacteriana. Entretanto, clinicamente este contato direto nem sempre é possível.

Neste estudo o hidróxido de cálcio mostrou uma redução bacteriana proporcional de 75% após sete dias de curativo, o que coincide com os achados de Haapasalo & Ørstavik (1987). Entretanto, Ørstavik & Haapasalo relataram, em 1990, que o hidróxido de cálcio pode levar até dez dias para desinfetar os túbulos dentinários infectados por bactérias facultativas. Com base nesse fato, um período mais longo poderia mostrar uma maior redução bacteriana proporcional. Nerwich *et al.* (1993) investigaram mudanças no pH por um período de quatro semanas após a aplicação do curativo de hidróxido de cálcio. Os resultados revelaram que a medicação por uma semana com hidróxido de cálcio aumentou o pH da dentina interna para

aproximadamente 9,0. Em certas condições, os níveis de pH na dentina podem permitir a sobrevivência de algumas linhagens bacterianas. A tolerância bacteriana ao pH é variável, e a maioria apresenta um bom crescimento entre 6 e 9 (Padan *et al.*, 1981). *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* podem sobreviver em pH 8 ou 9 (Atlas, 1997). Estas espécies bacterianas têm sido ocasionalmente isoladas a partir de canais radiculares infectados (Haapasalo *et al.*, 1983; Tronstad, 1992; Siren *et al.*, 1997). Certas bactérias, tais como alguns enterococos, toleram altos valores de pH, variando de 9 a 11 (Marsh *et al.*, 1993).

A maior razão para a utilização da irradiação laser durante a terapia endodôntica é a redução microbiana, a qual é obtida pelo aumento de temperatura. A remoção de *debris* pela irradiação laser contribui para reduzir a quantidade de bactéria no canal radicular.

Quando a luz interage com o tecido, ela pode ser absorvida, refletida, espalhada ou transmitida. Uma porção da luz é refletida ou pode penetrar no substrato e ser espalhada, sem produzir um efeito notável. Mas, para ser convertida em calor, a luz tem de ser absorvida por um componente do tecido. A extensão desta interação será proporcional ao nível de absorção do comprimento de onda em particular pelo tecido (Miserendino & Pick, 1995). Esse fenômeno explica o fato de que neste experimento diferentes níveis de redução bacteriana foram obtidos após a utilização de diferentes aparelhos laser (comprimentos de onda).

A dentina contém 69% em peso de componentes inorgânicos, fundamentalmente hidroxiapatita carbonatada, incluindo cálcio (26,9%), fósforo (13,2%), carbonato (4,6%), sódio e magnésio (Marshall, 1993). A absorção da luz laser pela hidroxiapatita (HA) e água muda significativamente, dependendo do comprimento de onda da luz laser. Em água e HA existe uma baixa absorção no comprimento de onda de 2 μm em comparação com a alta absorção da energia laser em 3 μm e 10 μm (Miserendino & Pick, 1995). O comprimento de onda do Nd:YAG de 1 μm tem uma fraca absorção pela HA, pelo esmalte e pela dentina (Fried *et al.*, 1995), como pôde ser observado na Figura 6.1.

FIGURA 6.1 - Espectro de absorção da água e hidroxiapatita (Frentzen *et al.*, 1992)

de Nd:YAG) > Grupo 4 (Er:YAG com refrigeração água/ar) > Grupo 3

(Er:YAG sem refrigeração água/ar). É importante ressaltar que o estudo foi realizado utilizando-se os parâmetros no limiar de modificação física (*physical modification threshold* – PMT), que constitui o nível de energia suficiente para produzir mudanças físicas e químicas na superfície dentinária (White *et al.*, 1993; Koopah *et al.*, 1996). Quando a energia foi reduzida, nenhuma modificação foi produzida, e quando o tempo de irradiação foi aumentado, energias acima do limiar de modificação foram atingidas.

Houve uma significativa redução bacteriana proporcional no grupo irradiado pelo laser de Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz, 66 J/cm², por 120 segundos (PMT), seguido do grupo irradiado pelo laser de Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 33 J/cm², por 60 segundos (1/2 PMT), e pelo grupo que recebeu hidróxido de cálcio. Os últimos dois grupos não foram significativamente diferentes. A diferença na redução bacteriana obtida nos grupos irradiados pelo laser de Ho:YAG se deve a diferentes quantidades de energia utilizadas em cada grupo. Uma redução bacteriana por volta de 93% foi obtida após a irradiação pelo laser de Ho:YAG, o que está de acordo com os resultados demonstrados por Gutknecht *et al.* (1997). Entretanto, estes autores utilizaram energias mais elevadas, por exemplo, 100 mJ (1 W, 10Hz) e 400 mJ (2 W, 5Hz), o que conduziu basicamente a eliminação completa bacteriana da ordem de 98,65 % e 99,98 % respectivamente.

Dois dos grupos de tratamento receberam irradiação pelo laser de érbio:YAG (com ou sem refrigeração água/ ar). A dentina e a água apresentam diferentes propriedades de absorção e condução de calor (Van

Noort, 1994). A água requer quase quatro vezes mais energia que a dentina para aumentar a temperatura em níveis iguais (Ramsköld *et al.*, 1997). Devido à densidade da dentina ser de 2,1, comparada à densidade de 1,0 da água, a difusão térmica é maior para a dentina que para a água. Isso explica a diferença de absorção da água entre canais secos e molhados. Portanto, um fator que deve ser considerado durante o tratamento endodôntico com laser é a umidade. A alta absorção da luz laser pela água em 2,94 μm (Er:YAG) é também responsável pelos diferentes resultados obtidos quando os grupos 3 e 4 foram comparados. A utilização de uma constante irrigação com água no grupo sob refrigeração poderia também ter removido uma certa quantidade de bactérias, o que deve ter levado a diferenças entre os dois grupos irradiados pelo laser de Er:YAG.

Pesquisas prévias de Keller & Hibst (1990) mostraram que a estrutura cristalina do esmalte e da dentina pode não ser alterada após a irradiação com o laser de érbio. O mecanismo de absorção do laser de érbio ocorre através de microexplosões da água superaquecida dentro de poros e outras partículas (Rechmann *et al.*, 1998). A estrutura da superfície produzida por este laser difere consideravelmente da produzida por outros lasers (Altshuler *et al.*, 1994).

A absorção da luz laser pelo microrganismo testado (*E. faecalis*) é um fator importante a ser analisado com relação à redução bacteriana obtida neste estudo. Existe uma baixa absorção por essas bactérias nos comprimentos de onda específicos utilizados neste estudo (1,064 μm , 2,1 μm

e 2,94 μ m), o que foi demonstrado pelo segundo experimento realizado. Portanto, a redução bacteriana obtida neste experimento se deve principalmente ao aumento de temperatura produzido por aqueles comprimentos dentro dos canais radiculares. Entretanto, esse fato não anula a possibilidade de diferenças quanto à sensibilidade da luz laser por diferentes organismos. Em estudo recente Moritz *et al.* (2000) avaliaram o efeito específico da irradiação através da dentina em bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*E. faecalis*) com relação à sua estrutura celular. O exame microbiológico mostrou redução de ambas as bactérias, em diferente extensão. De acordo com os autores, a estrutura da parede celular é crucial para a sensibilidade individual ao tratamento laser.

Dessa forma, fica claro que o aumento de temperatura atingido pela irradiação nos parâmetros utilizados pelo laser de Er:YAG não foram suficientes para produzir significativa redução bacteriana. Isso se deve aos parâmetros de irradiação utilizados que se apresentaram baixos, sobretudo para o laser de Er:YAG. Em recente estudo, realizado por Moritz *et al.* (1999), os autores obtiveram os melhores resultados quanto à redução microbiana (99,64%) no parâmetro de 1,5 W, 10 Hz (100 mJ), para o laser de Er:YAG.

Outro fator é o volume dentinário disponível para recebimento de energia, fator esse determinado principalmente pelo comprimento e diâmetro da raiz. Um delgado incisivo inferior obviamente requer menos energia para aumentar a temperatura radicular em níveis danosos, quando comparado ao que é necessário para um canino superior. Os níveis de

energia devem ser ajustados de forma que uma raiz delgada e curta possa ser sujeita ao tratamento laser sem dano aos tecidos vizinhos.

Em trabalho realizado por Gutknecht *et al.* (2000) os autores avaliaram o efeito antibacteriano do laser de Er:YAG em secções dentinárias de diferentes espessuras (100 µm, 300 µm e 500 µm) contaminadas com *E. faecalis*. A potência média de 50 mJ e frequência de 15 Hz, foram utilizadas, e uma redução bacteriana de 97,7% foi obtida por meio de secções dentinárias de 100 µm e de 54%, mediante 500 µm. Todavia, a espessura dentinária dos corpos de prova neste estudo foram de 2 mm, o que explica o fato da grande diferença nos resultados obtidos.

O mesmo fato pode ser estendido ao laser de Nd:YAG, que embora tenha apresentado uma redução bacteriana da ordem de 65% (para 100 mJ, 10 Hz, 2 ciclos de 60s), em outros estudos, utilizando-se energia de irradiação semelhante, foi obtida uma maior redução bacteriana. Gutknecht *et al.* (1996) obtiveram uma redução da ordem de 99,91% quando da irradiação do laser de Nd:YAG (1,5 W/ 15Hz / 100 mJ / 4x10s) em dentes humanos extraídos. Klinke *et al.* (1997), utilizando os mesmos parâmetros, obtiveram uma redução bacteriana completa, entretanto, em secções dentinárias de apenas 100 - 1.000 µm.

Jelinková *et al.* (1999) avaliaram a quantidade de energia na superfície externa radicular, quando da irradiação intracanal pelos lasers de Er:YAG e de alexandrita. Interessante observar que não foi detectada nenhuma energia na superfície externa radicular quando da irradiação do laser de Er:YAG, enquanto esta foi observada com o laser de alexandrita.

Tal fato demonstra a absorção deste primeiro pelas paredes do canal radicular.

Neste estudo os corpos de prova foram padronizados, produzindo amostras com 12 mm de comprimento, diâmetro externo de 6 mm após a remoção de cimento, e um canal simulado de 2 mm de diâmetro. A uniformidade permitiu uma confiável comparação entre os grupos de tratamento, incluindo a padronização do tipo de tratamento. Vários estudos utilizaram dentes bovinos para examinar a penetração bacteriana nos túbulos dentinários (Haapasalo & Ørstavik, 1987; Perez *et al.*, 1993a, b; Siqueira Jr. *et al.*, 1996). Os túbulos dentinários de bovinos são, quanto à morfologia e densidade, similares aos dentes humanos (Haapasalo & Ørstavik, 1987; Nakamichi *et al.*, 1983).

Os três grupos-controles utilizados neste estudo consistiram de: (1) um controle negativo, em que os corpos de prova receberam água estéril em vez de bactéria, e os resultados mostraram confiáveis condições do experimento com ausência de contaminação bacteriana; (2) controle positivo, em que os corpos de prova preparados não receberam tratamento, e os resultados demonstraram a presença de bactérias dentro dos túbulos dentinários, permitindo uma quantificação das amostras; (3) controle negativo (NC2) que recebeu iodo em solução de iodeto de potássio, e os resultados mostraram ausência de crescimento bacteriano. Um período curto de contato iodo - dentina foi suficiente para prevenir o crescimento microbiano, como demonstrado por Safavi *et al.* 1990. O iodo em solução de iodeto de potássio, por meio de seu vapor, tem mostrado ser eficiente em

longas distâncias, mas por um período muito curto (Spangberg, 1982). É interessante mencionar que baseados nos seus resultados, Safavi *et al.* (1990) sugeriram o preenchimento do canal radicular por poucos minutos com essa solução durante os procedimentos endodônticos, quando ocorre contaminação durante o tratamento. O esmalte de unha utilizado pode conter solventes, bem como apresentar algum efeito antibacteriano, mas experimentos controles mostraram que este efeito é desprezível.

A desinfecção naturalmente é obtida após a limpeza e modelagem químico-cirúrgica do canal radicular. Bactérias que penetram na dentina em pequena profundidade podem ser removidas pelo preparo cirúrgico do canal radicular ou ser destruídas pela ação química da solução irrigante. Ao contrário, aquelas localizadas profundamente na dentina podem lá permanecer, mesmo após procedimentos de limpeza e modelagem (Siqueira Jr. *et al.*, 1996). A desinfecção da superfície radicular preparada e dos túbulos dentinários se torna, então, uma das primeiras funções dos antisépticos em endodontia, sejam eles usados como curativos ou como soluções irrigantes.

Um fator importante não foi analisado durante este experimento, abrindo um campo para projetos de pesquisa futuros: a que distância dentro dos túbulos dentinários as bactérias foram eliminadas.

Haapasalo & Ørstavik (1987) investigaram a profundidade da redução bacteriana dentro dos túbulos dentinários. Após o tratamento por diferentes medicações, raspas de dentina foram obtidas de dentro dos canais radiculares utilizando-se pontas montadas de diferentes diâmetros. A

presença de bactérias em cada profundidade específica foi estabelecida após cultura das raspas dentinárias. O mesmo tipo de experimento poderia ser realizado após as diferentes modalidades de tratamentos utilizadas neste estudo, o que forneceria informações importantes.

Quanto ao aumento térmico promovido durante a irradiação da luz laser intracanal, a literatura mostra que os lasers de Er:YAG e Nd:YAG, quando irradiados em energias de saída de 40-100 mJ/pulso e taxa de repetição de 10-15 Hz, produziram elevações térmicas na superfície radicular com valores abaixo de 5° C (Cecchini *et al.*, 1998; Strefezza *et al.*, 1999). A partir dos resultados obtidos por esses estudos, Antonio (2001), recentemente avaliou o efeito do laser de Er:YAG a 60 mJ, 15 Hz e 100 mJ, 10 Hz, e obteve uma redução bacteriana da ordem de 74,62 a 99,95 %.

Energias do laser abaixo destas mencionadas foram utilizadas no presente estudo. Lan (1999) reportou elevação térmica não excedendo 10°C na superfície radicular se a energia do laser de Nd:YAG for menor que 100 mJ a 20 Hz. Hibst *et al.* (1997) sugeriram que parâmetros seguros para utilização do laser de Er:YAG nos canais radiculares são: 50 mJ, 15 Hz, na velocidade de 2 mm/s em raízes com espessura radicular maiores que 1mm. Em relação ao laser de Ho:YAG, Cohen *et al.* (1996) relataram temperaturas na superfície radicular abaixo de 5° C, quando os dentes foram irradiados em energias de 0,5-1,0 W e 5 Hz (54-58 J).

Embora estes estudos forneceram dados importantes em relação à elevação de temperatura produzida pela irradiação intracanal, algumas das

condições experimentais não podem reproduzir uma condição *in vivo*. Um exemplo desse fato é o estudo realizado por Ramsköld *et al.* (1997), em que os dentes foram mantidos nas mãos do operador durante o experimento.

A hipótese desta investigação foi a de que a irradiação laser poderia ser mais eficiente que o hidróxido de cálcio na eliminação de bactéria intratubular sob as condições deste estudo. Para tratamentos endodônticos de dentes infectados, em uma única sessão, após a irradiação com o laser de Ho:YAG nas condições do experimento, pode-se esperar que os canais estejam mais ou igualmente livres de bactérias quanto no procedimento em que a terapia endodôntica em múltiplas sessões com hidróxido de cálcio por sete dias é utilizada. Como consequência notória da prática usual e comum do tratamento endodôntico em uma única sessão, a utilização da irradiação intracanal, a partir dos resultados deste estudo, poderia ser benéfica como um complemento ao preparo convencional químico-cirúrgico.

Neste estudo buscou-se avaliar os efeitos da irradiação laser na redução bacteriana, dentro de parâmetros que propiciassem a mínima ou a ausência de alteração morfológica aos tecidos dentinários. No entanto, este estudo nos mostra ser necessária uma maior interação laser-tecido dentinário para a produção da elevação térmica intrarradicular capaz de eliminar um maior número de microrganismos. A baixa absorção dos comprimentos de onda utilizados pelas bactérias (*E. faecalis*), como foi demonstrado neste estudo por espectroscopia, é um fator a mais a indicar o aumento térmico como o responsável por esta redução.

A partir desses fatos, recomenda-se o estudo *in vitro* e *in vivo* principalmente com o laser de érbio em níveis de energia mais elevados, mas que ainda representem um tratamento seguro às paredes radiculares (reduzida ablação e carbonização) e, ao mesmo tempo, seguro aos tecidos perirradiculares (reduzido aumento de temperatura na superfície radicular). E, dessa forma, para que os mesmos possam ser utilizados extensivamente no tratamento clínico.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta investigação, pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. Houve significativamente uma redução bacteriana maior no grupo irradiado pelo laser de Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz, 66 J/cm², por 120 segundos, quando comparado aos outros quatro grupos.
2. A irradiação com o laser de Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz, 66 J/cm², foi mais efetiva que o tratamento com hidróxido de cálcio por sete dias na eliminação de bactérias localizadas na dentina intratubular.
3. A medicação com hidróxido de cálcio mostrou, significativamente, uma redução bacteriana maior, quando comparada aos grupos irradiados pelos lasers de Nd:YAG e Er:YAG. Não houve diferença significativa neste grupo quando comparado ao grupo irradiado pelo laser de Ho:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 33 J/cm², por 60 segundos.

4. O grupo irradiado pelo laser de Nd:YAG mostrou, significativamente, uma redução bacteriana maior que nos grupos irradiados pelo laser de Er:YAG.
5. Não houve redução bacteriana significativa do grupo irradiado pelo laser de Er:YAG com refrigeração com água/ar quando comparado com o grupo que não recebeu refrigeração com água/ar.
6. O espectro de absorção pelas bactérias (*E. faecalis*) na faixa do comprimento de onda do ultravioleta e visível apresentou picos de absorção em 361 nm e em 377 nm (ambos no ultravioleta).
7. O espectro de absorção nos comprimentos de onda do infravermelho próximo revelou, de forma geral, uma baixa absorção pelo microrganismo testado.

REFERÊNCIAS*

AKPATA, E. S. Effect of endodontic procedures on the population of viable microorganisms in the infected root canal. **J Endod**, Chicago, v.2, n.12, p. 369-373, Dec. 1976.

ALTSHULER, G. B.; BELIKOV, A. V.; EROFEEV, A. V. Laser treatment of enamel and dentine by different Er-lasers. In: ANDERSON, R. R. (Ed.). **Laser surgery: advanced characterization, therapeutics, and systems IV**. Bellingham: The International Society of Optical Engineering, 1994. V. 2128. P. 273-281.

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTICS. Research and Scientific Affairs Committee. **Position statement on the use of lasers in dentistry**. [S.l.], 2000. Folheto.

* De acordo com ABNT NBR-6023: 2000. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

ANDO, N.; HOSHINO, H. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentin. **Int Endod J**, London, v.23, n.1, p. 20-27, Jan. 1990.

ANTONIO, M. P. S. **Estudo in vitro do efeito de redução bacteriana causado pela irradiação do laser de Er:YAG aplicado intracanal**. 2001. 119 f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo. No prelo.

ATLAS, R. M. **Principles of microbiology**. 2nd ed. Dubuque: WCB, 1997.

AUN, C. E.; BARBERINI, A. F.; CAMARGO, S. C. C.; KFOURI, L. S.; SIMIONATO, M. R. L. Bactericidal effects of Nd:YAG laser intracanal irradiation in endodontics. In: CONFERENCE ON LASERS IN DENTISTRY, 5., 1999, San Jose. **Proceedings...** San Jose: SPIE, 1999. V. 3593. P. 22-27.

AVERY, J. K.; COX, C. F.; SCHIELDS, R.; SYED, S.; BERGENHOLTZ, G.; BAKER, J. A.; HEYS, R. J.; FITZGERALD, M.; HEYS, D. R. Improved differential staining of bacteria in tubules of monkey teeth. **J Dent Res**, Chicago, v. 61, p. 205, 1982. (Resumo n. 242)

BACHMANN, L.; STREFEZZA, C.; ZECELL, D. M.; EDUARDO, C. P. An alternative procedure for laser irradiation in endodontical therapy. In:

INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 7., 2000, Brussels. **Abstracts...** Brussels: ISLD, 2000. P. 5.

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

BARNETT, F.; STEVENS, R.; TRONSTAD, L. Demonstration of *Bacteroides intermedius* in periapical tissue using indirect immunofluorescence microscopy. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v.6, n. 4, p. 153-156, Aug. 1990.

BAUMGARTNER, J. C.; CUENIN, P. R. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. **J Endod**, Chicago, v. 18, n.12, p. 605-612, Dec. 1992.

BAUMGARTNER, J. C.; FALKLER, W. A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. **J Endod**, Chicago, v. 17, n. 8, p. 380-383, Aug. 1991.

BAUMGARTNER, J. C.; MADER, C. L. A scanning electron microscopy evaluation of four root canal irrigation regimens. **J Endod**, Chicago, v. 13, n. 4, p. 147, 1987.

BERKITTEN, M.; BERKITTEN, R.; OKAR, I. Comparative evaluation of antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation in root canals and dentinal tubules. **J Endod**, Chicago, v. 26, n. 5, p. 268-270, May 2000.

BERUTTI, E.; MARINI, R.; ANGERETTI, A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. **J Endod**, Chicago, v. 23, n. 12, p. 725-727, Dec. 1997.

BLUM, J. Y.; MICHAILESCO, P.; ABADIE, M. J. M. An evaluation of the bactericidal effect of the Nd:YAP laser. **J Endod**, Chicago, v. 23, n.9, p. 583-585, Sept. 1997.

BOLANOS, O. R.; JENSEN, J. R. Scanning electron microscope comparisons of the efficacy of various methods of root canal preparation. **J Endod**, Chicago, v. 6, n. 11, p. 815-822, Nov. 1980.

BROWN, J. H.; BRENN, L. A method for the differential staining of gram positive and gram negative bacteria in tissue sections. **Bull Johns Hopkins Hosp**, Baltimore, v. 48, p. 69-73, 1931.

BUCK, R. A.; ELEAZER, P. D.; STAAT, R. H.; SCHEETZ, J. P. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. **J Endod**, Chicago, v. 27, n. 3, p. 206-208, Mar. 2001.

BUTTLER, T. K.; CRAWFORD, J. J. Detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. **J Endod**, Chicago, v. 8, n. 2, p. 59-66, Feb. 1982.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int Endod J**, London, v. 18, n. 1, p. 35-40, Jan. 1985.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 89, n. 4, p. 321-328, Aug. 1981.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 55, n. 3, p. 307-312, Mar. 1983.

BYSTRÖM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 1, n. 5, p. 170-175, Oct. 1985.

CALISKAN, M. K.; SEN, B. H. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using calcium hydroxide: a long-term study. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 12, n. 5, p. 215-221, Oct. 1996.

ÇALT, S.; SERPER, A.; OZCELIK, B.; DALAT, M. D. pH changes and calcium ion diffusion from calcium hydroxide dressing materials through root dentin. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 5, p. 329-331, May 1999.

CARVALHO, C. A. T. **Efeito dos lasers de Nd:YAG e de Er:YAG na adaptação do selamento marginal apical**, 1999. 155 f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José dos Campos.

CAVALLERI, G.; CUCCOLIN, L.; URBANI, G., BENONI, G. Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. **J Chemother**, Firenze, v. 1, n. 2, p. 101-102, Apr. 1989.

CECCHINI, S. C. M.; ZEZELE, D. M.; BACHMANN, L.; NOGUEIRA, G. E. C.; EDUARDO, C. P. Thermal effects during *in vitro* intracanal application of Er:YAG laser. In: CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 6., 1998,

Hawaii. **Programa e resumos...** Utah: International Society for Lasers in Dentistry, 1998. P.122-125.

CECCHINI, S. C. M.; ZECELL, D. M.; BACHMANN, L.; NOGUEIRA, G. E. C.; STREFEZZA, C.; EDUARDO, C. P. Evaluation of two laser systems for intracanal irradiation. In: CONFERENCE ON LASERS IN DENTISTRY, 5., 1999, Washington. **Proceedings ...** Washington: SPIE, 1999. V. 3593. P. 31-35.

COHEN, B. L.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. Effect of power settings on temperature change at the root surface when using a Holmium: YAG laser in enlarging the root canal. **J Endod**, Chicago, v. 22, n. 11, p. 596-599, Nov. 1996.

DAHLÉN, G.; SAMUELSSON, W.; MOLANDER, A.; REIT, C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 15, n. 5, p. 309-311, Oct. 2000.

DAVIS, S. R.; BRAYTON, S.; GOLDMAN, M. The morphology of the prepared root canal: a study utilizing injectable silicone. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 34, n. 4, p. 642-648, Oct. 1972.

DEDERICH, D. N.; ZAKARIASEN, K. L.; TULIP, J. Scanning electron microscopic analysis of canal wall dentin. **J Endod**, Chicago, v. 10, n. 9, p. 428-431, Sept. 1984.

DODGE, J. S. Immediate root filling. **Dent Cosmos**, Milano, v. 29, p.366-367, 1887.

DWYER, T. G.; TORABINEJAD, M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissue of the cat. **J Endod**, Chicago, v. 7, n. 1, p. 31-35, Jan. 1981.

EFTIMIADI, C.; STASHENKO, O.; TONETTI, M.; MANGIANTE, P. E.; MASSARA, R.; ZUPO, S.; FERRARINI, M. Divergent effect of the anaerobic bacteria by-product butyric acid on the immune response. Suppression of T-lymphocyte proliferation and stimulation of interleukin-7 beta production. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 6, n. 1, p. 17-23, Feb. 1991.

ENGSTROM, B. The significance of enterococci in root canal treatment. **Odontol Revy**, Lund, v. 15, n. 2, p. 87-106, 1964.

ERIKSSON, J. H.; ALBREKTSSON, T. Temperature threshold levels for haet induced bone tissue injury: a vital microscopic study in the rabbit. **J Prosthet Dent**, St. Louis, v. 50, n.1, p. 107, July 1963.

ESBERARD, R. M.; CARNES, D. L.; DEL RIO, C. E. Changes in pH at the dentin surface in roots obturated with calcium hydroxide pastes. **J Endod**, Chicago, v. 22, n. 8, p. 402-405, Aug. 1996.

ESTRELA, C.; PIMENTA, F. C.; ITO, Y.; BAMMANN, L. L. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 6, p. 416-418, June, 1999.

FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; OHMAN, A. E.; MOLLER, A. J. P. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 90, n. 2, p. 134-144, Apr. 1982.

FARBER, P. A.; SELTZER, S. Endodontic microbiology. I. Etiology. **J Endod**, Chicago, v. 14, n. 7, p. 363-371, July 1988.

FAVA, L. R. A clinical evaluation of one- and two- appointment root canal therapy using calcium hydroxide. **Int Endod J**, London, v. 27, n. 1, p. 47-51, Jan. 1994.

FEGAN, S. E.; STEIMAN, R. Comparative evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation: an *in vitro* study. **J Endod**, Chicago, v. 21, n. 8, p. 415-417, Aug. 1995.

FRENTZEN, M.; BRAUN, A.; ESSER, S.; KOORT, H. J. Er:YAG laser assisted root canal treatment. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 7., 2000, Brussels. **Abstracts...** Brussels: ISLD, 2000. P. 26.

FRENTZEN, M.; KOORT, H. J. Histological investigation of mid infrared laser ablation of dental hard tissues. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 3., 1992, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt lake City: ISLD, 1992. P. 243.

FRIED, D.; GLENA, R. E.; FEATHERSTONE, J. D. B.; SEKA, W. Multiple pulse irradiation of dental hard tissues at CO₂ laser wavelengths. In: WIGDOR, H. A.; FEATHERSTONE, J. D. B.; WHITE J. M. (Eds.). **Lasers in dentistry**. [S. l.: s. n.], 1995. V. 2394. P. 41-48.

GEKELMAN, D. **Estudo in vitro dos efeitos da irradiação do laser de Nd:YAG no selamento do terço apical de obturações endodônticas executadas com e sem tampão dentinário**. 2000. 145 f. Tese (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GEORGOPOULOU, M.; KONTAKIOTIS, E.; NAKOU, M. *In vitro* evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 9, n. 9, p. 249-253, Dec. 1993.

GOODIS, H. E.; WHITE, J. M.; MARSHALL, S. J.; MARSHALL Jr., G. W.

Scanning electron microscopic examination of intracanal wall dentin versus laser treatment. **Scanning Microsc**, Chicago, v. 7, n. 3, p. 979-987, Sept. 1993.

GOUW-SOARES, S. C.; LAMPERT, F.; MATSON, E., EDUARDO, C. P.

Bactericidal effect of Ho:YAG laser irradiation within contaminated root dentinal samples. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 2, p. 18, Apr. 2000.

GROSSMAN, L. I. **Endodontic practice**. 10th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981. P. 277.

GUTIERREZ, J. H.; JOFRE, A.; VILLENA, F. Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 69, n. 4, p. 491-501, Apr. 1990.

GUTKNECHT, N.; KAISER, F.; HASSAN, A.; LAMPERT, F. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 14, n. 1, p. 7-11, Feb. 1996a.

GUTKNECHT, N.; NUEBLER-MORITZ, M.; BURGHARDT, S. F.; LAMPERT, F. The efficiency of root canal disinfection using a holmium:yttrium-aluminum-garnet laser *in vitro*. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 15, n. 2, p. 75-78, 1997.

GUTKNECHT, N.; MORITZ, A.; CONRADS, G.; SIEVERT, T.; LAMPERT, F. Bacterial effect of Nd:YAG laser in vitro root canals. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 14, n. 2, p. 77-80, Apr. 1996b.

GUTKNECHT, N.; SCHURMANN, M. G.; APEL, C.; MEISTER, J.; LAMPERT, F. Bactericidal effects of Er:YAG laser irradiation in root canals. In: CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 7., 2000, Brussels. **Proceedings....** Brussels: International Society for Lasers in Dentistry, 2000a. P. 18.

GUTKNECHT, N.; GOGSWAARDT, D. D.; CONRADS, G.; APEL, C.; SCHUBERT, C.; LAMPERT, F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 18, n. 2, p. 57-60, 2000b.

HAAPASALO, M.; ØRSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, Chicago, v. 66, n. 8, p. 1375–1379, Aug. 1987.

HAAPASALO, M.; RANTA, H.; RANTA, T. Facultative gram-negative enteric rods persistent periapical infections. **Acta Odontol Scand**, Stockholm, v. 41, n. 1, p. 19-22, 1983.

HAND, R.; SMITH, M. L.; HARRISSON, J. W.; WASH, T. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. **J Endod**, Chicago, v. 4, n. 2, p. 60-64, 1978.

HAPPONEN, R. P. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 2, n. 5, p. 205-209, Oct. 1986.

HARASHIMA, T.; TAKEDA, F. H.; ZHANG, C.; KIMURA, E. J. N.; MATSUMOTO, K. Effect of argon laser irradiation on instrumented root canal walls. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 26-30, Feb. 1998.

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

HARRISON, J.; HAND, R. The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. **J Endod**, Chicago, v. 7, n. 3, p. 128-132, 1981.

HARRISON, J. W.; WAGNER, G. W.; HENRY, C. A. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. **J Endod**, Chicago, v. 16, n. 7, p. 328-30, July 1990.

HASSELGREN, G.; OLSSON, B.; CVEK, M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite in the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. **J Endod**, Chicago, v. 14, n. 3, p. 125-127, Mar. 1988.

HEITHERSAY, G. S. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. **J Br Endod Soc**, London, v. 8, n. 2, p. 74-92, July 1975.

HELING, I.; CHANDLER, N. P. Antimicrobial effect of irrigant combinations within the dentinal tubules. **Int Endod J**, London, v. 31, n. 1, p. 8-14, Jan. 1998.

HELING, I.; IRANI, E.; KARNI, S.; STEINGBERG, D. In vitro antimicrobial effect of RC-Prep within dentinal tubules. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 12, p. 782-785, Dec. 1999.

HENNIG, T.; RECHMANN, P.; HADDING, U. Influences of 2nd harmonic alexandrite-laser radiation on bacteria. INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 6., 1998, Hawaii **Proceedings...** Utah: International Society for Lasers in Dentistry, 1998. P. 225-226.

HERMANN, B. W. Calciumhydroxyd als mittel zum behandel und füllen von zahnwurzelkanälen. **Würzburg, Med Diss**, p. 19, 1920.

HIBST, R.; KELLER, U. Heat effect of pulsed Er:YAG laser radiation. In: JOFFE, S. N. (Ed.). **Laser surgery**: advanced characterization, therapeutics, and systems II. [S. l.: s.n.], 1997. V. 1200. P. 379-386.

HIBST, R.; STOCK, K.; GALL, R.; KELLER, U. Er:YAG laser for endodontics: efficiency and safety. In: WIDGOR, H.; FEATHERSTONE, J. D. B.; RECHMANN, P. (Eds.). [S. l.: s. n.], 1997. V. 3192. P. 14-21.

HOLT, S. C.; BRAMANTI, T. E. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v. 2, n. 2, p. 177-281, 1991.

IMLAY, J. A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**, Washington, v. 240, n. 4857, p. 1302-1309, June 1988.

INSTITUTE FOR ADVANCED DENTAL TECHNOLOGIES. The laser course: a clinical training seminar. Southfield: [s.n.], 2000.

JEANSONNE, M.; WHITE, R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antibacterial endodontic irrigants. **J Endod**, Chicago, v. 20, n. 6, p. 276-278, June 1994.

JELINKOVÁ, H.; DOSTALOVÁ, T; DUSKOVÁ, J.; KRÁTKY, M.; MIYAGI, M.; SHOJI, S.; SULC, J.; NEMEC, M. Er:YAG and Alexandrite laser irradiation propagation in root canal nad its effect on bacteria. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 17, n. 6, p. 162-172, June 1999.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 20, n. 3, p. 340-49, Sept. 1965.

KATEBZADEH, N.; HUPP, J.; TROPE, M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 5, p. 364-368, May 1999.

KELLER, U.; HIBST, R. Ultrastructural changes and dentin following Er:YAG laser radiation on teeth. In: JOFFE, S. N.; ATSUMI K. (Eds.). **Laser surgery: advanced characterization, therapeutics, and systems II**. [S. l.: s. n.], 1990. V. 1200. P. 408-415.

KESLER, G.; KORE, R.; KESLER, A.; GAL, R. Histological and scanning electron microscope examination of root canal following preparation with Er:YAG laser microprobe. A preliminary in vitro study. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 7., 2000, Brussels. **Abstracts...** Brussels: ISLD, 2000. P. 24.

KIMURA, Y.; WILDER-SMITH, P.; MATSUMOTO, K. Lasers in endodontics: a review. **Int Endod J**, London, v. 33, n. 33, p. 173-185, May 2000.

KLAYMAN, S. M., BRILLIANT, J. D. A comparison of serial preparation versus Giromatic preparation. **J Endod**, Chicago, v. 1, n. 10, p. 334-337, Oct. 1975.

KLINKE, T.; WOLFGANG, K.; GUTKNECHT, N. Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 15, n. 1, p. 29-31, Feb. 1997.

KOBA, K.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K.; TAKEUCHI, T.; IKARUGI, T.; SHIMIZU, T. A histopathological study of the morphological changes at the apical seat and in the periapical region after irradiation with a pulsed Nd:YAG laser. **Int Endod J**, London, v. 31, p. 415-420, 1998.

KOBA, K.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K.; TAKEUCHI, T.; IKARUGI, T.; SHIMIZU, T. Histopathological study of the effects of pulsed Nd:YAG laser irradiation on infected root canal in dogs. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 3, p. 151-154, Mar. 1999.

KOOPAH, A. R.; LEE, S.; GEE, L.; WHITE, J. M. Physical modification and ablation threshold of dentin by YAG lasers. **J Dent Res**, Chicago, v. 75, p. 91, 1996. (Resumo n. 586)

KORZEN, B.; KRAKOW, A.; GREEN, D. Pulpal and periapical tissue responses in conventional and noninfected gnotobiotics rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 37, n. 5, p. 783-802, May 1974.

KOUCHI, Y.; NINOMIYA, J.; YASUDA, H.; FUKUI, K.; MORIYAMA, T.; OKAMOTO, H. Location of *Streptococcus mutans* in the dentinal tubules of open infected root canals. **J Dent Res**, Copenhagen, v. 59, n. 12, p. 2038-2046, Dec. 1980.

KURUVILLA, J.; KAMATH, M. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.25 chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. **J Endod**, Chicago, v. 24, n. 7, p. 472-476, July 1998.

LAGE-MARQUES, J. L. A study of microscopic changes of apical and intracanal dentin surface after laser irradiation. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 13, n. 3, p.113-115, 1995.

LAGE-MARQUES, J. L.; EDUARDO, C. P.; MATSUMOTO, K. A study on morphological changes of the root canal lased by pulsed Nd:YAG laser. **Japan Endod Assoc**, Showa, v. 16, n. 1, p. 64-69, June 1995.

LAN, W. H. Temperature elevation on the root surface during Nd:YAG laser irradiation in the root canal. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 3, p. 155-156, Mar. 1999.

LANDERS, R. R.; CALHOUN, R. L. One-appointment endodontic therapy: an opinion survey. **J Endod**, Chicago, v. 6, n. 10, p. 799-801, Oct. 1980.

LANGELAND, K.; RODRIGUEZ, H.; DOWDEN, W. Periodontal disease, bacteria and pulpal histopathology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 37, n. 2, p. 257-270, Feb. 1974.

LEE, B. S.; SHOJI, S.; NEMOTO, M. Thermal behaviors of root canal after Er:YAG laser irradiation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 7., 2000, Brussels. **Abstracts...** Brussels: ISLD, 2000. P. 27.

LEONARDO, M. R.; ALMEIDA, W. A.; BEZERRA DA SILVA, L. A., UTRILLA, L. S. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. **J Endod**, Chicago, v. 21, n. 3, p. 137-141, Mar. 1995.

LEVY, G. Cleaning and shaping the root canal with a Nd:YAG laser beam: a comparative study. **J Endod**, Chicago, v. 18, n. 3, p. 123-127, Mar. 1992.

LIU, H. C.; LIN, C. P.; LAN, W. H. Sealing depth of Nd:YAG laser on human dentinal tubules. **J Endod**, Chicago, v. 23, n. 11, p. 691-693, Nov. 1997.

MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in rubi. **Nature**, London, v. 187, p. 493-494, 1960.

MARSH, P. D.; MCKEE, A. S.; MCDERMID, A. S. Continuous culture study. In: SHAH H. N., MAYRAND D., GENCO R. J. (Eds.). **Biology of the species *Porphyromonas gingivalis***. Boca Raton: CRC Press, 1993. P. 105-132.

MARSHALL, G. W. Dentin: microstructure and characterization. **Quintessence Int**, Carol Stream, v. 24, n. 9, p. 606-617, Sept. 1993.

MATSUOKA, E.; YONAGA, K.; KINOSHITA, J. I.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K. Morphological study on the capacity of Er:YAG laser irradiation for root canal preparation. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 18, n. 4, p. 215-219, Apr. 2000.

MCKAY, G. S. The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth. **Arch Oral Biol**, New York, v. 21, n. 1, p. 51-58, 1976.

MEHL, A.; FOLWACZNY, M.; HAFFNER, C.; HICKEL, R. Bactericidal effects of 2.94 μm Er:YAG laser radiation in dental root canals. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 7, p. 490-493, July 1999.

MISERENDINO, L. J.; PICK, R. M. **Lasers in dentistry**. Chicago: Quintessence, 1995. 341 p.

MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, London, v. 31, n.1, p. 1-7, Jan. 1998.

MÖLLER, A. J. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. **Odontol Tidskr**, Stockholm, v. 74, p. 1-380, 1966. Número especial.

MÖLLER, A. J.; FABRICIUS, L.; DAHLEN, G.; ÖHMAN, A. E.; HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 89, n. 6, p. 475-484, Dec. 1981.

MOODNIK, R. M; DORN, S. O.; FELDMAN, M. J.; LEVEY, M.; BORDEN B. G. Efficacy of biomechanical instrumentation: a scanning electron microscopic study. **J Endod** , Chicago, v. 2, n. 8, p. 261-266, Sept. 1976.

MORITZ, A.; DOERTBUDAK, O.; GUTKNECHT, N.; GOHARKHAY, K.; SCHOOP, U.; SPERR, W. Nd:YAG laser irradiation of infected root canals in combination with microbial examinations. **J Am Dent Assoc**, v. 128, n. 11, p. 1525-1529, Nov. 1997a.

MORITZ, A.; GUTKNECHT, N.; GOHARKHAY, K.; SCHOOP, U.; WERNISCH, J.; SPERR, W. *In vitro* irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. **Quintessence Int**, v. 28, n. 3, p. 205-209, Mar. 1997b.

MORITZ, A.; GUTKNECHT, N.; SCHOOP, U.; GOHARKHAY, K.; DOERTBUDAK, O.; SPERR, W. Irradiation of infected root canals with a diode laser *in vivo*: results of microbiological examinations. **Laser Surg Med**, v. 21, n. 3, p. 221-226, 1997c.

MORITZ, A.; JAKOLITSCH, S.; GOHARKHAY, K.; SCHOOP, U.; KLUGER, W.; MALLINGER, R.; SPERR, W.; GEORGOPOULOULOS, A. Morphologic changes correlating to different sensitivities of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* to Nd:YAG laser irradiation through dentin. **Laser Surg Med**, v.26, n. 3, p. 250-261, 2000.

MORITZ, A.; SCHOOP, U.; GOHARKHAY, K.; JAKOLITSCH, S.; KLUGER, W.; WERNISCH, J.; SPERR, W. The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG

and Er:YAG laser irradiation in the root canal: an *in vitro* comparison. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v. 17, n. 4, p. 161-164, Apr. 1999.

MORSE, D. R. The endodontic culture technique: an impractical and unnecessary procedure. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 793-806, Oct. 1971.

MOSHONOV, J.; ØRSTAVIK, D.; YAMAUCHI, S.; PETTIETTE, M.; TROPE, M. Nd:YAG laser irradiation in root canal disinfection. **Endod Dental Traumatol**, v. 11, n. 5, p.220-224, Oct. 1995a.

MOSHONOV, J.; SION, A.; KASIRER, J.; ROTSTEIN; STABHOLZ, A. Efficacy of argon laser irradiation in removing intracanal debris. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 79, n. 2, p. 221-225, Feb. 1995b.

NAIR, P. N. R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K. E.; SUNQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. **J Endod**, Chicago, v. 16, n. 12, p. 580-588, Dec. 1990.

NAKAMICHI, I.; IWAKU, M.; FUSAYAMA, T. Bovine teeth as possible substitute in the adhesion test. **J Dent Res**, Chicago, v. 62, n. 10, p. 1076-1081, Oct. 1983.

NERWICH, A.; FIGDOR, D.; MESSER, H. H. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. **J Endod**, Chicago, v. 19, n. 6, p. 302-306, June 1993.

NODA, M.; KOMATSU, H.; INOUE, S.; SANO, H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exsudate of persistent apical periodontitis. **J Endod**, Chicago, v. 26, n. 4, p. 161-164, Apr. 1999.

NUEBLER-MORITZ, M.; GUTKNECHT, N.; SAILER, H. F.; HERING, P.; PRETTL, W. Laboratory investigation of the efficacy of holmium:YAG laser irradiation in removing intracanal debris. In: WIGDOR, H.A.; FEATHERSTONE, J. D. B.; RECHMANN, P. (Eds.). **Lasers in dentistry III**. [S. n.], 1997. V. 2973. P. 150-56.

OGUNTEBI, B. R. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. **Int Endod J**, London, v. 27, n. 4, p. 218-222, July 1994.

OHARA, P., TORABINEJAD, M.; KETTERING, J. M. Antibacterial Effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 9, n. 3, p. 95-100, June 1993.

OLIET, S. Single-visit endodontics: a clinical study. **J Endod**, Chicago, v. 9, n. 4, p. 147-152, Apr. 1983.

ØRSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 6, n. 4, p. 142-149, Aug. 1990.

ØRSTAVIK, D.; KERESKES, K.; MOLVEN, O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. **Int Endod J**, London, v. 24, n. 1, p. 1-7, Jan. 1991.

PADAN, E.; ZILBERSTEIN, D.; SCHULDINER, S. pH homeostasis in bacteria. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 650, n. 213, p.151-166, Dec. 1981.

PECIULIENE, V.; BALCIUNIENE, I.; ERIKSEN, H.; HAAPASALO, M.

Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a lithuanian population. **J Endod**, Chicago, v. 26, n. 10, p. 593-595, Oct. 2000.

PEKRUHN, R. B. The incidence of failure following single-visit endodontic therapy. **J Endod**, Chicago, v. 12, n. 2, p. 68, 1986.

PEREZ, F.; CALAS, P.; FALGUEROLLES, A. M. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. **J Endod**, Chicago, v. 19, n.6, p. 297-301, June 1993a.

PEREZ, F.; ROCHA, T.; LODTER, J. P.; CALAS, P.; MICHEL, G. *In vitro* study of the penetration of three bacterial strains in root dentine. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 76, n. 1, p. 97-103, July 1993b.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; MOORER, W. R. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. **Int Endod J**, London, v. 33, n. 1, p. 28-35, Jan. 2000.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; MOORER, W. R. The fate and role of bacteria left in root dentinal tubules. **Int Endod J**, London, v. 28, n. 2, p. 95-99, Mar. 1995.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; BUIJS, J. F.; WINKELHOFF, A. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **J Endod**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 76-81, Feb. 2001.

PINI, R.; SALIMBENI, R.; VANNINI, M.; BARONE, R. Laser dentistry: a new application of excimer in root canal therapy. **Lasers Surg Med**, New York, v. 9, n. 4, p. 352-357, 1989.

RAMSKÖLD, L. O.; FONG, C. D.; STROMBER, G. T. Thermal effects and antibacterial properties of energy levels required to sterilize stained root canals with a Nd:YAG laser. **J Endod**, Chicago, v. 23, n. 2, p. 96-100, Feb. 1997.

RECHMANN, P.; GOLDIN, D. S.; HENNIG, T. Er:YAG lasers in dentistry: an overview. In: FEATHERSTONE, J. D. B.; RECHMANN, P.; FRIED, D. S. (Eds.). **Lasers in dentistry IV**. [S. l.: s.n.], 1998. V. 3248. P. 2-13.

REIT, C.; DAHLÉN, G. Decision making analysis of endodontic treatment strategies in teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, London, v. 21, n. 5, p. 291-299, Sept. 1988.

ROONEY, J.; MIDDA, M.; LEEMING, J. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a Nd:YAG laser. **Br Dent J**, London, v. 176, n. 2, p. 61-64, Jan. 1994.

SAFAVI, K. E.; SPANGBERG, L. S. W.; LANGELAND, K. Root canal dentinal tubule disinfection. **J Endod**, Chicago, v. 16, n. 5, p. 207-210, May 1990.

SAFAVI, K. E.; DOWDEN, W.; INTROCASO, J. H.; LANGELAND, K. A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine-potassium iodide. **J Endod**, Chicago, v. 11, n. 10, p. 454-456, Oct. 1985.

SAFAVI, K. E.; NICHOLS, F. C. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. **J Endod**, Chicago, v. 19, n. 2, p. 76-78, Feb. 1993.

SALZGBERG, R. M.; BRILLIANT, J. D. An in vivo evaluation of the penetration of an irrigant solution in root canals. **J Endod**, Chicago, v. 3, n. 10, p. 394-398, 1977.

SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 269-296, Apr. 1974.

SEN, B. H.; PISKIN, B.; DEMIRCI, T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 11, n.1, p. 6-9, Feb. 1995.

SIQUEIRA Jr., J. F.; LOPES, H. P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. **Int Endod J**, London, v. 32, n. 5, p. 361-369, Sept. 1999.

SIQUEIRA Jr., J. F.; UZEDA, M.; FONSECA, M. E. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. **J Endod**, Chicago, v. 22, n. 6, p. 308-310, June 1996.

SIQUEIRA Jr., ROÇAS, I. N. ; FAVIERI, A.; LIMA K. C. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. **J Endod**, Chicago, v. 26, n. 6, p. 331-334, June 2000.

SIQUEIRA Jr., J. F.; UZEDA, M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. **J Endod**, Chicago, v. 22, n. 12, p. 674-676, Dec. 1996.

SIREN, E. K.; HAAPASALO, M. P. P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E. N. J. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **Int Endod J**, London, v. 30, n. 2, p. 91-95, Mar. 1997.

SHOVELTON, D. S. The presence and distribution of microorganisms within non vital teeth. **Br Dent J**, London, v. 117, p.101-107, Aug. 1964.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, S.; SPANGBERG, L.; SUNDQUIST, G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int Endod J**, London, v. 24, n. 3, p. 119-125, May 1991.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, S.; PERSSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of infection at the time of root canal treatment of teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, London, v. 30, n. 5, p. 297-306, Sept. 1997.

SOLTANOFF, W. A comparative study of the single-visit and the multiple-visit endodontic procedures. **J Endod**, Chicago, v. 4, n. 9, p. 278, 1978.

SPANGBERG, L. Endodontic medicaments. In: SMITH, D. C.; WILLIAMS, D. F. (Eds.). **Biocompatibility of dental materials**. Boca Raton: CRC Press, 1982. P. 223-257.

STABHOLZ, A.; KETTERING, J.; NEEV, J.; TORABINEJAD, M. Effects of the XeCl excimer laser on *Streptococcus mutans*. **J Endod**, Chicago, v. 19, n. 5, p. 232-235, May 1993a.

STABHOLZ, A. Lasers in endodontics. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 6., 1998, Hawaii. **Proceedings...** Utah: International Society for Lasers in Dentistry, 1998. P. 7-11.

STABHOLZ, A.; NEEV, J.; LIAW, L. H. L.; KHAYAT, A.; TORABINEJAD, M.
Sealing of human dentinal tubules by Xe-CI 308-nm excimer laser. **J Endod**,
Chicago, v. 19, n. 6, p. 267-271, June 1993b.

STEPHAN, B.; WELLINGS, H.; RAAB, W. H. M. Microbial effects of Er:YAG
laser irradiation on infected root canals. **J Dent Res**, Copenhagen, v. 78, p.
385, 1999. (Resumo IADR n. 2240)

STERN, R. H.; SOGNNAES, R. F. Laser beam effect on dental hard tissues.
J Dent Res, Chicago, v. 43, p. 873, 1964. Suplemento. (Resumo n. 307)

STEVENS, R. H.; GROSSMAN, L. I. Evaluation of the antimicrobial effect of
calcium hydroxide as an intracanal medicament. **J Endod**, Chicago, v. 9, n.
9, p. 372-374, Sept. 1983.

STEWART, G. C. The importance of chemomechanical preparation of the
root canal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 8, p. 993-997,
Sept. 1955.

STREFEZZA, C.; ZECELL, D. M.; BACHMANN, L.; CECCHINI, S. C.;
PINOTTI, M.; EDUARDO, C. P. Efeitos térmicos da irradiação intracanal do
laser de Nd:YAG. In: REUNIÃO CIENTÍFICA DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA, 16., 1999, Águas de São

Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro : SBPqO, 1999. P. 17. (Resumo n. 46)

STUART, K. G.; MILLER, C. H.; BROWN, C. E.; NEWTON, C. W. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 72, n. 1, p. 101-104, July 1991.

SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 7, n. 5, p. 257-262, Oct. 1992.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 78, n. 4, p. 522-529, Oct. 1994.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented Bacteroides species in root canal infections. **J Endod**, Chicago, v. 15, n. 1, p. 13-19, Jan. 1989.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJÖGREN, U. Microbiological analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan. 1998.

SUNDQVIST, G. K. **Bacteriological studies of necrotic dental pulps.**

Umea. University of Umea, 1976. 94 p. (Umea University Odontological Dissertations, n. 7).

TAKEDA, F. H.; HARASHIMA, T.; ETO, J. N.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K.

Effect of Er:YAG laser treatment on the root canal walls of human teeth: an SEM study. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 14, n. 6, p. 270-273, Dec. 1998a.

TAKEDA, F. H.; HARASHIMA, T.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K. Efficacy of Er:YAG laser irradiation in removing debris and smear layer on root canal walls. **J Endod**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 548-551, Aug. 1998b.

TORABINEJAD, M.; UNG, B.; KETTERING, J. D. *In vitro* bacterial penetration of coronal unsealed endodontically treated teeth. **J Endod**, Chicago, v. 16, n. 12, p. 566-569, Dec. 1990.

TRONSTAD, L. Recent development in endodontic research. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 100, n. 1, p. 52-59, Feb. 1992.

TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 6, n. 2, p. 73-77, Apr. 1990a.

TRONSTAD, L.; KRESHTOOL, D.; BARNETT, F. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v. 6, n. 3, p. 129-136, June 1990b.

TRONSTAD, L.; ANDREASEN, J. O.; HASSELGREN, G.; KRISTERSON, L.; RIIS, I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **J Endod**, Chicago, v. 7, n. 1, p. 7-21, Jan. 1981.

TROPE, M.; DELANO, E. O.; ØRSTAVIK, D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 5, p. 345-350, May 1999.

TSENG, P.; GILKESON, C. F.; PALMER, J.; LIEW, V. The bactericidal effect of a Nd:YAG laser *in vitro*. **J Dent Res**, Chicago, v. 70, p. 650, 1991.
(Resumo n. 7)

UMEZU, A.; KANEKO, N.; TOYAMA, Y.; WATANABE, Y.; ITOH, H.
Appearance of osteoclasts by injection of lipopolysaccharides in rat

periodontal tissue. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 24, n. 6, p. 378-383, Nov. 1989.

Van NOORT, R. **Introduction to dental materials**. London: Mosby, 1994. 236 p.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1995. 1361 p.

WEICHMAN, J. A.; JOHNSON, F. M. Laser use in endodontics. A preliminary investigation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 31, n. 3, p. 416-420, Mar. 1971.

WEICHMAN, J. A.; JOHNSON, F. M.; NITTA, L. K. Laser use in endodontics. Part II. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 34, n. 5, p. 828-830, Nov. 1972.

WHITE, J. M.; GOODIS, H. E.; COHEN, J. N. Bacterial reduction of contaminated dentin by Nd:YAG laser. **J Dent Res**, Chicago, v. 70, p. 412, 1991. (Resumo n. 1170)

WHITE, J. M.; GOODIS, H. E.; MARSHALL Jr., G. W.; MARSHALL, S. J. Identification of the physical modification threshold dentin induced by

neodymium and holmium YAG lasers using scanning microscopy. **Scanning Microsc**, Chicago, v. 7, n. 1, p. 239-246, Mar. 1993.

WINKLER, K. C.; VAN AMERONGEN, J. Bacteriologic results from 4,000 root canal cultures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 12, p. 857-875, July 1959.

WIRTH, R.; AN, F. Y.; CLEWELL, D. B. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. **J Bacteriol**, Baltimore, v. 165, n. 3, p. 831-836, Mar. 1986.

WITTE, W.; WIRTH, R.; KLARE, I. Enterococci. **Chemotherapy**, Basel, v. 45, n. 2, p. 135-145, Mar./Apr. 1999.

ZAKARIASEN, K. L.; DEDERICH, D. N.; TULIP, J.; DE COSTE, S.; JENSEN, S. E.; PICKARD, M. A. Bacterial action of carbon dioxide laser irradiation in experimental dental root canals. **Can J Microbiol**, Ottawa, v. 32, n. 12, p. 942-946, Dec.1986.

ZHANG, C.; KIMURA, Y.; MATSUMOTO, K.; HARASHIMA, T.; ZHOU, H. Effects of pulsed lased Nd:YAG laser irradiation on root canal wall dentin

with different lasers initiators. **J Endod**, Chicago, v. 24, n. 5, p. 352-355, May 1998.

SUMMARY

DISINFECTION OF INTRACANAL DENTIN BY Nd:YAG, Ho:YAG AND Er:YAG LASER IRRADIATION: AN *IN VITRO* MODEL

A possible cause for root canal failure is the persistence of bacteria that have colonized dentinal tubules. To reduce this risk and, if possible, to also shorten the time-consuming endodontic therapy, new equipment and materials are constantly being introduced. The aim of the present investigation was to study the effect of disinfection of dentinal tubules by intracanal laser irradiation using an *in vitro* model. The groups irradiated by various lasers were compared with calcium hydroxide, a material frequently used as intracanal medication between appointments. Freshly extracted, intact bovine incisors were used. The root cementum was removed and the teeth cut to produce 180 standardized specimens. For bacterial colonization, specimens were incubated at 37°C in test tubes with Tryptic Soy Broth and *Enterococcus faecalis*, which carried a plasmid that allowed the growth in a selective medium containing chloramphenicol. The specimens were divided in five treatment groups and three control groups. For irradiation, pulsed delivered Ho:YAG laser at 2.1 µm, Nd:YAG laser (1.06 µm), and Er:YAG

laser (2.94 μ m) with and without air/water coolant, were used. Lasers groups received three different laser settings for treatment: output energy below the physical modification threshold ($\frac{1}{2}$ of PMT) for 60 sec, at the PMT for 60 sec and above the PMT (120 sec). Group 5 received a seven-day treatment with calcium hydroxide. As controls, three specimens for each treatment group received sterile water instead of bacteria (negative control), three received iodine potassium-iodide after bacterial exposure (negative control), and three did not receive treatment after bacterial exposure (positive control). The number of bacteria was estimated by counting CFU. In order to evaluate whether the lasers used in the experiment could be absorbed by the bacteria *E. faecalis*, an UV, VIS and NIR spectra were obtained using a spectrophotometer. Statistical analysis showed the bacterial reduction as follow: Ho:YAG laser > hidróxido de cálcio > Nd:YAG laser > Er:YAG laser with air/water coolant > Er:YAG laser without air/water coolant. There was a significantly higher bacterial reduction in the group irradiated by the Ho:YAG at the PMT (50mJ, 10 Hz, 66 J/cm² for 120 sec), followed by Ho:YAG irradiated at 50mJ, 10 Hz, 33 J/cm² for 60 sec, and the group that received calcium hydroxide. The latter two groups were not significantly different. The UV and VIS absorbance spectrum presented two absorbance peaks at 361nm and 337nm (UV). The NIR spectrum revealed a very low absorbance by the *E. faecalis*.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

APÊNDICE 1 - Lasers utilizados em odontologia e suas características

Tipo de Laser	Comprimento de Onda	Cor	Meio Ativo	Maior Absorvente Biológico/Químico	Sistema de Entrega	Modo de Emissão
ArF Excimer	193 nm	Ultravioleta (Invisível)	Gás	Água, Colágeno, Albumina, Queratina, Sulfato, Hidróxiapatita	Sistema de lentes e espelhos fixos convencionais	Pulsado
KrF Excimer	248 nm	Ultravioleta (Invisível)	Gás	Melanina, Hemoglobina, Água e Hidroxiapatita (fracamente)	Braço Articulado	Pulsado
XeCl Excimer	308 nm	Ultravioleta (Invisível)	Gás	Melanina, Hemoglobina	Fibra Óptica	Pulsado
Alexandrita (frequência dupla)	377 nm	Ultravioleta (Invisível)	Sólido	Melanina, Hemoglobina, Cálculos	Fibra Óptica	Pulsado
Argônio	488 nm e 514,5 nm	Azul, Verde	Gás	Canforoquinona, Xantophyll (488nm); Hemoglobina e Melanina (488nm e 514,5 nm)	Fibra Óptica	Contínuo
Hélio-Neônio	632 nm	Vermelho	Gás	Melanina	Fibra Óptica, Braço Articulado	Contínuo
Rubi	694,3 nm	Vermelho	Sólido	Melanina	Fibra Óptica	Contínuo e Pulsado

continua

conclusão

Tipo de Laser	Comprimento de Onda	Cor	Meio Ativo	Maior Absorvente Biológico/Químico	Sistema de Entrega	Modo de Emissão
Diodo	805-820 nm	Infravermelho Próximo (Invisível)	Sólido	Melanina, Água, Hemoglobina (fracamente)	Fibra Óptica	Contínuo e Pulsado
Neodímio:YAG e Neodímio:YSGG	1,064 μ m 1,061 μ m	Infravermelho Próximo (Invisível)	Sólido	Melanina, Água, Dentina, Hemoglobina Oxigenada (fracamente)	Fibra Óptica	Pulsado e Contínuo
Neodímio:YAP	1,34 μ m	Infravermelho Próximo (Invisível)	Sólido	Melanina, Água, Dentina	Fibra Óptica	Pulsado
Hólmio:YAG	2,12 μ m	Infravermelho Próximo (Invisível)	Sólido	Água, Dentina	Fibra Óptica	Pulsado
Érbio:YSGG e Érbio:YAG	2,79 μ m 2,94 μ m	Infravermelho Próximo (Invisível)	Sólido	Água, Hidroxiapatita (2,79 μ m e 2,94 μ m); Colágeno (2,94 μ m)	Braço Articulado, Fibra Óptica	Pulsado
Dióxido de Carbono	9,3 ; 9,6 μ m	Médio Infravermelho (Invisível)	Gás	Hidroxiapatita, Água	Sistema de Lentes	Pulsado
Dióxido de Carbono	10,6 μ m	Médio Infravermelho (Invisível)	Gás	Água, Hidroxiapatita	Braço Articulado, Guia de Onda Oco	Contínuo e Pulsado

APÊNDICE 2

APÊNDICE 2 - O diagrama mostra uma porção do espectro eletromagnético da maioria dos lasers de interesse em odontologia. Estendendo além dos raios X para a esquerda estão os raios gama, cujos comprimentos de onda estão na ordem de 10^{-12} metro; microondas e ondas de rádio se estendem além da longínqua porção do infravermelho para a direita, cujas ondas podem apresentar milhares de metros em comprimento (Institute, 2000).

APÊNDICE 3

APÊNDICE 3 – Resultados originais do número de colônias nas várias condições experimentais e de controle

QUADRO Ap. 3.1 – Água estéril (espécime não infectado) - controle negativo (CN1) para o Grupo 1

Espécime	Número de Colônias - n = 3			Média
<u>CN1.1</u>	0	0	0	0
CN1.2	0	0	0	0
CN1.3	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.2 – Iodo em solução de iodeto de potássio (KI₃) – controle negativo (CN2) para o Grupo 1

Espécime	Número de Colônias - n = 3			Média
<u>CN2.1</u>	0	0	0	0
CN2.2	0	0	0	0
CN2.3	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.3 – Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 1

Espécime	Número de Colônias - n = 3			Média
<u>C1</u>	590	595	564	583
C2	784	780	574	713
C3	520	576	570	555
Média Total				617

QUADRO Ap. 3.4 – Grupo 1A: laser de hólmio:YAG a 50 mJ, 15 Hz e 33J/cm², por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias – n = 3			Média
<u>1</u>	121	100	120	114
2	159	158	157	158
3	170	139	176	162
4	160	137	165	151
5	160	137	157	151
6	97	106	98	100
7	97	113	107	106
8	150	160	155	155
9	103	106	127	112
10	135	145	123	134
Média Total				134

QUADRO Ap. 3.5 – Grupo 1B: laser de hólmio:YAG a 50 mJ, 15 Hz e 66J/cm², por 120 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - n = 3			Média
<u>11</u>	50	47	40	46
12	52	48	40	47
13	15	33	17	22
14	55	65	59	60
15	57	65	55	59
16	28	32	42	34
17	36	23	21	27
18	45	48	35	43
19	53	55	60	56
20	32	29	42	34
Média Total				43

QUADRO Ap. 3.6 – Água estéril (espécime não infectado) - controle negativo (CN1) para o Grupo 2

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN1.4</u>	0	0	0	0
CN1.5	0	0	0	0
CN1.6	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.7 – KI₃- controle negativo (CN2) para o Grupo 2

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN2.4</u>	0	0	0	0
CN2.5	0	0	0	0
CN2.6	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.8 – Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 2

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>C4</u>	688	640	650	659
C5	608	680	696	661
C6	690	620	670	660
Média Total				660

QUADRO Ap. 3.9 – Grupo 2A: laser de neodímio:YAG laser a 50 mJ, 10 Hz e 29J/cm², por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>21</u>	280	176	254	237
22	396	408	410	407
23	380	275	184	280
24	448	300	365	371
25	160	192	185	179
26	412	304	366	361
27	304	200	280	261
28	438	412	418	423
29	354	380	396	377
30	275	304	386	322
Média Total				321

QUADRO Ap. 3.10 – Grupo 2B: laser de neodímio:YAG laser a 100 mJ, 10Hz e 58 J/cm², por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>31</u>	284	304	299	296
32	272	400	325	332
33	476	308	346	377
34	396	300	330	342
35	416	360	390	389
36	424	296	335	352
37	356	300	320	325
38	346	306	295	316
39	315	287	302	301
40	272	364	385	340
Média Total				337

QUADRO Ap. 3.11 – Grupo 2C: laser de neodímio:YAG laser a 100 mJ, 10Hz e 116 J/cm², por 120 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>41</u>	172	200	190	187
42	196	184	206	195
43	236	188	210	211
44	304	200	220	241
45	184	272	250	235
46	172	120	180	157
47	440	588	500	509
48	213	320	282	272
49	196	207	306	236
50	358	286	301	315
Média Total				256

QUADRO Ap. 3.12 – Água estéril (espécime não infectado) - controle negativo (CN1) para o Grupo 3

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN1.7</u>	0	0	0	0
CN1.8	0	0	0	0
CN1.9	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.13 – KI₃ - controle negativo (CN2) para o Grupo 3

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN2.7</u>	0	0	0	0
CN2.8	0	0	0	0
CN2.9	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.14 – Ausência de tratamento – controle positivo(C) para o Grupo 3

Espécime	Número de Colônias- Para n = 3			Média
<u>C7</u>	700	780	610	697
C8	790	630	820	747
C9	810	770	800	793
Ó C(7-9)	-----	-----	-----	746

QUADRO Ap. 3.15 – Grupo 3A: laser de érbio:YAG a 25 mJ, 10 Hz e 16J/cm², por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>51</u>	580	550	690	607
52	670	700	665	678
53	592	758	665	672
54	667	712	598	703
55	670	738	703	704
56	740	750	670	720
57	700	670	750	706
58	704	766	690	720
59	619	595	694	636
60	651	678	702	677
Média Total				682

QUADRO Ap. 3.16 – Grupo 3B: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 32J/cm², por 60 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>61</u>	675	610	650	645
62	580	620	650	617
63	632	645	580	619
64	695	595	706	665
65	658	689	672	673
66	672	613	702	662
67	634	650	670	651
68	702	670	701	691
69	623	610	623	618
70	654	680	620	651
Média Total				649

QUADRO Ap. 3.17 – Grupo 3C: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 64J/cm², por 120 segundos; sem refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>71</u>	602	680	711	664
72	709	720	711	713
73	676	634	702	671
74	724	711	715	717
75	643	641	651	645
76	680	684	705	690
77	675	731	655	687
78	625	620	700	648
79	681	702	622	668
80	701	721	680	701
Média Total				680

QUADRO Ap. 3.18 – Água estéril (espécime não infectado) – controle negativo (CN1) para o Grupo 4

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN1.10</u>	0	0	0	0
CN1.11	0	0	0	0
CN1.12	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.19 – KI_3 – controle negativo (CN2) para o Grupo 4

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN2.10</u>	0	0	0	0
CN2.11	0	0	0	0
CN2.12	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.20 – Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 4

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>C10</u>	580	540	580	567
C11	570	570	570	570
C12	750	680	690	707
Média Total				615

QUADRO Ap. 3.21 – Grupo 4A: laser de érbio:YAG a 25 mJ, 10 Hz e $16J/cm^2$, por 60 segundos, refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>81</u>	580	540	550	557
82	650	570	560	593
83	582	648	551	594
84	581	577	588	582
85	655	565	602	607
86	582	574	606	587
87	580	551	579	570
88	587	643	570	600
89	543	550	540	544
90	620	642	581	614
Média Total				585

QUADRO Ap. 3.22 – Grupo 4B: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 32J/cm², por 60 segundos, refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>91</u>	510	670	660	613
92	666	485	650	600
93	671	619	650	647
94	590	568	570	576
95	559	671	650	627
96	580	673	657	637
97	490	650	570	570
98	640	591	580	604
99	672	671	580	641
100	660	625	664	650
Média Total				617

QUADRO Ap. 3.23 – Grupo 4C: laser de érbio:YAG a 50 mJ, 10 Hz e 64J/cm², por 120 segundos, refrigeração com água/ar

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>101</u>	560	480	460	500
102	590	599	545	578
103	603	647	588	613
104	623	658	625	635
105	641	559	482	561
106	542	516	510	523
107	626	630	493	583
108	620	499	631	583
109	435	635	462	511
110	537	550	490	526
Média Total				561

QUADRO Ap. 3.24 – Água estéril (espécime não infectado) - controle negativo (CN1) para o Grupo 5

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN1.13</u>	0	0	0	0
CN1.14	0	0	0	0
CN1.15	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.25 – KI₃ - controle negativo (CN2) para o Grupo 5

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>CN2.13</u>	0	0	0	0
CN2.14	0	0	0	0
CN2.15	0	0	0	0
Média Total				0

QUADRO Ap. 3.26 – Ausência de tratamento – controle positivo (C) para o Grupo 5

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>C13</u>	811	603	521	645
C14	648	688	588	641
C15	621	664	680	656
Média Total				647

QUADRO Ap. 3.27 – Grupo 5: hidróxido de cálcio por 7 dias

Espécime	Número de Colônias - Para n = 3			Média
<u>111</u>	186	150	171	169
112	222	199	167	196
113	157	164	205	175
114	132	149	175	152
115	139	135	142	139
116	143	213	139	165
117	139	149	155	194
118	126	179	135	147
119	141	109	132	127
120	170	201	211	194
Média Total				166

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte e comunicada, ao autor, a referência bibliográfica em que consta a citação.

SILVIA CRISTINA MAFRA CECCHINI

Universidade de São Paulo – Faculdade de
Odontologia – Departamento de Dentística –
Disciplina de Endodontia

São Paulo, 19 de junho de 2001

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade
Universitária – Butantã – São Paulo, SP –
Brasil – CEP 05508-900

E-mail

scecchini00@hotmail.com