ELIANA BARBOSA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA DESINFECÇÃO DA DENTINA RADICULAR EM
PROFUNDIDADE PROVOCADA PELA IRRADIAÇÃO DO LASER DE
DIODO DE ALTA POTÊNCIA**

São Paulo

2006

Eliana Barbosa de Souza

**Avaliação da desinfecção da dentina radicular em profundidade
provocada pela irradiação do laser de diodo de alta potência**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques

São Paulo

2006

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Elizabeth**, cuja confiança, apoio e principalmente ética e bondade me servem de exemplos, e para quem sabe um dia eu alcançar.

Às minhas irmãs, **Naná, Elaine e Raquel**, que sempre me apoiaram e pelo imenso amor que nos une.

À minha tia **Nanci** e meu sobrinho **Otávio**, com muito carinho.

Ao meu pai, **Edgard**, pela honestidade, trabalho, perseverança e ensinamentos.

Ao **Sérgio**, por todo apoio, incentivo e amizade, principalmente nas horas mais difíceis.

A **Silvia e Mônica** minhas amigas leais.

Aos meus avós e tios, professores e amigos.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**.

À **minha família** que suportou todas as incertezas, angústias e alegrias advindas deste trabalho.

Ao apoio de **Sérgio, Silvia e Mônica** durante toda a jornada.

Ao professor e orientador **Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques** pela liberdade, disponibilidade, exemplo e, sobretudo a confiança em mim depositada. Devo ao senhor a inspiração e perseverança na tentativa de ser melhor profissionalmente todo dia. Devo-lhe também a oportunidade da realização deste trabalho.

Às professoras de Microbiologia Oral, **Profa. Dra. Maria Regina Simionato** e **Profa. Dra. Silvana Cai** pelos ensinamentos desde a graduação, pela total solicitude e interesse na execução deste trabalho e finalmente, pela imensa paciência que tiveram com minha inexperiência.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana**, mestre desde a Especialização, Pós-Graduação, pelo carinho, paciência e aprendizado.

Ao **Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi**, pelos ensinamentos e experiência compartilhados.

Aos **professores Giulio Gavini e Celso Caldeira**, pela generosidade, apoio, incentivo e camaradagem compartilhados no Curso de Pós-Graduação, além dos ensinamentos.

Aos professores de Endodontia da FOUSP: **Abílio A. M. Moura, Carlos E. Aun, Igor Prokopowitsch, Manoel E. Machado, Marcelo dos Santos**, pelos ensinamentos.

Às amigas que fiz durante essa jornada: **Crystiane, Dirce, Andréa, Sueli, Soraia, Cláudia Carreira, Isabel, Roberto Cruz e Cristiana Azevedo** por todo apoio nas horas boas e difíceis, pelo carinho, compreensão e paciência.

Aos meus colegas do Curso de Pós-Graduação: **Lieni, Alexandre, Carmo, Adriana, Cristiane e Denise.**

A **Mary Caroline Skelton Macedo** e **Patrícia Ferrari**, que como professoras confiaram em mim.

À **Profa. Patrícia Freitas** do LELO-FOUSP, pela compreensão.

Aos funcionários do Departamento: **Ana Maria, Luiz, Sônia, Aldo e Arnaldo** pelo apoio.

À secretária da Pós-Graduação **Catia Tiezzi dos Santos.**

À **Gláucia e Agda**, da biblioteca da FOUSP pelo apoio e principalmente paciência com as correções necessárias.

Aos funcionários do **ICB-II** e **LELO-FOUSP**, pela presteza e solicitude.

Às Agências de Fomento à Pesquisa **FAPESP** e **CNPq** pelo auxílio na confecção deste trabalho.

MUITO OBRIGADA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Souza EB. Avaliação da desinfecção da dentina radicular em profundidade provocada pela irradiação do laser de diodo de alta potência [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, de de 2007.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion (infusão cérebro-coração)
CFU	Colony Formation Unit (unidade formadora de colônia)
cm	centímetro
DNA	ácido dextrorribonucleico
EDTA-T	ácido etileno diamino tetracético dissódico + tergentol
GaAlAs	Arseneto de Gálio-Alumínio
° C	grau Celsius
H	Hedströen
h	hora
IKI	iodo-iodeto de potássio
J	Joule
K	Kerr
kW/cm ²	kilowatt por centímetro quadrado
L	litro
μL	microlitro
μm	micrômetro
mL	mililitro
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MLCV	microscopia laser confocal de varredura
MTA	mineral trióxido agregado
NaOCl	hipoclorito de sódio
Nd:YAG	neodímio: ítrio-alumínio-granada
nm	nanômetro

#	número
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucléico
s	segundo
TSA	Tryptic Soy Agar (ágar de soja tripticase)
TSB	Tryptic Soy Broth (caldo de soja tripticase)
u.f.c.	unidade formadora de colônia
W	Watt

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 –	Espécime impermeabilizado por cianoacrilato e vedado nas regiões apical e cervical (à esquerda), imerso em silicona de condensação em tubo eppendorf (à direita).....	53
Figura 4.2 –	Espécimes montados em tubos eppendorfs (vista cervical)	54
Figura 4.3 –	Equipamento laser de diodo Opus 10	54
Figura 4.4 –	Esquema gráfico da coleta das amostras	54
Figura 4.5 –	Amostras em tubos eppendorfs e diluições	55
Figura 4.6 –	Aparelho agitador de tubos e motor elétrico para baixa rotação	55
Figura 4.7 –	Placas de Petri com controle positivo e negativo	56
Figura 4.8 –	Placas de Petri grupos 1,2 e 3	56
Gráfico 5.1 –	Gráfico das médias dos grupos	60
Gráfico 5.2 –	Gráfico das médias dos grupos – terço cervical	60
Gráfico 5.3 –	Gráfico das médias dos grupos – terço médio	61
Gráfico 5.4 –	Gráfico das médias dos grupos – terço apical	61
Quadro 5.1 -	Resultados da análise estatística Kruskal-Wallis	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Grupo 1: Resultados em u.f.c./mL.....	57
Tabela 5.2 - Grupo 2: Resultados em u.f.c./mL.....	58
Tabela 5.3 - Grupo 3: Resultados em u.f.c./mL.....	59

Souza EB. Avaliação da desinfecção da dentina radicular em profundidade provocada pela irradiação do laser de diodo de alta potência [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

A presença de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares é a principal causa do fracasso na terapia endodôntica. A importância da sanificação durante o preparo do canal fica clara, portanto. Dentre os microrganismos isolados nos casos de insucesso o *Enterococcus faecalis* é comumente encontrado. O *E. faecalis* é um microrganismo resistente à terapia endodôntica, à medicação intracanal de hidróxido de cálcio e sua presença contribui para o insucesso em Endodontia. A radiação laser apresenta características antimicrobianas que podem auxiliar no tratamento endodôntico. Esse estudo tem por objetivo avaliar o grau de descontaminação provocado pelo uso do laser de diodo de alta potência na dentina radicular em profundidade, após preparo químico-cirúrgico *in vitro*. Foram utilizadas 30 raízes de dentes unirradiculares – esterilizadas em autoclave - que depois de inoculadas por *E. faecalis* cepa ATCC 29212 durante 4 semanas, foram divididas em 3 grupos: grupo 1 instrumentação rotatória - K³ (Sybron Endo, Orange, CA, EUA) com hipoclorito de sódio 0,5 % e creme Endo PTC, irrigação final com EDTA-T 17 % e posterior irradiação com laser de diodo de alta potência com comprimento de onda 830 nm na potência de 3 W por 5 s com 4 repetições segundo Gutknecht; grupo 2 instrumentação, como grupo 1, sem irradiação e grupo 3 apenas irrigação com 20 mL de solução fisiológica estéril. Os espécimes foram divididos em três terços (cervical, médio e apical), tiveram suas paredes dentinárias desgastadas por brocas Batt e as

raspas, bem como o cilindro externo restante de dentina foram imersos em 1 mL de água peptonada. Assim alíquotas foram semeadas em meio seletivo mEnterococcus, em triplicata para contagem de unidades formadoras de colônias. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis com método de comparação Dunn e apresentaram as seguintes médias: Grupo 1 – 0, Grupo 2 – $2,77 \times 10^2$, Grupo 3 – 171×10^2 u.f.c./mL; com diferenças estatísticas significantes entre os 3 grupos ($p < 0,05$). Em porcentagens, a redução da microbiota provocada pelo Grupo 1 foi de 100% e do Grupo 2 de 98,39% ambas em relação ao Grupo 3 (controle). A irradiação do laser de diodo nos parâmetros e amostras testadas foi eficaz na redução da contaminação em profundidade da dentina radicular frente ao *Enterococcus faecalis*.

Palavras-Chave: Laser de diodo; Desinfecção; Endodontia; *Enterococcus faecalis*; Hipoclorito de sódio

Souza EB. Evaluation of root canal dentin disinfection in depth caused by high power diode laser irradiation [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The main cause for failure in Endodontics is the presence of microorganisms in root canal system. *Enterococcus faecalis* is a resistant microorganism presents in failure endodontic treatment. Therefore the disinfection plays fundamental rule in endodontic therapy. The laser irradiation presents properties that may improve the treatment success rates, reducing the microbial contamination. The aim of this study is evaluate the disinfection degree in depth caused by diode laser irradiation after chemomechanical procedures *in vitro*. Thirty extracted dental roots were sterilized by autoclave, inoculated by strain of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 during 4 weeks, and then randomly divided in 3 groups. Group 1: 10 specimens were instrumented by rotary files K³ (Sybron Endo, Orange, CA, USA) with 0.5 % sodium hypochlorite and urea peroxide (Endo PTC cream, Oficinalis Farmácia de Manipulação, São Paulo, SP, Brazil). At the end irrigation by 17 % EDTA-T was performed. The specimens were irradiated intracanal by diode laser 830 nm wavelength 3 W during 5 seconds, four times. Group 2: same procedures of group 1 without laser irradiation. Group 3: irrigation by saline solution. The specimens were divided in three thirds (apical, middle and cervical). Samples of dentin were obtained with carbide burs from inner

canal walls of each third. The samples were immersed in 1 mL of peptonic water, and then aliquots were sowed to count viable cells in mEnterococcus agar (Difco™, Becton Drive, NJ, USA). The groups showed the following means: Group 1 – 0, Group 2 – $2,77 \times 10^2$ and Group 3 – 171×10^2 CFU/mL. The disinfection degree achieved was 100 % in group 1, 98,39 % in group 2 both compared with group 3. The Kruskal-Wallis statistical analysis with Dunn method of comparison shows better results in group with diode laser irradiation ($p < 0.05$), followed by group 2 and 3. Irradiation by diode laser in that samples and parameters achieved disinfection improvement in root dentin depth.

Keywords: Diode laser; Disinfection; Endodontics; *Enterococcus faecalis*; Sodium hypochlorite

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Terapêutica endodôntica	17
2.1.1 Preparo químico e medicação intracanal	17
2.1.2 Preparo cirúrgico	24
2.2 Aspectos microbiológicos	27
2.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	31
2.3 Lasers em Endodontia	37
2.3.1 Laser de diodo	42
3 PROPOSIÇÃO	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
5 RESULTADOS	57
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO	84

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da terapêutica endodôntica está alicerçado a uma eficaz descontaminação do sistema de canais radiculares que é conseguida, principalmente, durante o preparo químico-cirúrgico. Dificuldades anatômicas e execução inadequada da técnica são as principais causas para que essa contaminação persista não só no interior do canal principal, bem como na intimidade dos túbulos dentinários e canais secundários. A presença desses microrganismos é reportada como principal causa do insucesso no tratamento endodôntico, tanto por seus produtos metabólicos como por sua conseqüente formação de um foco de infecção. Além disso, a existência de microrganismos resistentes no interior do sistema de canais radiculares – principalmente em casos de retratamento onde o sucesso não foi conseguido numa primeira abordagem - faz com que mesmo a execução adequada da terapêutica endodôntica com rigor no controle da infecção não seja eficaz para garantir o sucesso do tratamento.

Dentre esses microrganismos reportados como responsáveis pelo insucesso em Endodontia está o *Enterococcus faecalis*, bactéria Gram positivo anaeróbio facultativo que apresenta resistência aos procedimentos da terapêutica endodôntica.

Para manter a sanificação conseguida pelo preparo químico-cirúrgico, e até mesmo alcançar os microrganismos que persistem ao último vários recursos são utilizados como medicação intracanal, diferentes tipos de soluções irrigadoras com alto potencial antimicrobiano, e diferentes tipos de radiação laser.

Analisando-se as propriedades da radiação laser, esta se apresenta como uma ferramenta na desinfecção do endodonto devido ao seu alto poder antimicrobiano.

Atualmente é comprovada a redução bacteriana no canal principal provocada por diversos tipos de laser. Seria interessante analisar a capacidade dessa radiação na descontaminação em profundidade da dentina que circunda o canal radicular, aumentando a eficácia da instrumentação endodôntica, pois microrganismos remanescentes nessa dentina podem causar o fracasso da terapêutica.

O laser de diodo de alta potência vem sendo testado em diversas áreas da Odontologia, com resultados promissores frente à desinfecção dentinária. Por suas propriedades e por seu baixo custo em face à maioria dos lasers utilizados em Endodontia, o laser de diodo apresenta-se como um recurso a ser testado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Terapêutica endodôntica

Na terapêutica endodôntica a fase de preparo dos canais radiculares é crítica no sucesso do tratamento. É durante essa fase que se promove a sanificação do sistema de canais radiculares, onde o aumento da permeabilidade dentinária é um dos pilares da mesma. É sabido que a ação das substâncias químicas auxiliares acarreta diminuição da quantidade de microrganismos presentes na luz do canal, e isso é sobretudo importante nos casos de polpa mortificada onde a incidência bacteriana é alta. Além disso, essas mesmas substâncias aumentam a permeabilidade dentinária permitindo a desinfecção em profundidade da dentina e facilitando o acesso da medicação intracanal à intimidade do canal radicular. São consideradas substâncias químicas auxiliares por serem utilizadas junto aos instrumentos durante o preparo químico-cirúrgico.

2.1.1 Preparo químico e medicação intracanal

Dentre as substâncias químicas auxiliares do preparo do canal radicular, o creme Endo PTC desenvolvido por Paiva e Antoniazzi associado ao hipoclorito de sódio 0,5 % é utilizado por suas características antimicrobianas, além de sua

consistência favorecer a cinemática da instrumentação. Esse creme tem em sua composição: peróxido de uréia (antimicrobiano com elevado potencial de liberação de oxigênio), Tween 80 (detergente molecular) e Carbowax (veículo). A reação provocada pelo uso de Endo PTC gotejado pelo Dakin proporciona efervescência que deve ser mantida durante toda a fase de instrumentação do sistema de canais. (PAIVA; ANTONIAZZI, 1973; 1988)

Para testar a tolerância tecidual provocada pela associação creme Endo PTC e Líquido de Dakin, Bombana et al. (1974) testaram em olho de coelho a instilação da associação com posterior irrigação com Tergentol®-Furacin®. Os autores observaram reação inflamatória discreta que praticamente desapareceu em 24 h e atribuíram a responsabilidade pela boa tolerância tecidual ao Carbowax presente na formulação.

Em estudo de Wey Filho et al. (1975) observaram 100 % de culturas negativas obtidas após 72 h do preparo, tanto em tempos experimentais de 15 e 30 minutos com a associação Endo PTC e líquido de Dakin, *in vitro*.

Como substância auxiliar mais utilizada atualmente temos o hipoclorito de sódio em variadas concentrações: 0,5 % (Líquido de Dakin), 1 % (Solução de Milton), 2,5 % (Licor de Labarraque), 5 % (Solução de Grossman) e 5,25 %. Como potente ação coadjuvante à terapêutica, os hipocloritos apresentam importantes propriedades de desnaturação protéica e saponificação de gorduras, presentes no sistema de canais radiculares (CUNNINGHAM; BALEKJIAN, 1980).

Aun e Paiva (1982) estudando as concentrações 0,5, 1, e 1,5 % do hipoclorito de sódio demonstraram que a velocidade de ação do seu poder antimicrobiano crescia proporcionalmente ao nível de concentração; suas propriedades químicas como a liberação de cloro e oxigênio nascente conferem alto poder bactericida.

Estudo de Byström e Sundqvist (1985) demonstrou que o poder bactericida do hipoclorito de sódio foi o mesmo comparando-se concentrações de 0,5 e 5 %.

Somado a essas propriedades está seu potencial de aumento de permeabilidade dentinária (PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; GAVINI; AUN; PESCE, 1994).

Testando permeabilidade dentinária, Robazza et al. (1987), Souza, Amorim e Lage-Marques (2005) demonstraram que a associação Endo PTC mais Líquido de Dakin aumenta permeabilidade dentinária, o que favorece uma melhor difusão da medicação intracanal.

Prokopowitsch, Moura e Muench (1989) demonstraram que a associação do hipoclorito de sódio 1% e o Endo PTC foi a mais eficaz no aumento de permeabilidade dentinária, quando comparada com Tergentol®-Furacin®, EDTA-T, e quando as duas substâncias (hipoclorito de sódio e Endo PTC) eram usadas separadamente.

Gutierrez, Jofre e Villena (1990) compararam em microscopia eletrônica de varredura dentes com cáries e que estavam expostos ao meio oral, que foram depois irrigados um grupo com água, outro com solução fisiológica e último grupo com irrigação alternada de hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. Os autores observaram cristais cúbicos de cloreto de sódio no canal principal e em profundidade de até 200 µm dos túbulos dentinários.

Gavini (1992) observou em MEV que a utilização em irrigação intracanal da associação EDTA 17% e hipoclorito de sódio 1% foi mais efetiva na remoção de microsujeidades que o soro fisiológico, ácido cítrico 25% e hipoclorito de sódio 1%. O autor observou também que o volume de solução é diretamente proporcional ao grau de limpeza promovido pelas associações.

Gavini, Aun e Akisue (1996) demonstraram que o aumento da permeabilidade dentinária provocado pelo hipoclorito de sódio foi responsável por um melhor selamento do cimento obturador. A necessidade da remoção do magma dentinário

produzido durante a instrumentação implica na utilização de substâncias químicas auxiliares ao preparo cirúrgico do canal radicular. Constituído por raspas de dentina, restos pulpares e microrganismos (em casos de contaminação do endodonto) o magma dentinário ou *smear layer* prejudica o embricamento do cimento obturador e conseqüente vedamento, bem como retarda a penetração da medicação intracanal em túbulos dentinários.

Em estudo de Bianconcini (2001) testou a citotoxicidade do digluconato de clorexidina 2,5 % e 5 %, hipoclorito de sódio 1 % e soro fisiológico em subcutâneo de ratos Wistar. Os animais sacrificados em intervalos de 30 minutos, 6 e 24 h apresentaram com significância estatística maior grau de reação tecidual inflamatória na fase exsudativa os grupos de digluconato de clorexidina nos tempos de 30 minutos e 24 h. O grau de reação tecidual foi medido pela análise do corante de Evans (injetado intravenosamente) extravasado pela espectrofotometria da absorção de luz.

Buck et al. (2001) compararam o efeito bactericida do hipoclorito de sódio a 0,5 %, clorexidina 0,12% e EDTA 0,2% em raízes colonizadas por *E. faecalis*. Após a utilização dos irrigantes, amostras de dentina eram colhidas com auxílio de brocas para a verificação de bactérias viáveis. As amostras foram inoculadas em meio de cultura TSB (caldo de soja tripticase) por 12 horas, e após contagem de CFUs (unidades formadoras de colônia) os resultados foram tratados estatisticamente. Os resultados demonstraram que o hipoclorito de sódio foi mais eficiente na redução microbiana com significância estatística, mas não conseguiu esterilização das amostras.

Guimarães (2001) testou em cilindros de dentina bovina, acorde metodologia de Haapasalo e Ørstavik de 1987, infectados com *Enterococcus faecalis* as

soluções de digluconato de clorexidina 2 % e paramonoclorofenol 2 % ambos em veículos aquoso e gel. Nessa simulação de medicação intracanal a clorexidina foi mais efetiva diante do microrganismo, independente do veículo.

Behnen et al. (2001) experimentaram pastas de diferentes consistências de hidróxido de cálcio em cilindros de dentina bovina colonizadas por *Enterococcus faecalis*. No grupo com pasta fina de hidróxido de cálcio veiculada com água e no grupo Pulpdent TempCanal® (pasta de hidróxido de cálcio) a redução microbiana foi de 73 a 86 %, já no grupo com pasta densa a redução foi de 13 a 26 %. As coletas foram feitas em diversas profundidades de dentina e demonstraram que as pastas menos densas de hidróxido de cálcio foram mais efetivas quanto ao efeito antimicrobiano, provavelmente por maior capacidade de penetração nos túbulos dentinários.

As infecções endodônticas são polimicrobianas e compostas principalmente por microrganismos anaeróbios estritos e facultativos. Devido à baixa tolerância ao oxigênio inerente a essas bactérias, as mesmas são suscetíveis ao preparo químico-cirúrgico principalmente na presença de peróxidos e hipocloritos. A reação de efervescência provocada pela reação do hipoclorito de sódio 0,5 % com o creme de Endo PTC libera alta quantidade de oxigênio proporcionando um ambiente inóspito a essa microbiota (LAGE-MARQUES; ANTONIAZZI, 2002).

Siqueira Jr et al. (2002b) compararam a redução bacteriana provocada por duas técnicas de instrumentação e diferentes combinações de agentes irrigantes. Cinquenta dentes unirradiculares foram inoculados com *E. faecalis* por 24 h em meio BHI em 37 °C e divididos: Grupo 1 – instrumentados com NaOCl 2,5% e limas Nitiflex; Grupo 2 – idem ao grupo 1 alternado com ácido cítrico 10%; Grupo 3 – idem ao grupo 1 mais clorexidina 2%; Grupo 4 – NaOCl 2,5% em instrumentação

rotatória; e Grupo controle instrumentado com solução salina e limas Nitiflex. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos 1, 2, 3, 4 no que concerne a redução microbiana, mas significativa em relação ao grupo controle. A redução em média dos grupos foi de 66%. Os autores salientaram que os dentes instrumentados com NaOCl associado a clorexidina (grupo 3) tiveram escurecimento acentuado de dentina.

Também comparando efeito bactericida do NaOCl (hipoclorito de sódio) 1 e 5% com a clorexidina a 0,12 e 1%, Sassone et al. (2003) concluíram que tanto as duas concentrações de NaOCl como a clorexidina 1% foram efetivas contra *E. faecalis* em presença ou ausência de albumina bovina. Os autores concluem, portanto, que a presença de matéria orgânica não influencia na característica bactericida desses dois irrigantes nas concentrações citadas. Os testes foram feitos em placa de vidro em tempos diferentes de exposição dos antimicrobianos.

A capacidade do *Enterococcus faecalis* de penetrar em túbulos dentinários em grande profundidade também é fator de dificuldade de ação das substâncias químicas sobre o microrganismo. Tentando potencializar o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio, Zehnder et al. (2003) analisaram a ação do mesmo em conjunto com NaOCl e clorexidina em blocos de dentina colonizados por *E. faecalis*. As duas associações foram eficazes na desinfecção em 24h e mantida por 5 dias, sem diferenças estatísticas entre elas; porém quando comparadas com a associação do hidróxido de cálcio com solução salina as mesmas foram mais efetivas com significância estatística.

O hipoclorito de sódio foi testado por Yamashita et al. (2003) na concentração de 2,5 % quanto a sua eficácia de limpeza das paredes do canal de 36 dentes

extraídos. Comparado com clorexidina 2 % e solução salina apresentou melhores resultados quanto à limpeza em MEV.

A resistência à ação de substâncias antimicrobianas desenvolvida pelo *E. faecalis*, acarreta em tentativas clínicas de associações tanto de substâncias irrigadoras como de medicações intracanal. Em estudo com dentina bovina contaminada, Sirén et al. (2004) testaram a associação de hidróxido de cálcio com iodo-iodeto de potássio (IKI) ou com clorexidina, em tempos de incubação de 24h e 7 dias. Os autores observaram que no período de 24h a medicação mais efetiva foi o IKI com área de 700 µm de túbulos desinfetados, seguido pela clorexidina, e pelas associações dos mesmos com hidróxido de cálcio. No período de 7 dias o raio de descontaminação do IKI, clorexidina e das associações aumentou para 950 µm. Os autores concluem que essas associações foram mais efetivas que a utilização do hidróxido de cálcio isoladamente.

O tratamento em uma sessão utilizando hipoclorito de sódio 5,25 % e EDTA 17 % foi testado por Nair et al. (2005) quanto à descontaminação conseguida em raízes mesiais de primeiros molares inferiores com periodontite apical. Dezesesseis dentes tiveram seus canais instrumentados com limas rotatórias, obturados e suas raízes mesiais apicectomizadas para análise em microscopia eletrônica de transmissão e análises histopatológicas. Quatorze dos 16 dentes apresentavam grande quantidade de microrganismos em nichos não instrumentados e em biofilmes. Os autores concluem que o tratamento em uma sessão não é satisfatório quanto à descontaminação, o que deve ser potencializado com medicação intracanal em mais sessões nos casos de polpa necrótica.

Diversos autores já constataram a presença de *E. faecalis* após a instrumentação endodôntica. Vivacqua-Gomes et al. (2005) em estudo *in vitro*

comparou tratamento em sessão única e múltiplas sessões. Quarenta e cinco raízes contaminadas foram instrumentadas com técnica rotatória (Greater Taper – Tulsa Dentsply, Tulsa, OK, USA) e clorexidina, medicadas com hidróxido de cálcio, obturadas e desgastadas para semeadura e contagem de CFUs após 60 dias da obturação. Os autores não observaram diferenças entre sessões única ou múltiplas quanto à presença de microrganismos viáveis.

Também avaliando a presença de microrganismos após preparo químico-cirúrgico, Ferrari; Cai e Bombana (2005) recuperaram em pacientes, leveduras, bactérias entéricas, dentre elas cepas de *E. faecalis* em dentes com infecção primária após 7 dias de medicação intracanal. Foram utilizados 25 dentes com polpas necróticas, lesões perirradiculares e câmara fechada.

Comparando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0,5, 2,5 e 5,25 %) em diversas técnicas rotatórias e manuais em 180 dentes extraídos contaminados durante 21 dias por *E. faecalis*, Berber et al. (2006) constataram que independente da técnica nas concentrações mais altas o NaOCl foi mais efetivo na desinfecção em profundidade. Quanto ao grau de limpeza não houve diferença entre as concentrações testadas.

2.1.2 Preparo cirúrgico

Walia, Brantley e Gerstein (1988) introduziram a utilização de limas de liga de níquel-titânio (Nitinol) em Endodontia. Essa liga utilizada primariamente pela

Ortodontia, possui alta flexibilidade, característica muito interessante para instrumentação de canais curvos. Os autores compararam limas de níquel-titânio de secção triangular # 15 com lima de aço inoxidável de secção triangular # 15 realizando três tipos de testes mecânicos: torção em sentido horário, torção em sentido anti-horário e dobradura. Os autores observaram que as limas de níquel-titânio apresentaram flexibilidade de até 3 vezes mais que as limas de aço inoxidável e maior resistência à fratura quando sofreram torções nos sentidos horário e anti-horário.

Atualmente a técnica rotatória ou mecanizada para preparo químico-cirúrgico é largamente utilizada e novos sistemas são constantemente incorporados ao mercado e testados. Schafer e Lohmann (2002) compararam qualidade do preparo e limpeza em canais curvos de raízes extraídas preparadas com sistema rotatório FlexMaster™ e limas manuais Flexofile™ (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). O grau de curvatura das raízes estava entre 25 a 35 graus, num total de 24 raízes em cada grupo instrumentadas com irrigação de 5 mL de NaOCl 2,5 % a cada troca de instrumentos. O grau de limpeza foi verificado com microscopia eletrônica de varredura e a qualidade do preparo com análise de radiografias pré e pós operatórias em programa de imagem computadorizada. Quanto a limpeza as limas manuais produziram menor quantidade de *smear layer*, já o sistema FlexMaster™ manteve mais originalmente a curvatura do canal com significância estatística.

Jeon et al. (2003) avaliaram a quantidade de *smear layer* produzida no terço apical por 3 sistemas rotatórios em microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizadas 20 raízes em cada grupo instrumentados com a técnica coroa-ápice com: Profile™ (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, EUA); Hero 642™ (MicroMega, Besançon, França) ambos sistemas com limas de níquel-titânio e limas de aço

inoxidável para sistema mecanizado Mani™ (Mani, Utsunomiya-Tochigi, Japão). Os resultados foram determinados qualitativamente por *scores* de limpeza, e o sistema que produziu menor quantidade de *smear layer* foi o Hero 642.

Schafer e Schlingemann (2003) compararam a instrumentação manual com limas Flexofile e instrumentação rotatória com K³ (Sybron Endo, Orange, CA, EUA) em 60 raízes curvas de molares inferiores e superiores, com grau de curvatura entre 25 a 35 graus. Depois de instrumentadas cada canal era enxaguado com 5 mL de NaOCl 2,5%. Tomadas radiográficas foram feitas para análise em programa de computador quanto à quantidade de desvio provocada pela instrumentação. Para verificação da limpeza, os espécimes foram seccionados e observados em microscopia eletrônica de varredura. Quanto à remoção de debris e limpeza das paredes do canal as limas manuais foram mais efetivas, mas quanto à manutenção da curvatura da raiz as limas rotatórias foram mais efetivas com diferença estatística.

O preparo químico-cirúrgico realizado com instrumentação rotatória é preconizado com a técnica coroa-ápice pela maioria dos sistemas. Quando comparados os sistemas K³, Profile e ProTaper™ (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, EUA) quanto a resistência a fratura não foi observada diferenças estatísticas significativas entre os sistemas, mas a modelagem do canal foi conseguida com o uso de menor número de instrumentos no sistema K³ (ANKRUM; HARTWELL; TRUITT, 2004).

A instrumentação rotatória proporciona um menor desgaste do operador e diminuição no tempo operatório (HULSMANN; BLUHM, 2004). Além disso, esse tipo de instrumentação obtém os mesmos níveis de limpeza e desinfecção que a técnica manual (ROSSI et al., 2005).

Taşdemir et al. (2005) compararam instrumentação manual com limas tipo K e instrumentação rotatória com sistema Hero 642 em 20 canais méso-vestibulares de raízes de primeiros molares superiores com grau de curvatura entre 25 e 35 graus. Antes do preparo, foram feitas tomografias das raízes em 3 porções, cervical, média e apical. Assim os espécimes foram preparados e escaneados novamente para mensuração da quantidade de desvio provocada pela instrumentação. O sistema rotatório manteve o preparo mais centralizado que a instrumentação manual.

2.2 Aspectos Microbiológicos

A existência de microrganismos em tecido pulpar foi demonstrada por Miller em 1894 quando o autor observou em tecido necrótico pulpar cocos, bacilos e espirilos. Pôde-se observar também que as bactérias são os principais microrganismos colonizadores do tecido pulpar.

A importância da presença de microrganismos na etiologia das patologias endodônticas é explicitada em estudo histopatológico de Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965), quando polpas de ratos estéreis expostas ao meio bucal não sofreram mortificação e observou-se formação de ponte de dentina, evidenciando o poder reparador do tecido quando isento de infecção. Nos espécimes não-estéreis foram observados abscessos, extensas áreas inflamatórias e reabsorções ósseas.

Com avanços tecnológicos que possibilitaram o cultivo em anaerobiose, Sundqvist et al. (1979) caracterizaram a microbiota endodôntica de dentes com polpa necrosada e coroas intactas. Essa microbiota era composta por 90% de

anaeróbios estritos, geralmente contendo de 1 a 12 espécies diferentes de microrganismos – o número de espécimes e densidade variava proporcionalmente ao tamanho da lesão perirradicular.

Möller et al. (1981) verificaram que o tecido pulpar necrótico não é suficiente para desenvolver pericopatias, se não houver infecção no mesmo. Os autores lesionaram polpas em macacos, num grupo as cavidades pulpares foram mantidas seladas por até sete meses e em outro grupo expostas à cavidade bucal por até sete dias e depois seladas por até sete meses. Foram feitas análises histológicas, radiográficas, clínicas e testes microbiológicos. Os autores observaram presença de lesões periapicais em todos, e somente neles, os casos onde houve contaminação. Concluíram também que nesse período experimental a via hematogênica cria um risco muito baixo de contaminação do canal radicular.

A invasão de microrganismos nos túbulos dentinários das paredes do sistema de canais radiculares, levaram Haapasalo e Ørstavik (1987) a idealizar um modelo de estudo em dentes bovinos para detectar a viabilidade bacteriana em profundidade de dentina radicular. Neste modelo, os dentes foram contaminados por *E. faecalis* cepa ATCC 29212, cortados em cilindros, e a dentina infectada foi desgastada com brocas esféricas de diâmetros padronizados. As raspas originadas, bem como o cilindro externo restante foram incubados por até 3 semanas para verificação de crescimento bacteriano em meio de cultura apropriado. Houve a penetração do microrganismo em até 1000 µm dos túbulos dentinários. Os autores testaram paramonoclorofenol canforado nas formas líquida (completa desinfecção) e gasosa (desinfecção mais lenta) e hidróxido de cálcio Calapset™ (não eliminando o microrganismo mesmo após 10 dias de incubação). A média de penetração do microrganismo no grupo controle foi de 500 µm.

Em estudo de Ørstavik e Haapasalo (1990) testaram nesse modelo de cilindro de dentina bovina a penetração intratubular de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* por 14 dias. Nesse experimento o *E. faecalis* colonizou mais rapidamente toda a extensão dos túbulos dentinários. Os autores testaram como medicações utilizadas intracanal e observaram em ordem decrescente de poder antimicrobiano: paramonoclorofenol canforado, Calasept. Já as substâncias irrigantes testadas foram também em ordem decrescente de poder antimicrobiano: iodo-iodeto de potássio, hipoclorito de sódio e clorexidina.

Também estudando penetração de microrganismos em túbulos dentinários de dentina bovina, Meryon e Brook (1990) utilizaram os seguintes espécimes bacterianos: *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* e *Corynebacterium spp.* Com a finalidade de testar citotoxicidade desses microrganismos, os autores testaram a colonização em cilindros de dentina de 100 a 500 µm imersos em cultura de células (fibroblastos) por 72 h. A velocidade de penetração foi em ordem decrescente: *S. sanguis*, *A. viscosus* e *Corynebacterium spp.* Os autores observaram também que a penetração dos microrganismos independia da presença de *smear layer* na dentina, e que a sua citotoxicidade era dependente de sua concentração.

Sen, Piskin e Demirci (1995) observaram em microscopia eletrônica de varredura a presença de microrganismos no interior do canal radicular e na intimidade dos túbulos dentinários em 10 dentes extraídos que ficaram expostos ao meio bucal e apresentavam lesões periapicais. Nesses canais os autores observaram a penetração bacteriana até 160 µm no terço apical de algumas amostras.

A principal causa da infecção endodôntica é a cárie dental e as vias de acesso dos microrganismos ao canal radicular são os túbulos dentinários, exposição pulpar, periodonto e anacorese hematogênica. A dinâmica da infecção endodôntica é dependente da tensão de oxigênio do meio, disponibilidade de nutrientes (carboidratos e proteínas) e interação microbiana. A tensão de oxigênio mais alta no início da infecção faz com que a porcentagem entre anaeróbios facultativos e estritos se igualem, mas a medida que esse oxigênio é consumido pelos anaeróbios facultativos ou aeróbios a tensão diminui e a concentração de anaeróbios estritos sobe. Quanto a prevalência de carboidratos ou proteínas no meio atua determinando o crescimento de anaeróbios facultativos e anaeróbios estritos, respectivamente. Além disso, o canal radicular abriga um ecossistema onde relações de sinergismo e antagonismo interferem nas espécies da infecção. Dentre os espécimes mais freqüentemente isolados de canais radiculares temos: anaeróbios estritos – *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium* ssp., *Peptostreptococcus* ssp., *Prevotella* e *Porphyromonas* - e anaeróbios facultativos – *Streptococcus sanguis*, *Lactobacilos*, *Enterococcus faecalis* (SIQUEIRA Jr, 1997).

Peciulienė et al. (2001) isolaram microrganismos em 33 de 40 dentes obturados com periodontite apical assintomática. Foram isolados leveduras em seis dentes, sendo 3 delas associadas com *E. faecalis*. Também bactérias entéricas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* presentes em 3 dentes e *E. faecalis* foi isolado em 21 das 33 culturas positivas, sendo 11 em culturas puras. Os autores testaram a utilização do iodo-iodeto de potássio (IKI) como irrigação antes da obturação em um grupo do retratamento e no outro testaram medicação de hidróxido de cálcio por 10 a 14 dias. O tratamento com IKI foi mais efetivo quanto ao potencial antimicrobiano. Os autores concluem que há

alta prevalência de bactérias entéricas e leveduras em casos de periodontite apical crônica, o que foi um dos objetivos do estudo. Observaram também que entre as trocas de medicação o tipo mais comumente isolado, consequentemente o mais resistente às medicações, foi o *E. faecalis*.

2.2.1 *Enterococcus faecalis*

O *E. faecalis* é um microrganismo anaeróbio facultativo Gram positivo presente principalmente nas cavidades entéricas, mas podendo também ser encontrado na cavidade bucal e na microbiota endodôntica. Esse microrganismo apresenta alta resistência, conseguindo suportar longos períodos de falta de alimentação bem como ambientes adversos. Sua sobrevivência ao tratamento endodôntico se dá principalmente pela sua resistência ao pH alcalino provocado pelo hidróxido de cálcio, que é a medicação intracanal mais utilizada pelo seu excelente poder bactericida frente aos microrganismos da flora endodôntica. (SIQUEIRA Jr, 1997)

A relação insucesso da terapêutica endodôntica e presença de microrganismos no interior do canal e intimidade dentinária, levaram Akpata e Blechman (1982) a estudarem *in vitro* um mecanismo de invasão de túbulos dentinários por *Bacteroides melaninogenicus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Streptococcus sanguis* e *Enterococcus faecalis*. Após 3 semanas apenas *E. faecalis* e *S. sanguis* chegaram ao terço apical. O *E. faecalis* invadiu até mais da metade do perímetro do terço cervical, metade do perímetro do terço médio e um terço do terço apical.

Sundqvist (1992), estudando interações bacterianas da microbiota intracanal, observou que *E. faecalis* apresenta papel importante nas infecções de difícil tratamento em Endodontia, por sua permanência dentro do canal radicular constatada mesmo depois da instrumentação. O autor reporta que esse microrganismo, embora em pequena porcentagem em infecções primárias endodônticas, apresenta um número bem maior em casos de insucesso da terapêutica. O autor ainda salienta que devido a um desequilíbrio desse ecossistema provocado pelo tratamento endodôntico, o *E. faecalis* sobrevivendo intracanal pode se proliferar.

Dahlén et al. (2000) analisando amostras colhidas de 29 dentes com infecção endodôntica, encontraram *E. faecalis* em 74% das amostras. Estas últimas colhidas em sessão posterior ao preparo químico-cirúrgico e medicação com hidróxido de cálcio. As amostras foram incubadas por 6 dias em ágar Brucella. A determinação das cepas foi feita seguindo critérios microbiológicos de identificação, e testes de suscetibilidade foram feitos em placa de vidro. O *E. faecalis* foi suscetível a eritromicina e vancomicina, mas resistente a benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina e metronidazol.

Pela metodologia de identificação por hibridização de DNA-DNA, Siqueira Jr et al. (2002a) identificaram cepas de *E. faecalis* em infecções primárias de 53 casos em 11,5 % das lesões assintomáticas e 3,7 % nas lesões de abscesso agudo, totalizando 7,5 % de todos os casos.

Um mecanismo de resistência bacteriana reportado ao *E. faecalis* é o biofilme (comunidade de microrganismos envoltos em matriz polissacarídica organizada com canais de água para sua alimentação e excreção). Distel, Hatton e Gillespie (2002) analisaram a capacidade do *E. faecalis* de formar biofilme em MEV (microscopia

eletrônica de varredura) e em MLCV (microscopia laser confocal de varredura). Os autores utilizaram 46 raízes extraídas que após esterilização e preparo químico-cirúrgico tiveram 2 mm de seus ápices imersos em meio de cultura BHI (infusão cérebro coração). Esses espécimes continham bolinhas de algodão inoculadas com *E. faecalis* e estavam medicados com hidróxido de cálcio. Para a leitura em MEV 20 espécimes foram clivados e lavados e observou-se microrganismos nas paredes dos canais. Para MCLV os espécimes foram observados e após 160 dias o biofilme estava bem caracterizado em forma de cogumelo com canais de água e espessura de 21 a 30 μm . A viabilidade bacteriana foi analisada com o uso de um corante fluorescente que muda sua coloração diante de microrganismos viáveis, e o resultado foi de 90% de células viáveis. Os autores salientam também que pela estrutura física do biofilme ele pode proporcionar trocas genéticas entre os indivíduos, podendo aumentar a virulência e resistência.

Analisando a persistência do *E. faecalis* após intervenção endodôntica, Evans et al. (2002) testaram a hipótese do fator de *stress* como mecanismo de origem de resistência bacteriana. Assim os autores supuseram que o esgotamento provocado pelo hipoclorito de sódio pudesse provocar a resistência posterior ao hidróxido de cálcio. Os autores usaram amostras de *E. faecalis* JH2-2 por ser representativa das espécies. Foram cultivadas em BHI a 37 °C em ar e balanço a uma densidade óptica de 600 nm - nesta faixa o crescimento bacteriano é estacionado. Hipoclorito de sódio em doses sub-letais foi preparado 0,0001 e 0,005 %. A solução de hidróxido de cálcio foi preparada em pH 11.5 e 10.3 e essa medicação foi levada tanto nos grupos tratados com NaOCl previamente como no grupo controle – não tratados. Os autores testaram também a inibição da bomba de prótons presente na membrana celular que é responsável pela manutenção da acidez intracelular em

ambientes alcalinos diante da medicação com hidróxido de cálcio. Não houve diferenças entre os grupos tratados previamente com doses sub-letais e o grupo não tratado diante da medicação com hidróxido de cálcio. Em relação ao grupo onde se utilizou o inibidor da bomba de prótons, a população bacteriana foi drasticamente reduzida com significância estatística em relação ao grupo sem o inibidor; ambos diante da medicação de hidróxido de cálcio. Assim os autores concluem que a bomba de prótons tem papel fundamental na sobrevivência do *E. faecalis* diante do hidróxido de cálcio.

O *E. faecalis* resiste e cresce em ambientes com extremas diferenças de temperatura (15-60 °C), apresenta resistência a corante azul de metileno 0,1% e ao ambiente alcalino provocado pelo hidróxido de cálcio. Essa resistência do microrganismo é relacionada à sua capacidade de adesão dentinária, o que foi testada por Hubble et al. (2003) que utilizaram variações mutantes que não sintetizavam proteína de ligação ao colágeno (Ace), serina protease e gelatinase (cada mutação com uma deficiência de síntese). Os espécimes foram instrumentados e irrigados com 5.25% NaOCl a cada troca de lima. Os dentes foram clivados e escovados para tirar debris e lavados e esterilizados em autoclave. As três cepas mutantes foram comparadas com a cepa mais virulenta. As amostras foram cultivadas em BHI a 37 °C aerobicamente, exceto a cepa não sintetizadora de Ace que foi incubada a 46 °C. As culturas foram inoculadas nas meias raízes e incubadas por 6 horas. Preparadas para leitura em microscopia eletrônica de varredura e análise estatística. O tipo mais selvagem apresentou, com diferença estatística, maior quantidade de microrganismos em relação à aderência e proliferação comparado com outros grupos. Já os grupos mutantes não

apresentaram diferenças entre si. Assim os autores concluem que a adesão do microrganismo à dentina é importante para a sua colonização e proliferação.

O insucesso relacionado aos casos de sobre-obturaço tem como uma de suas hipteses a formao de biofilme bacteriano ao redor do cone de guta percha. Takemura et al. (2004) testaram nove tipos de microrganismos, (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*) quanto suas habilidades de formao de biofilme em pontas de guta-percha. O *E. faecalis*, bem como outros espcimes Gram positivo foi capaz de formar biofilme em ponta de guta-percha. Os autores observaram tambm que a espessura do biofilme era diretamente dependente da quantidade de soro humano incorporado ao meio de cultura. Assim os autores acreditam que as substncias contidas nesse soro, tais como glicoprotenas, so fundamentais para formao e manuteno do biofilme.

Tambm estudando biofilme de *E. faecalis*, George, Kishen e Song (2005) observaram em MEV as caractersticas do mesmo em condioes de aerobiose, anaerobiose, ambiente rico em nutriente e ambiente sem nutrio. A maior espessura de biofilme foi encontrada quando *E. faecalis* foi incubado em aerobiose e ambiente rico em nutriente. Mesmo nos grupos sem nutriente foi observada a proliferao do microrganismo em menor escala. O tempo de incubao foi de 21 dias.

Oztan, Kyian e Gerceker (2006) testaram, *in vitro*, o efeito antimicrobiano de pontas de guta percha com medicao em sua formulao presentes no mercado. Foram utilizadas Calcium Hydroxide Plus PointsTM (com hidrxido de clcio), Activ PointsTM (diacetato de clorexidina) e CHX/Ca Combi PointsTM (hidrxido de clcio e

clorexidina). Os microrganismos testados foram: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Enterococcus faecalis*. Os cones de guta percha eram incubados juntamente com uma suspensão de microrganismos em soro humano cuja concentração foi pré-determinada de 2×10^7 . Os tempos experimentais foram de 1, 2, 3, 4, 7 e 14 dias. Depois disso cada amostra era diluída em solução salina estéril e semeada em placa de Petri com ágar para contagem de CFUs. Calcium Hydroxide Plus Points™ e Activ Points™ tiveram eficiência apenas contra *S. cerevisiae*, já CHX/Ca Combi Points™ só não foram eficientes contra *E. faecalis* e *Candida parapsilosis*, mesmo após 14 dias.

Gomes et al. (2006) compararam a detecção de *E. faecalis* em 50 dentes com infecção primária e 50 com tratamento com lesão periapical, tanto em método de cultura como em PCR (*Polymerase Chain Reaction*). No método de cultura foram realizados incubação, plaqueamento e testes bioquímicos; na análise em PCR foi utilizado um *primer* espécie-específico 16S rDNA (DNA ribossômico). Em infecção primária os autores detectaram o microrganismo em 4 % dos casos pelo método de cultura e 82 % por PCR. Já em dentes com insucesso, pelo método de cultura foram detectados 42 % e em PCR 76 %. Os autores observaram grande diferença de detecção pelos dois métodos, e principalmente a alta prevalência de *E. faecalis* em infecção primária.

Também comparando os métodos PCR e cultura para detecção de *Enterococcus faecalis*, Zoletti, Siqueira Jr e Santos (2006) coletaram amostras de 50 dentes tratados endodonticamente, 27 sem lesão periapical e 23 com lesão. PCR detectou o microrganismo, utilizando *primer* espécie-específico 16S rRNA (RNA ribossômico), em 80 % dos espécimes (40 dos 50 dentes); já o método de

cultura detectou *E. faecalis* em 16 % (8 dos 50 dentes). Os autores observaram também que o microrganismo estava presente em 81,5 % e 18,5 % dos dentes sem lesão analisados por PCR e cultura, respectivamente. Já nos dentes com lesão foram encontrados em 78 % e 13 %, também análise PCR e cultura respectivamente. Os autores salientaram que apesar dos achados, mais estudos devem ser realizados, já que a correlação entre *E. faecalis* e insucesso do tratamento endodôntico é muito bem estudada.

Johnson, Flannagan e Sedgley (2006) testaram a capacidade de co-agregação entre o *E. faecalis* e *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus anginosus*. Os autores observaram que o *E. faecalis* co-agregou com *F. nucleatum*, uma amostra co-agregou com *P. oralis*, mas nenhuma co-agregação foi observada com *P. anaerobius* e *S. anginosus*. Os tempos experimentais foram de 0, 1 e 24 h, e os autores acreditam que essa interação entre o *E. faecalis* e o *F. nucleatum* desempenha importante papel nas periapicopatias.

2.3 Lasers em Endodontia

Os primórdios sobre a radiação laser são estudados desde 1917 onde são descritos os mecanismos de interação da radiação de fótons – absorção, emissão espontânea e emissão estimulada (Pick, 1987).

Absorção é o mecanismo onde um átomo de estado energético fundamental absorve um fóton e adquire um estado energético mais alto. Na emissão espontânea um átomo de estado energético mais alto cai a um nível inferior, liberando um fóton, ficando mais estável. Já a emissão estimulada ocorre quando um átomo também decai liberando um fóton, só que nesse caso o fóton liberado é de mesma energia que o fóton que estimulou o átomo. Assim temos fótons com características idênticas, gerando uma luz com propriedades como mesma fase, mesma direção e polarização. O resultado é uma luz pura, coerente (a propagação dos fótons se dá em mesma fase), que tem a capacidade de conter grande quantidade de energia em um ponto diminuto. A luz laser apresenta também monocromaticidade e direcionalidade (propagação em uma única direção).

Maiman gerou um feixe de luz vermelha coerente através de um cristal de rubi. Assim, utilizou-se pela primeira vez a denominação LASER (MAIMAN, 1966).

LASER é acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* – amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. A luz laser é definida como uma radiação eletromagnética e, como tal com comprimentos de onda, frequências e amplitudes determinados.

O aparelho de laser é composto por: meio ativo (sólido, líquido ou gasoso), caixa de ressonância que contém esse meio ativo, fonte de energia de ativação (energia elétrica), sistema óptico (espelhos colimadores) e fonte de transmissão da energia gerada. O meio ativo é que denomina o nome do laser, por exemplo, laser de érbio – meio ativo Érbio: Ítrio-Alumínio-Granada. Os diferentes tipos de laser podem ser divididos em sólidos, líquidos ou gasosos - conforme o estado do meio ativo - e também em laser de baixa ou alta densidades de potência.

O laser de alta potência foi primariamente utilizado em Odontologia por Stern e Sognnaes (1964) que utilizaram laser de rubi para vaporização de esmalte e observaram a formação de crateras em esmalte e dentina.

A alta densidade de energia produzida pelo feixe laser, produz efeitos térmicos nos tecidos que se não controlados podem causar injúrias. Em estudo de Eriksson e Albrektsson (1983) feito *in vivo* ficou demonstrado que um aumento de temperatura acima de 10 °C, durante 1 minuto, provocou danos irreversíveis em osso, levando à necrose. Assim a utilização da radiação laser deve permanecer nesse parâmetro, para a preservação do periodonto.

Os lasers mais utilizados em Endodontia são os de dióxido de carbono, neodímio, érbio, hólmio, TEA CO₂ e diodo.

Dederich (1993) observou que a característica do laser que é mais importante no efeito do mesmo sobre os tecidos é o seu comprimento de onda. Fica determinado também que a absorção é o mecanismo mais desejado na aplicação do laser e que essa é responsável pelos efeitos térmicos nos tecidos. Os efeitos térmicos do laser produzem a maior parte das utilizações do mesmo em Odontologia.

Kutsch (1993) comparando diferentes comprimentos de onda observou que a coagulação ocorre quando a temperatura tecidual chega a 60 °C; que entre 70 °C e 80 °C há o derretimento; entre 90 °C e 100 °C a vaporização; entre 100 °C e 150 °C a carbonização e acima de 175 °C o corte tecidual.

Em estudo sobre o efeito bactericida do laser de Nd:YAG realizado por Moshonov et al. (1995), os autores utilizaram um corante intracanal e compararam a ação do laser com o hipoclorito de sódio a 1% em 75 dentes extraídos contaminados com *Enterococcus faecalis*. O laser conseguiu um nível de

desinfecção de 99%, porém inferior ao nível de desinfecção alcançado pelo hipoclorito de sódio a 1% deixado intracanal por 2 minutos.

Stabholz et al. (1992b) realizaram estudo em 60 dentes extraídos, comparando o uso do laser Nd:YAG aplicado em raízes apicectomizadas com ou sem retrocavidades, obturadas por amálgama e posteriormente coradas. Os autores concluíram que o uso do laser não preveniu a penetração do corante, mas que propiciou menor entrada do corante comparada com o grupo não-laser. No mesmo ano, Stabholz et al. (1992a) em outro estudo envolvendo 18 dentes instrumentados e apicectomizados divididos em dois grupos com ou sem aplicação de laser de Nd:YAG, visualizaram em microscopia eletrônica de varredura que os dentes com laser apresentavam ilhotas de dentina fundida interconectadas e áreas com *smear layer*. Os autores salientaram que a não regularidade dos pulsos foi a responsável pelo achado; acrescentaram também que o laser de Nd:YAG, por ser transmitido por fibra flexível, é mais vantajoso que o laser de dióxido de carbono.

Levy (1992) demonstrou que o laser de Nd:YAG com refrigeração, foi apto para alargar o canal, deixando uma superfície limpa livre de *smear layer*.

Gutknecht et al. (1996) testaram o efeito bactericida do laser de neodímio contra *E. faecalis* em 40 canais radiculares *in vitro*. Os dados foram convertidos em logaritmo de CFU's e a porcentagem média de desinfecção alcançada foi de 99,91 %

Resultados de diminuição da permeabilidade dentinária também foram encontrados por Lage-Marques (1997) comparando vários tipos de laser, dentre eles o de neodímio, em dentes extraídos, apicectomizados e retrobturados.

A luz laser pode sofrer absorção, reflexão, transmissão e espalhamento nos tecidos em graus diferentes, isto é, a mesma luz sofre todos os mecanismos com variações segundo características próprias do laser e da área irradiada.

Anic et al. (1998) estudando incidências do feixe de luz laser, observou em microscopia eletrônica de varredura que o laser de Nd:YAG (sem refrigeração) produziu, em incidência perpendicular, cratera coberta por dentina fundida e diminuição do diâmetro de túbulos dentinários na periferia. Já em incidência paralela o mesmo tipo de laser promoveu estrias no *smear layer* das paredes dentinárias do canal radicular, mais evidentes que as encontradas com laser de argônio. Os autores concluíram que o ângulo da ponta do laser e a distância de seu alvo são fatores mais importantes sobre as ações do feixe de laser.

Um caso clínico de osteonecrose em maxila, provocada pelo uso de laser de Nd:YAG, com refrigeração, em apicectomia de incisivo central superior, foi relatado por Cassatly, Rostock e Gocke (1999). Os autores citam como possível causa da osteonecrose, a absorção mais profunda da energia, gerando calor e posterior necrose óssea.

A irradiação do laser de Nd:YAG promoveu um nível de desinfecção menor que o do hidróxido de cálcio em estudo de Cecchini (2001) em dentes bovinos preparados endodonticamente e posteriormente colonizados por *Enterococcus faecalis*.

Archilla, Lage-Marques e Mirage (2002) compararam três técnicas de aplicação de laser de Nd:YAG intracanal, após preparo químico-cirúrgico – técnica de Gutknecht, de Matsumoto e oscilatória – para análise térmica nos seguintes parâmetros: frequência 5 Hz, potência média de 1,25 W, diâmetro do núcleo da fibra 300 µm e intervalo de relaxação térmica 20 s. Os autores concluíram que as três

técnicas são seguras observando-se as temperaturas médias e máximas da região apical e do terço médio.

Silva Garcez et al. (2006) utilizaram laser vermelho cujo comprimento de onda era 685 nm em terapia fotodinâmica (PDT - *Photo Dynamic Therapy*) para descontaminação de canais infectados por *E. faecalis in vitro*. Nessa terapia um agente químico (corante) é utilizado e ativado por luz (sensitização) causando morte celular principalmente por apoptose. Os autores utilizaram 30 dentes extraídos unirradiculares divididos em grupo controle, grupo com preparo químico e grupo com radiação laser. No grupo químico os canais foram irrigados por hipoclorito de sódio 0,5 % e deixados inundados pela solução por 30 minutos. No grupo laser os canais foram preenchidos por uma pasta (sensitizador) e deixados por 5 minutos previamente à irradiação do laser por 3 minutos com energia de 1,8 J através de fibra óptica. Depois da coleta do conteúdo intracanal, o mesmo foi semeado para contagem de CFUs. No grupo químico a média de redução bacteriana foi de 93,25 %, já no grupo laser a média de redução foi de 99,2 %. Os autores concluíram que a fotossensitização foi mais eficiente que a utilização do hipoclorito de sódio sozinho, com diferença estatística na redução da população do microrganismo.

2.3.1 Laser de diodo

Wyman et al. (1992) observaram que ação do laser de diodo em tecidos era similar à do laser de neodímio. Quando utilizado em modo de contato provocava vaporização e áreas de necrose semelhantes às provocadas pelo neodímio.

Moritz et al. (1997) testaram o laser de diodo de comprimento de onda de 810 nm para redução microbiana em dentes extraídos inoculados com *Escherichia coli* e *E. faecalis* em várias potências em modo pulsado. O tempo de exposição utilizado foi de 5 vezes 5 segundos em movimentos circulares, produzindo um aumento de temperatura máxima de 6 °C e fechamento de túbulos dentinários na potência de 4 W, nessa potência não foi observado nenhum crescimento bacteriano.

A utilização do laser de diodo (comprimento de onda de 905 nm) associado ao corante azul de toluidina foi testada por Haas et al. (1997) em terapia fotodinâmica. Os autores não observaram crescimento bacteriano em superfícies de implantes contaminadas por *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em estudo *in vitro*.

O laser de diodo apresenta comprimento de onda que acarreta numa maior absorção e penetração pelos tecidos biológicos, ao contrário da pequena absorção pela água, hidroxiapatita e demais cromóforos dos tecidos dentais (MANNI, 2000).

Também Klim et al. (2000) compararam laser de diodo com laser de neodímio e afirmaram que ambos apresentam características semelhantes, mas principalmente os lasers de diodo com comprimentos de onda próximos aos 800 nm possuem maior poder de penetração.

Em estudo de Gutknecht et al. (2000) irradiaram fatias de 100, 300 e 500 μm de dentina bovina, contaminada por *E. faecalis*, com laser de diodo com comprimento de onda de 810 nm. Os parâmetros de irradiação foram potência de 3 W, em modo contínuo, por 30 s, output de 0,6 W com fibra de 400 μm em ângulo de 5 graus em relação à superfície. Após irradiação as fatias sofriam vibração para deslocamento dos microrganismos dos túbulos dentinários e cultura em ágar sangue. Os autores obtiveram redução média de 74 % mesmo nas fatias de 500 μm .

Em um estudo *in vivo* de Dörtbudak et al. (2001) foi utilizado laser de diodo (comprimento de onda 905 nm) e corante azul de toluidina em pacientes com peri-implantite e a associação promoveu redução dos microrganismos *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* nas bolsas peri-implantes.

Kreisler, Al-Haj e d'Hoedt (2002) observaram que no modo contínuo a potência mais segura para utilização do laser de diodo (comprimento de onda 809 nm) foi de 1 W por 10 segundos em superfície externa de raiz, e que a espessura de dentina remanescente influencia nessa transmissão de calor.

Radaelli (2003) testou o efeito bactericida do laser de diodo em raízes contaminadas com *Enterococcus faecalis*. O laser de diodo foi testado em parâmetros de potência de 2,5 e 3 W com e sem medicação intracanal de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado. Os espécimes depois de contaminados foram irradiados (nas diversas potências) e divididos em grupos com e sem medicação intracanal, sem sofrer preparo químico cirúrgico. No grupo de 3 W sem medicação intracanal, a redução bacteriana foi de 98,5 % logo após a irradiação e de 96,5 % após 48 horas. Já no grupo de 2,5 W sem medicação intracanal, a redução foi de 99,2 % logo após a irradiação e de 57,6 % após 48 horas. Nos

grupos com medicação intracanal não houve crescimento bacteriano após 48 horas. A autora também analisou termograficamente as potências e observou serem seguras por não produzirem aumento de temperatura superior a 10 °C mesmo em espessuras dentinárias de 1 mm.

O laser de diodo – GaAIAs – de alta potência, por ter um comprimento de onda em torno de 809 nm, apresenta interações com tecidos dentais que vão desde detecção de cáries por transiluminação até a alteração de superfície dentinária (PEARSON; SCHUKERT, 2003).

O laser de GaAIAs possui espectro de emissão que está na região do infravermelho como o laser de Nd:YAG, por essa proximidade de comprimento de onda, ambos possuem características semelhantes, e atuam em alguns casos com o mesmo efeito. O laser de diodo, por exemplo, altera superfície dentinária sem provocar o *melting* característico do laser de neodímio, mas também seu feixe de luz é atraído por corantes como melanina, hemoglobina (SOUZA; AMORIM; LAGE-MARQUES, 2003).

Kreisler et al. (2003) testaram o efeito de desinfecção da dentina radicular *in vitro* provocada pelo uso de laser de diodo e sua associação com hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. Uma suspensão de *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) foi inoculada nas raízes, que conjuntamente com o grupo controle positivo e negativo perfizeram 72 espécimes. Num grupo os espécimes contaminados foram irradiados por laser de GaAIAs, comprimento de onda 809 nm nas potências de 1,5; 3 e 4,5 W em modo contínuo num total de 60 s, com fibra óptica de 200 µm. No outro grupo os espécimes foram enxaguados com hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio, e por fim um último grupo foi enxaguado e irradiado. O grau de desinfecção provocado pela irradiação na potência de 3 W foi comparável a

provocada pelo do grupo onde só houve uso do enxágüe. Já a irradiação a 3 W com enxágüe provocou a mesma redução bacteriana que o grupo irradiado a 4,5 W, que foram as maiores médias encontradas. Os autores observaram carbonização em um espécime irradiado a 3 W e noutro a 4,5 W. Os autores concluem que a utilização do laser pode servir como adjunto com hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio na desinfecção da dentina radicular.

O uso do laser de diodo vem sendo estudado em fotoativação de substâncias antimicrobianas em canal radicular bem como desinfecção e tratamento de superfície radicular externa (STABHOLZ et al., 2003).

A terapia fotodinâmica, também conhecida como fotossensitização, foi testada em peri-implantites provocadas em cachorros por Shibli et al. (2003). Nesse experimento, os autores testaram laser de diodo com comprimento de onda 685 nm associado ao corante azul de toluidina 100 µg/mL, após realização de retalho mucoperiostal nos cães. A coleta microbiológica foi feita antes e após a irradiação, com pontas de papel. Os autores observaram redução de microrganismos nas amostras e até completa eliminação dos mesmos em alguns espécimes. PDT utilizando laser de diodo também obteve resultados de desinfecção contra *E. faecalis* em canal radicular, configurando interessante ferramenta para obtenção de melhores resultados na terapia endodôntica, sobretudo nos casos de re-intervenção (LEE; BIRD; WALSH, 2004)

Em MEV o laser de diodo, nas potências de 1 W provocou pouca alteração em cimento e smear layer deixando-os mais regulares, sem carbonização, fusão ou derretimento, em estudo em dentes extraídos e raspados previamente à irradiação (THEODORO et al., 2003).

O laser de diodo utilizado em cavidades retrógradas obturadas com MTA, provocou diminuição da infiltração marginal por corante rodamina 1 % com significância estatística nos parâmetros: 2 W , 10 Hz, pulso contínuo (AUN; GAVINI; AUN, 2004).

Gutknecht et al. (2004) usando mesma metodologia de estudo de 2000 com fatias de dentes bovinos, mas com laser de diodo com comprimento de onda de 980 nm, testaram o poder de desinfecção contra *E. faecalis*. Nesse estudo os autores utilizaram os seguintes parâmetros: 32 s de irradiação com *outputs* de 1,75; 2,3 e 2,8 W com fibra de 200 μm . O grau máximo de desinfecção foi obtido com output de 2,8 W em todos os grupos: 97 % na espessura de 100 μm , 89 % em 300 μm e 86 % em 500 μm .

O potencial de desinfecção do laser de diodo de 815 nm foi testado em pacientes com bolsa periodontal por Zegaib (2005). Nesse estudo, comparou-se grupo com procedimentos de raspagem e alisamento com grupo que além dessas manobras sofria irradiação de laser de diodo em superfície externa de raiz. As coletas de placa bacteriana dos pacientes foram feitas, e a identificação foi feita utilizando a metodologia de hibridização de DNA-DNA *checkerboard*. Os parâmetros testados foram de 1,2 kW/cm² a 788 kW/cm² de intensidade e 10 a 15 s de irradiação. Os melhores resultados foram obtidos no grupo que sofreu irradiação.

O laser de diodo na potência de 1 W foi testado em 20 dentes unirradiculares extraídos para avaliar sua interação com o selamento apical. Os espécimes foram preparados e obturados endodonticamente, tiveram seus ápices cortados e feitas cavidades retrógradas com broca carbide # 2 na profundidade de 3 mm. Um grupo (10 espécimes) foi irradiado com laser de diodo (L 808 - Lasering™, Modena, Itália) por 20 s em contato modo contínuo por toda cavidade. O outro grupo não sofreu

irradiação do laser e ambos tiveram as cavidades retrógradas obturadas com MTA® (Ângelus, Londrina, Brasil). Depois de imersos em corante rodamina 1 %, os espécimes foram seccionados e foi feita a mensuração da infiltração linear apical do corante. Os resultados foram tratados estatisticamente e não houve diferenças entre os grupos ($p>0,05$). Os autores concluíram que nesses parâmetros e amostras testados o laser de diodo não teve influência no selamento apical (SOUZA; AMORIM; LAGE-MARQUES, 2006).

3 PROPOSIÇÃO

A sanificação do sistema de canais radiculares é fator determinante ao bom resultado da terapêutica endodôntica, já que o insucesso está intimamente ligado a presença de microrganismos viáveis no endodonto. Assim, em casos onde a terapia endodôntica convencional não é suficiente para a almejada desinfecção intracanal, outros recursos deverão ser propostos.

Com as propriedades inerentes à radiação laser, a mesma vem sendo usada como ferramenta para tratamento de casos difíceis com resultados promissores. Esse estudo visa verificar o grau de desinfecção em profundidade de dentina provocado pelo uso de radiação laser de diodo de alta potência, após preparo químico cirúrgico com instrumentação rotatória, frente ao microrganismo resistente *Enterococcus faecalis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trinta raízes de dentes unirradiculares, fornecidas pelo Banco de dentes humanos da FOUSP, foram cortadas padronizando um comprimento de 15 mm, limpas e esvaziadas com auxílio de lima tipo K #15 e hipoclorito de sódio 1% para remoção de restos pulpares. Após esses procedimentos as mesmas foram alargadas até lima tipo K #40 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), com desgaste cervical com broca de Largo #3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) para padronização do diâmetro dos canais. As raízes foram então impermeabilizadas externamente por cianoacrilato (Super Bonder® - Loctite Henkel, Itapevi, SP, Brasil) e secas em temperatura ambiente por 24 h. Para posterior esterilização em autoclave 134 °C por 15 minutos. As raízes foram montadas em tubos Eppendorf de 1,5 mL envoltas em silicone pesada de condensação (Zetaplus® -Zhermack, Rovigo, Itália) (Figuras 4.1 e 4.2).

Para preparo do inóculo, 50 µL de cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 foram incubados em 5 mL de meio de cultura TSB (Bacto™- Becton Drive, NJ, EUA) em estufa 37 °C por 24 h em concentração ajustada pelo grau de turbidez 1 segundo escala Mc Farland (Bio Mérieux - Marcy l'Etoile, França) que corresponde a concentração bacteriana de 3×10^8 células referente a uma densidade óptica de 0,25 à 550 nm.

Depois os espécimes tiveram seus canais preenchidos pelo inóculo e incubados por 4 semanas em estufa 37 °C (com renovação do meio de cultura a cada dia). Toda manipulação, semeadura e inoculação foram feitas em câmara

de fluxo laminar. Então foram divididos em 3 grupos, aleatoriamente, como se segue:

Grupo 1: (10) Utilização de 1+4 instrumentos com líquido de Dakin e creme Endo PTC (Oficinalis Farmácia de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil) – instrumentação rotatória com sistema K³ (Sybron Endo, Orange, CA, EUA) técnica coroa-ápice - irrigação final com EDTA-T 17 % (Oficinalis Farmácia de Manipulação, São Paulo, SP, Brasil), enxaguados com solução fisiológica por 30 s com seringa, secos com pontas de papel absorvente estéril (Cell Pack Dentsply®, Petrópolis, RJ, Brasil) e posteriormente irradiados por laser de diodo de alta potência Opus 10 (OpusDent - Sharplan – Norwood, MA, EUA) cujo comprimento de onda é de 830 nm, em modo contínuo (Figura 4.3). O aparelho de laser de diodo bem como seus acessórios (óculos de proteção, clivador, etc.) foi cedido pelo Laboratório Especial de Laser em Odontologia - LELO-FOUSP. A irradiação seguiu a técnica oscilatória desenvolvida por Gutknecht et al. em 1996: a fibra é introduzida a 1 mm aquém do ápice e recuada em movimentos helicoidais com a velocidade de aproximadamente de 2 mm/ s, com duração de 5 s, quatro repetições e intervalos de 10 s entre elas. A irradiação do laser de diodo foi feita na potência de 3 W. A quantidade de solução de hipoclorito de sódio utilizado por dente foi de 10 mL, a mesma quantidade utilizada de EDTA-T 17%. Luvas, limas, seringas e cânulas de aspiração foram trocadas a cada novo espécime.

Grupo 2: (10) Instrumentados, enxaguados e secos como o grupo 1, mas sem irradiação.

Grupo 3: (10) Sem instrumentação e irradiação, enxaguados com solução fisiológica com seringa e secos com pontas de papel absorvente. O total de solução fisiológica utilizada por dente foi de 20 mL.

Os espécimes foram seccionados em 3 terços no sentido transversal com brocas diamantadas em alta rotação. Cada terço foi desgastado por uma broca estéril que foi posteriormente inutilizada, para controle de contaminação das amostras, a refrigeração da caneta foi realizada com solução fisiológica estéril contida em recipiente do equipo previamente desinfetado, bem como o interior das mangueiras. Para coleta das amostras foram efetuados desgastes com brocas tronco-cônicas tipo Batt estéreis (em baixa rotação) da luz do canal principal até metade do diâmetro da raiz - desgaste centrífugo adaptação da metodologia utilizada por Haapasalo e Ørstavik em 1987 (Figura 4.4). Cada amostra teve a utilização de uma broca estéril que foi posteriormente descartada, para controle contaminação das amostras. A cada amostra, procedeu-se também a troca de luvas. O cilindro externo restante gerou outra amostra, com exceção do terço apical que resultou apenas uma amostra. Assim cada espécime gerou 5 porções – dentina mais interna (raspas de dentina) e dentina mais externa do canal radicular (cilindro) - que foram imersas em 1 mL de solução de água peptonada distribuída previamente em tubos eppendorfs (Figura 4.5). Os tubos, então sofreram vibração em equipamento Fisher Vortex (Genie 2™- Fisher Scientific, Bohemia, NY, EUA) (Figura 4.6) para homogeneização das amostras . Totalizou-se 50 porções coletadas de cada grupo, que sofreram diluições de 10^{-1} e 10^{-2} , gerando 150 amostras.

Todas as amostras tiveram 100 mL inoculados em meio TSB para verificação de crescimento bacteriano, que resultou em 100 % positivo. Foi

realizado semeio do controle positivo e controle negativo dos dentes antes do preparo (Figura 4.7).

Foram pipetadas gotas de 25 μ L em triplicata de cada amostra e semeadas em placa de Petri (Figura 4.8) com meio seletivo para *E. faecalis* – mEnterococcus Agar® (Difco - Becton Drive, NJ, EUA) – para contagem de CFUs (unidades formadoras de colônia). A incubação foi de 48 h em estufa em 37 °C.

A parte experimental desenvolvida em câmara de fluxo laminar compreendeu: inoculação, coleta das amostras, preparo dos meios e semeio. Para isso foi necessário o transporte dos motores de preparo para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-II) da Universidade de São Paulo.

O preparo químico-cirúrgico, irradiação laser e corte em terços dos espécimes foram feitos fora da câmara de fluxo laminar.

Os resultados foram tratados estatisticamente, para avaliação do grau de desinfecção provocado pela irradiação laser de diodo em profundidade de dentina radicular.

Figura 4.1 - Espécime impermeabilizado em cianoacrilato e vedado nas porções apical e cervical com Cimpat® (à esquerda) e imerso em silicona de condensação em tubo eppendorf (à direita)

Figura 4.2 - Espécimes montados em tubos eppendorfs – vista cervical

Figura 4.3 - Equipamento laser de diodo Opus 10™

Figura 4.4 - Esquema de coleta das amostras para semeadura em placas de Petri

Figura 4.5 - Amostras em tubos eppendorfs com as diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2}

Figura 4.6 - Agitador de tubos (à esquerda) e motor elétrico com contra-ângulo para desgaste dos espécimes (à direita)

Figura 4.7 - Placa de Petri semeada com alíquota de cultura coletada do canal de um espécime – controle positivo (à esquerda) e placa semeada com alíquota de TSB intracanal sem inóculo - controle negativo (à direita)

Figura 4.8 - Placas de Petri semeadas com amostras dos grupos 1 (à esquerda), 2 (à direita) e 3 (abaixo)

5 RESULTADOS

A contagem de colônias foi feita com auxílio de lupa de aumento de 3 vezes e os resultados estão dispostos nas Tabelas 5.1; 5.2 e 5.3. No grupo 1 (com irradiação), não houve crescimento bacteriano em nenhum dos terços. Os dados das amostras não apresentaram distribuição normal, assim o teste estatístico utilizado foi o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com comparação pelo método de Dunn dos postos médios (Quadro 5.1). As médias de u.f.c. (unidades formadoras de colônias) dos grupos foram: Grupo 1 igual a 0, Grupo 2 igual a $2,77 \times 10^2$ e Grupo 3 igual a 171×10^2 u.f.c./mL (Gráfico 5.1), a análise estatística demonstrou diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Em porcentagens, a redução da microbiota provocada pelo Grupo 1 foi de 100% e do Grupo 2 de 98,39% ambas em relação ao Grupo 3 (controle). Entre os terços, as médias de u.f.c./mL estão apresentadas nos Gráficos 5.2; 5.3 e 5.4. Para a análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 3.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas.

Tabela 5.1 - Grupo 1 – unidades formadoras de colônias por mililitro

amostra	10^0	10^{-1}	10^{-2}	amostra	10^0	10^{-1}	10^{-2}
1C	0	0	0	3M	0	0	0
1CE	0	0	0	3ME	0	0	0
1M	0	0	0	3A	0	0	0
1ME	0	0	0	4C	0	0	0
1A	0	0	0	4CE	0	0	0
2C	0	0	0	4M	0	0	0
2CE	0	0	0	4ME	0	0	0
2M	0	0	0	4A	0	0	0
2ME	0	0	0	5C	0	0	0
2A	0	0	0	5CE	0	0	0
3C	0	0	0	5M	0	0	0
3CE	0	0	0	5ME	0	0	0

continua

Continuação

amostra	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	amostra	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
5A	0	0	0	8M	0	0	0
6C	0	0	0	8ME	0	0	0
6CE	0	0	0	8A	0	0	0
6M	0	0	0	9C	0	0	0
6ME	0	0	0	9CE	0	0	0
6A	0	0	0	9M	0	0	0
7C	0	0	0	9ME	0	0	0
7CE	0	0	0	9A	0	0	0
7M	0	0	0	10C	0	0	0
7ME	0	0	0	10CE	0	0	0
7A	0	0	0	10M	0	0	0
8C	0	0	0	10ME	0	0	0
8CE	0	0	0	10A	0	0	0

Diluições de 10⁰, 10⁻¹ e 10⁻²

C= cervical CE= cervical cilindro externo M= médio ME= médio cilindro externo A= apical

Tabela 5.2 - Grupo 2 - unidades formadoras de colônia por mililitro

amostra	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	amostra	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
1C	incontável	1720	0	6C	0	0	0
1CE	incontável	240	0	6CE	0	0	0
1M	40	0	0	6M	0	0	0
1ME	80	0	0	6ME	0	0	0
1A	24	0	0	6A	0	0	0
2C	0	0	0	7C	0	0	0
2CE	0	0	0	7CE	0	0	0
2M	0	0	0	7M	0	0	0
2ME	0	0	0	7ME	0	0	0
2A	0	0	0	7A	0	0	0
3C	0	0	0	8C	0	0	0
3CE	40	0	0	8CE	0	0	0
3M	0	0	0	8M	0	0	0
3ME	0	0	0	8ME	0	0	0
3A	0	0	0	8A	0	0	0
4C	104	0	0	9C	140	220	0
4CE	incontável	400	0	9CE	480	200	1200
4M	12	0	0	9M	148	120	0
4ME	0	0	0	9ME	24	0	0
4A	80	0	0	9A	20	0	0
5C	0	0	0	10C	180	300	0
5CE	incontável	1040	2400	10CE	incontável	280	0
5M	984	920	0	10M	incontável	240	1200
5ME	0	0	0	10ME	20	0	0
5A	24	0	0	10A	12	0	0

Tabela 5.3 – Grupo 3 – unidades formadoras de colônia por mililitro

amostra		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	amostra		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
1C	incontável	7200	4000		6C	incontável	12440	10600	
1CE	inc	640	0		6CE	1120	960	1200	
1M	960	640	0		6M	incontável	10480	7200	
1ME	incontável	5040	8000		6ME	incontável	3680	3600	
1A	664	800	1200		6A	640	640	0	
2C	incontável	18640	16000		7C	incontável	17800	18600	
2CE	incontável	5440	2400		7CE	960	800	1200	
2M	incontável	incontável	33200		7M	incontável	5080	0	
2ME	incontável	incontável	89200		7ME	1160	1200	0	
2A	incontável	incontável	44000		7A	820	680	0	
3C	incontável	5440	8000		8C	incontável	incontável	89200	
3CE	incontável	10520	8000		8CE	incontável	incontável	42000	
3M	incontável	2120	2400		8M	incontável	7200	4800	
3ME	incontável	3840	4000		8ME	incontável	680	1200	
3A	1160	520	1200		8A	incontável	640	1200	
4C	incontável	18400	32200		9C	920	840	2400	
4CE	incontável	incontável	16000		9CE	incontável	10520	18800	
4M	incontável	4800	2400		9M	incontável	12400	43200	
4ME	incontável	incontável	16400		9ME	1200	1160	2400	
4A	incontável	incontável	36400		9A	incontável	520	0	
5C	incontável	7200	4800		10C	incontável	incontável	78600	
5CE	incontável	4880	2400		10CE	incontável	8000	3600	
5M	incontável	640	1200		10M	incontável	incontável	8000	
5ME	incontável	800	2400		10ME	incontável	4400	0	
5A	incontável	560	0		10A	incontável	2400	0	

Teste Kruskal-Wallis			
Resultados			
H = 103.0360			
Graus de liberdade = 2			
(p) Kruskal-Wallis = 0.0000			
R 2 = 3150.0000			
R 3 = 6225.0000			
R 1 = 1950.0000			
R 2 (posto médio) = 63.0000			
R 3 (posto médio) = 124.5000			
R 1 (posto médio) = 39.0000			
Comparações (método de Dunn)			
Postos médios 2 e 3	61.5000	7.0779	2.394
Postos médios 1 e 2	24.0000	2.7621	2.394
Postos médios 1 e 3	85.5000	9.8399	2.394
			z críticop
			< 0.05
			< 0.05
			< 0.05

Quadro 5.1 – Análise Estatística

Gráfico 5.1 – Médias dos grupos em u.f.c/mL

Gráfico 5.2 – Médias dos grupos terço cervical em u.f.c/mL

Gráfico 5.3 – Médias dos grupos terzo médio u.f.c/mL

Gráfico 5.4 – Médias dos grupos terzo apical u.f.c/mL

6 DISCUSSÃO

A presença de microrganismos no sistema de canais radiculares é demonstrada por vários autores, sendo o tipo bacteriano o mais comum. Dentre esses microrganismos o *E. faecalis* desempenha um papel importante nos casos de insucesso na terapêutica endodôntica (AKPATA; BLECHMAN, 1982; DAHLÉN et al., 2000; DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; EVANS et al., 2002; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; HUBBLE et al., 2003; KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965; SEN; PISKIN; DEMIRCI, 1995; SIQUEIRA JR, 1997; SIQUEIRA JR et al., 2002b; SIRÉN et al., 2004; SUNDQVIST, 1992; SUNDQVIST et al., 1979; TAKEMURA et al., 2004; VIVACQUA-GOMES et al., 2005; ZEHNDER et al., 2003).

O *E. faecalis* é uma bactéria Gram positivo, anaeróbio estrito, que resiste em ambientes inóspitos por longo tempo. Sua persistência no sistema de canais radiculares vai da alta capacidade de penetração em túbulos dentinários (AKPATA; BLECHMAN, 1982; SEN; PISKIN; DEMIRCI, 1995; SIQUEIRA JR, 1997; SIRÉN et al., 2004; ZEHNDER et al., 2003), bem como persistência diante do efeito antimicrobiano da instrumentação endodôntica (BUCK et al., 2001; DAHLÉN et al., 2000; EVANS et al., 2002; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; SIQUEIRA JR, 1997; SIQUEIRA JR et al., 2002a; SUNDQVIST, 1992; VIVACQUA-GOMES et al., 2005).

Além disso, o *E. faecalis* apresenta capacidade de formação de biofilme apical (DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; GEORGE; KISHEN; SONG, 2005; TAKEMURA et al., 2004) e sobrevive a grandes diferenças de temperatura e em ambientes alcalinos, daí advém sua resistência ao hidróxido de cálcio, principal medicação intracanal utilizada atualmente (DAHLÉN et al., 2000; DISTEL;

HATTON; GILLESPIE, 2002; HUBBLE et al., 2003; SIQUEIRA JR, 1997; SIRÉN et al., 2004; ZEHNDER et al., 2003). Nesse mecanismo de resistência ao pH alcalino provocado pelo hidróxido de cálcio é sugerida como fator crucial a bomba de prótons presente na membrana celular da bactéria, pois a mesma é responsável pela manutenção da acidez intracelular (EVANS et al., 2002).

A co-agregação bacteriana entre o *E. faecalis* e *F. nucleatum* aparece como interação bacteriana com importante papel nas periapicopatias (JOHNSON; FLANNAGAN; SEDGLEY, 2006) já que o último é um dos microrganismos Gram negativo mais comum na microbiota endodôntica (SIQUEIRA JR, 1997; SUNDQVIST, 1992; SUNDQVIST et al. 1979). Também o *E. faecalis* sintetiza uma série de proteínas responsáveis pela adesão à parede de dentina como gelatinase e Ace que foi demonstrada como fator crucial para a proliferação e colonização bacteriana (HUBBLE et al., 2003).

Em casos de infecções primárias a prevalência dessa espécie bacteriana em canais radiculares é baixa. São nos casos de re-intervenção (insucesso) que a porcentagem encontrada aumenta. Isso se deve pela destruição do equilíbrio do ecossistema existente no sistema de canais provocado pela instrumentação pouco eficiente quanto à sanificação, mas que propicia a sobrevivência de microrganismos resistentes (SIQUEIRA JR, 1997; SIQUEIRA JR. et al, 2002a; SUNDQVIST, 1992; SUNDQVIST et al. 1979). Somados a isso se têm ainda a resistência desse microrganismo a uma série de substâncias antimicrobianas, sobretudo as cepas mais selvagens (EVANS et al., 2002; FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005; HUBBLE et al., 2003; SIRÉN et al., 2004). Embora em estudos de Gomes et al. (2006), e Zoletti, Siqueira Jr e Santos (2006) ambos utilizando PCR, os resultados demonstraram alta concentração de *E. faecalis* em infecções primárias e em dentes tratados sem lesão

periapical, contrariando o que normalmente é encontrada como resultados com métodos de cultura. No presente estudo, optou-se pelo método de contagem de células pela necessidade da mensuração da quantidade de microrganismos viáveis tanto no momento da contaminação, como após os procedimentos terapêuticos, mesmo sabendo-se o nível de precisão dessa metodologia.

O hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais largamente utilizada atualmente em Endodontia. Assim, muitos autores testaram desde associações do mesmo com outras substâncias bem como variação de sua viscosidade. Quanto à sua consistência, foi demonstrado por Behnen et al. (2001), que as pastas mais fluidas foram mais efetivas frente ao *E. faecalis* nas mais diversas profundidades de dentina que as pastas mais viscosas.

Na tentativa de potencialização da medicação intracanal de hidróxido de cálcio frente ao *E. faecalis*, muitas associações foram testadas. As associações de hipoclorito de sódio ou clorexidina com hidróxido de cálcio (*in vitro*) foram mais efetivas que o mesmo isoladamente (ZEHNDER et al., 2003), também as associações do último com iodo-iodeto de potássio e com clorexidina *in vitro* foram mais efetivas (SIRÉN et al., 2004) que sua utilização pura. Já as associações de medicação de hidróxido de cálcio e clorexidina em pontas de gutas percha comercializadas, também são alternativas testadas sem sucesso contra *E. faecalis* (OZTAN; KYIAN; GERCEKER, 2006).

Quanto às soluções irrigadoras utilizadas na terapêutica endodôntica, o hipoclorito de sódio, nas mais diversas concentrações apresenta excelente potencial antimicrobiano (AUN; PAIVA, 1982; BERBER et al., 2006; BUCK et al., 2001; BYSTRÖM; SUNDQVIST, 1985; SASSONE et al., 2003). Em alguns estudos foi demonstrado seu maior poder bactericida quando comparado à clorexidina

(BUCK et al., 2001) em outros o resultado entre as duas substâncias foi similar (SASSONE et al., 2003; SIQUEIRA JR et al., 2002b; ZEHNDER et al., 2003). Frente ao *E. faecalis*, o hipoclorito de sódio tem eficácia alta, porém não consegue eliminar por completo a contaminação intracanal, sobretudo em microrganismos situados nos túbulos dentinários (BUCK et al., 2001; NAIR et al., 2005; SIQUEIRA JR et al., 2002b). O mesmo ocorre com a clorexidina que não obteve também esterilização do sistema de canais (VIVACQUA-GOMES et al., 2005).

O hipoclorito de sódio apresenta ação na desnaturação protéica e saponificação de gorduras, o que potencializa seu efeito de limpeza nas paredes dos canais radiculares (CUNNINGHAM; BALEKJIAN, 1980) que comparado com a clorexidina apresentou-se superior (YAMASHITA et al., 2003). Sua ação de aumento da permeabilidade dentinária foi demonstrada por vários autores, o que potencializa a efetividade da medicação intracanal (GAVINI; AUN; AKISUE, 1996; GAVINI; AUN; PESCE, 1994; PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; YAMASHITA et al., 2003), principalmente quando associado ao EDTA 17 % (GAVINI, 1992). O hipoclorito de sódio age na porção orgânica do magma favorecendo sua remoção durante a instrumentação, diminuindo também seu acúmulo na porção apical do canal, causando também melhor embricamento do cimento com a parede do canal e conseqüente melhor selamento marginal (GAVINI; AUN; AKISUE, 1996; PAIVA; ANTONIAZZI, 1988).

Devido às características do ecossistema endodôntico, ambiente com baixa tensão de oxigênio, características físicas como pH, há um favorecimento da proliferação de anaeróbios estritos. Assim Paiva e Antoniazzi (1973) propuseram uma associação entre peróxido de uréia e detergente - creme Endo PTC - para potencializar a liberação de oxigênio quando associado com hipoclorito de sódio

intracanal. Fica claro que esse ambiente rico em oxigênio se torna extremamente inóspito para esse ecossistema. O creme Endo PTC associado ao hipoclorito de sódio 0,5 % foi testado *in vivo* e demonstrou boa tolerância tecidual (BOMBANA et al., 1974) e excelente poder bactericida (LAGE-MARQUES; ANTONIAZZI, 2002; WEY FILHO et al., 1975). Além disso, essa associação produziu aumento de permeabilidade dentinária o que sabidamente favorece melhor ação da medicação intracanal e também melhor embricamento do cimento nas paredes do canal (LAGE-MARQUES; ANTONIAZZI, 2002; PAIVA; ANTONIAZZI, 1988; PROKOPOWITSCH; MOURA; MUENCH, 1989; ROBAZZA et al., 1987; SOUZA; AMORIM; LAGE-MARQUES, 2005).

Como irrigação final, a utilização de EDTA-T 17 % tem como função a remoção de *smear layer*, melhorando grau de limpeza da parede do canal (GAVINI, 1992, LAGE-MARQUES; ANTONIAZZI, 2002; PAIVA; ANTONIAZZI, 1988).

A utilização da instrumentação rotatória com limas de NiTi é uma realidade na Endodontia. Quando comparada com a instrumentação manual, a instrumentação rotatória não apresentou diferenças no que concerne à desinfecção do sistema de canais radiculares (BERBER et al., 2006; ROSSI et al., 2005; SIQUEIRA JR et al., 2002b). Quanto ao grau de limpeza das paredes do canal radicular, embora Rossi et al. em 2005 afirmem que o mesmo é conseguido com os dois tipos de técnicas, outros autores observaram que a técnica manual foi mais eficaz nesse aspecto (SCHAFFER; LOHMANN, 2002; SCHAFFER; SCHLINGEMANN, 2003).

A instrumentação rotatória provoca menor fadiga no operador e diminuição do tempo operatório (HULSMANN; BLUHM, 2004) e mantém o grau de curvatura do canal cirúrgico melhor que a instrumentação manual, isso devido à alta flexibilidade presente nesse tipo de liga (SCHAFFER; LOHMANN, 2002; SCHAFFER;

SCHLINGEMANN, 2003; TAŞDEMİR et al., 2005). Nesse tipo de instrumentação a técnica preconizada é coroa-ápice que se mostra mais segura quanto ao risco de fratura desse instrumento (ANKRUM; HARTWELL; TRUITT, 2004; JEON et al., 2003; SCHAFER; LOHMANN, 2002; SCHAFER; SCHLINGEMANN, 2003; TAŞDEMİR et al., 2005). Fica claro que a utilização de substâncias químicas auxiliares do preparo endodôntico, provoca menor atrito entre o instrumento e a parede do canal e conseqüentemente menor risco de fratura por fadiga do instrumento, bem como menor geração de calor na raiz. Dessa forma nesse estudo optamos pela utilização do sistema rotatório conjuntamente com a associação de creme Endo PTC e Líquido de Dakin segundo técnica preconizada por Paiva e Antoniazzi (LAGE-MARQUES; ANTONIAZZI, 2002). Além das propriedades antimicrobianas dessa associação, de aumento de permeabilidade causada pela mesma, tem-se ainda a ação lubrificante dada pela viscosidade do creme Endo-PTC.

O laser de alta potência, por suas características, tem capacidade de atuar tanto em tecidos duros como em tecidos moles. Assim, pode-se imaginar sua utilização em várias etapas do tratamento endodôntico. Estudos mostram que apesar de propriedades comuns, há diferenças entre os tipos de laser de alta potência, sendo necessária a análise dos mesmos para que seu uso seja adequado.

O laser de Nd:YAG, quando irradiado sobre dentina, provoca fusão, recristalização, que em microscopia eletrônica de varredura apresenta ilhotas de dentina interconectadas, maioria de túbulos dentinários fechados e áreas sem *smear layer*, provoca também a diminuição da permeabilidade dentinária, bem

como da infiltração apical (ANIC et al., 1998; LAGE-MARQUES, 1997; LEVY, 1992; STABHOLZ et al., 1992a;b).

Em estudo realizado por Cecchini (2001), o poder de desinfecção do laser de Nd:YAG foi menor que o conseguido pelo hidróxido de cálcio em dentina bovina contaminada por *Enterococcus faecalis*. Moshonov et al. (1995) demonstrou que o nível de desinfecção promovido pelo laser de neodímio foi menor que o obtido pelo hipoclorito de sódio a 1% deixado 2 minutos intracanal, também contra *Enterococcus faecalis*. O poder bactericida do laser de neodímio tem alguma seletividade pelo tipo bacteriano - creditada a sua afinidade por pigmentos, por exemplo: melanina, hemoglobina, corantes. O laser de diodo de alta potência, como o de neodímio tem espectro na faixa dos lasers infravermelho e seu comprimento de onda, entre 800 e 905 nm, é próximo ao comprimento de onda do laser de neodímio 1064 nm. Também tem ação na diminuição de permeabilidade dentinária, filia por corantes, mas não provoca *melting* característico do laser de neodímio em superfície dentinária (AUN; GAVINI; AUN, 2004; KLIM et al., 2000; PEARSON; SCHUKERT, 2003; SOUZA; AMORIM; LAGE-MARQUES, 2003; SOUZA; AMORIM; LAGE-MARQUES, 2006; THEODORO et al., 2003; WYMAN et al., 1992).

O funcionamento desse laser é baseado na passagem de corrente elétrica através de um material semicondutor (diodo – de Arseneto de Gálio-Alumínio) que emite luz, e é amplificada por uma cavidade óptica. Seu comprimento de onda acarreta numa melhor absorção pelos tecidos biológicos e pouca absorção e penetração por água e os cromóforos dos tecidos dentais. Essa característica promove uma penetração da luz laser pela dentina, mas pouco efeito na superfície da mesma, podendo agir na intimidade dos túbulos

dentinários com poder de desinfecção maior (MANNI, 2000). Seu poder de desinfecção é comprovado por inúmeros autores frente a diversos microrganismos, dentre eles o *E. faecalis* (GUTKNECHT et al., 2000; GUTKNECHT et al., 2004; KREISLER et al., 2003; MORITZ et al., 1997; RADAELLI, 2003; ZEGAIB, 2005).

Em terapia fotodinâmica, o laser de diodo vem sendo utilizado para desinfecção dentinária e de superfícies peri-implantes (DÖRTBUDAK et al., 2001; HAAS et al., 1997; LEE; BIRD; WALSH, 2004; SHIBLI et al., 2003; STABHOLZ et al., 2003). Em PDT os corantes denominados sensibilizadores, mais utilizados pelos autores com laser de diodo são os azuis (toluidina, metileno, etc.) que quando ativados pela luz provocam morte celular principalmente por apoptose. Esse tipo de morte celular evita o extravasamento de endotoxinas bacterianas para a região periodontal, provocando menor dano aos tecidos adjacentes.

A tecnologia laser é considerada segura se bem utilizada, principalmente nos lasers que possuem refrigeração por causarem menor injúria térmica. Os níveis de elevação de temperatura alcançados pelo uso do laser respeitam os limites inferiores ao de injúria térmica óssea que é de 47 °C (ERIKSSON; ALBREKTSSON, 1983). Obviamente esse recurso tem necessidade de treinamento do operador e respeito às normas de biossegurança intrínsecas ao uso, como óculos de proteção apropriados ao profissional e ao paciente, máscaras, etc. O custo desse recurso ainda é o que contraria sua utilização em consultório particular. O seu uso deve ser vinculado a centros que permitam a sua utilização por profissionais habilitados, proporcionando um menor custo operacional. Dessa forma o laser de diodo apresenta-se com a vantagem de ter um custo bem mais acessível que a maioria

dos aparelhos lasers. Além disso, o equipamento laser de diodo é compacto e tem utilização em procedimentos clínicos de diversas áreas da Odontologia (RADAELLI, 2003; SOUZA; AMORIM; LAGE-MARQUES, 2003; SOUZA; AMORIM; LAGE-MARQUES, 2006).

Neste experimento, a concentração de células do inóculo, verificada pela turbidez da cultura estava aproximadamente a 10^8 células /mL, no grupo controle a média encontrada foi de 10^4 u.f.c./mL (máximo de $8,9 \times 10^4$ e mínimo de $5,2 \times 10^2$ u.f.c./mL). Esses dados remetem a pelo menos 2 hipóteses, que não se excluem: a quantidade de microrganismos no canal diminuiu por morte celular advinda das próprias adversidades do ecossistema (menor quantidade de nutriente, idade da cultura pelo tempo de incubação, penetração intratubular com menor quantidade de meio de cultura pelas condições físicas, a própria diluição provocada pela renovação do meio de cultura a cada dia, etc.) e o grau de precisão da metodologia de contagem de unidades formadoras de colônia. Essa última hipótese, também explica ser encontrada nenhuma u.f.c./mL no grupo com irradiação laser. Acredita-se que o nível de sensibilidade dessa metodologia não foi suficiente para detectar possíveis células viáveis desse grupo e dos outros também. Mesmo assim o método, além de ser amplamente utilizado e há bastante tempo, se mostrou eficaz para a comparação dos grupos evidenciando que a irradiação de laser de diodo provocou maior nível de desinfecção que nos outros dois grupos testados com diferenças estatísticas significantes. Nessa metodologia adaptada de estudo realizado por Haapasalo e Ørstavik (1987) em dentes bovinos, a leitura se fez em duas extensões da dentina radicular (dentina circunvizinha ao canal principal e dentina externa), isso para que se testasse a capacidade da radiação do laser de diodo de desinfetar em profundidade essa dentina. Foram utilizadas brocas tipo Batt

ao invés de brocas esféricas, como na metodologia original, pelo menor volume das raízes de dentes humanos utilizadas na pesquisa, e para manutenção da conicidade do remanescente de modo que o desgaste pudesse o mais fielmente possível dividir transversalmente a raiz em duas porções de mesma área. A divisão em terços também se deu pelo mesmo motivo, aumentar o controle do desgaste.

Como os resultados encontrados em estudos anteriores o maior nível de infecção foi encontrado no terço cervical, seguido dos terços médio e apical. A decorrência de tal fato se deve principalmente pela maior quantidade de túbulos dentinários de cervical para apical no sistema de canais radiculares (AKPATA; BLECHMAN, 1982; SEN; PISKIN; DEMIRCI, 1995; SIQUEIRA JR, 1997; SUNDQVIST, 1992).

É sabido que o preparo químico cirúrgico apresenta alta eficácia contra a contaminação do canal principal, o que foi corroborado por este estudo onde a taxa de desinfecção do grupo do preparo chegou a 98,39 %. Esses resultados obtidos *in vitro* comprovam o alto poder antimicrobiano da associação do Líquido de Dakin e do creme Endo PTC com irrigação final com EDTA-T 17%, o que enfatiza a importância crucial do preparo químico-cirúrgico na desinfecção do sistema de canais radiculares. Também demonstra que a utilização de sistemas rotatórios durante a terapia endodôntica promove resultados totalmente satisfatórios quanto a desinfecção, o que é demonstrado por outros estudos (BERBER et al., 2006; ROSSI et al., 2005; SIQUEIRA JR et al., 2002b).

Quanto à ação do laser de diodo, os resultados deste experimento demonstraram seu alto poder bactericida frente ao *E. faecalis* remanescente pós preparo endodôntico. Posto ser a contaminação persistente no sistema de canais radiculares a principal causa do insucesso no tratamento, e o *E. faecalis* um dos

microrganismos mais comumente encontrado nesses casos, com resistência à medicação intracanal mais utilizada atualmente; os resultados encontrados neste experimento são muito promissores à aplicação clínica desse tipo de laser. Sua ação em profundidade de túbulos dentinários, também indica sua utilização em casos onde dificuldades anatômicas não permitem a ação dos instrumentos nas paredes dentinárias, como região de delta apical. Os parâmetros de utilização do laser desse experimento se revelaram seguros, o que foi demonstrado em estudo de Radaelli (2003), além disso, a técnica de irradiação é rápida e de fácil execução. Mais estudos com outros tipos bacterianos e *in vivo* devem ser realizados com laser de diodo.

7 CONCLUSÕES

A irradiação do laser de diodo proporcionou aumento da desinfecção da dentina radicular em profundidade nos parâmetros e amostras testadas.

A irradiação do laser de diodo de alta potência promoveu 100 % de redução da contaminação em profundidade de dentina radicular por *Enterococcus faecalis*.

Os espécimes submetidos ao preparo químico cirúrgico não irradiados, apresentaram a desinfecção na profundidade de dentina radicular de 98,39 %.

REFERÊNCIAS¹

Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall *in vitro*. J Dent Research 1982;61(2):435-8.

Anic I, Segovic S, Katanec D, Prskalo K, Najzar-Fleger D. Scanning electron microscopic study of dentin lased with argon, CO₂, and Nd:YAG laser. J Endod 1998;24(2):77-81.

Ankrum MT, Hartwell GR, Truitt JF. K³ Endo, ProTaper, and ProFile systems: breakage and distortion in severely curved roots of molars. J Endod 2004;30(4):234-7.

Archilla JRF, Lage-Marques JL, Mirage A. Análise térmica de diferentes técnicas de utilização do laser de Nd:YAG [resumo H003]. Pesqui Odontol Bras 2002;16 Supl:15.

Aun CA, Gavini G, Aun CE. Influência dos lasers Nd:YAG e diodo na microinfiltração retrógrada do MTA *in vitro* [resumo Pc 55]. Pesqui Odontol Bras 2004;18 Supl:209.

Aun CE, Paiva JG. Viabilidade da velocidade de ação germicida do hipoclorito de sódio em função da concentração (Contribuição ao estudo). Rev Assoc Paul Cir Dent 1982;36(5):510-9.

Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC 3rd. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. J Endod 2001;27(12):765-7.

Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. Int Endod J 2006;39(1):10-7.

Bianconcini IV. Avaliação da citotoxicidade do digluconato de clorexidina a 2,5% e a 5%, do hipoclorito de sódio a 1% e do soro fisiológico, em subcutâneo de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Bombana AC, Paiva JG, Alvares S, Antoniazzi JH. Reação inflamatória do olho de coelho que se segue à instilação de alguns fármacos de uso endodôntico. Rev Assoc Paul Cirurg Dent 1974;28(4):216-23.

Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. J Endod 2001;27(3):206-8.

Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J 1985;18:35-40.

Cassatly MG, Rostock M, Gocke M W. Iatrogenic osteonecrosis of the maxilla caused by laser injury. J Oral Maxil Surg 1999;57(2):184-6.

Cecchini SCM. Desinfecção de dentina radicular pela irradiação dos lasers de Nd:YAG, Ho:YLF e Er:YAG: um modelo *in vitro* [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.

Cunningham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1980;49(2):175-7.

Dählen G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. Oral Microbiol Immunol 2000;15(5):309-12.

Dederich DN. Laser/tissue interaction: what happens to laser light when it strikes tissue? J Am Dent Assoc 1993;124(2):57-61.

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

Dörtbudak O, Haas R, Bernhart T, Mailath-Pokomy G. Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. Clin Oral Implants Res 2001;12(2):104-8.

Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. J Prosthet Dent 1983;50(1):101-7.

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

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005;38(6):372-80.

Gavini G. Avaliação "in vitro" da limpeza da parede do canal radicular (terço apical), após o preparo químico-mecânico, valendo-se da Microscopia Eletrônica de Varredura, tendo como fonte de variação a solução irrigadora e seu volume [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1992.

Gavini G, Aun CE, Akisue E. Influência da camada residual de magma no selamento apical de dentes obturados com cones de guta-percha e cimento de N-Rickert. *RPG* 1996;3(3):250-5.

Gavini G, Aun CE, Pesce HF. Análise das condições de limpeza do terço apical do canal radicular após o preparo químico-mecânico. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1994;8(3):155-62.

George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005;31(12):867-72.

Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(2):247-53.

Guimarães CCP. Avaliação da atividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina e do paramonoclorofenol em diferentes veículos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2001.

Gutierrez JH, Jofre A, Villena F. Scanning electron microscope study on action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;69(4):491-501.

Gutknecht N, Franzen R, Schippers M, Lampert F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J Clin Laser Med Surg* 2004;22(1):9-13.

Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in vitro root canal. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14(2):77-80.

Gutknecht N, van Gogswaardt 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* 2000;18(2):57-60.

Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66(8):1375-9.

Haas R, Dörtbudak O, Mensdorff-Pouilly N, Mailath G. Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(4):249-54.

Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18(2):121-6.

Hulsmann M, Bluhm V. Efficacy, cleaning ability and safety of different rotary NiTi instruments in root canal retreatment. *Int Endod J* 2004;37(7):468–76.

Jeon IS, Spangberg LS, Yoon TC, Kazemi RB, Kum KY. Smear layer production by 3 rotary reamers with different cutting blade designs in straight root canals: a scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(5):601-7.

Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod* 2006;32(10):946-50.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald JR. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20(1):340-9.

Klim JD, Fox DB, Coluzzi DJ, Neckel CP, Swick MD. The diode laser in dentistry. *Rev Wavelengths* 2000;8(4):13-6.

Kreisler M, Al-Haj H, d'Hoedt B. Intrapulpal temperature changes during root surface irradiation with an 809 nm GaAlAs laser. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(6):730-5.

Kreisler M, Kohnen W, Beck M, Al-Haj H, Christoffers AB, Gotz H, et al. Efficacy of NaOCl/H₂O₂ irrigation and GaAlAs laser in decontamination of root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 2003;32(3):189-96.

Kutsch VK. Lasers in dentistry: comparing wavelengths. *J Am Dent Assoc* 1993;124(2):608-13.

Lage-Marques JL. Avaliação dos efeitos da irradiação laser, utilizando Nd:YAG, CO₂, e argônio no selamento dentinário e marginal de obturações retrógradas [Tese de Livre-Docência em Endodontia]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1997.

Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Versão eletrônica da técnica endodôntica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo [CD-ROM]. São Paulo: Ajna Interactive; 2002.

Lee MT, Bird PS, Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. *Aust Endod J* 2004;30(3):93-8.

Levy G. Cleaning and shaping the root canal with a Nd:YAG laser beam: a comparative study. *J Endod* 1992;18(3):123-7.

Maiman TH. Biomedical lasers evolve toward clinical applications. *Hosp Manage* 1966;101(4):39-41.

Manni JG. The diode laser in dentistry. *Rev Wavelengths* 2000;8(4):13.

Meryon SD, Brook AM. Penetration of dentine by three oral bacteria *in vitro* and their associated cytotoxicity. *Int Endod J* 1990;23(4):196-202.

Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos* 1894;36:505-28.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981;19(6):475-84.

Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J, Speer W. In vitro irradiation of infected root canals with diode laser: Results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int* 1997;28(3):205-9.

Moshonov J, Ørstavik D, Yamauchi S, Pettiette M, Trope M. Nd:YAG laser irradiation in root canal disinfection. *Endod Dent Traumatol* 1995;11(11):220-4.

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

Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(21):142-9.

Oztan MD, Kiyan M, Gerceker D. Antimicrobial effect, in vitro, of gutta-percha points containing root canal medications against yeasts and *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(3):410-6.

Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia: bases para a prática clínica* 2a. ed. São Paulo: Artes Médicas; 1988.

Paiva JG, Antoniazzi JH. O uso de uma associação de peróxido de uréia e detergente (Tween 80) no reparo químico-mecânico dos canais radiculares. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1973;27(7):416-23.

Pearson GJ, Schuckert KH. The role of lasers in dentistry: present and future. *Dent Update*. 2003;30:70-6.

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

Pick RM. Lasers in dental surgery. *Calif Dent Assoc J* 1987;15:10-4.

Prokopowitsch I, Moura AAM, Muench A. Análise "in vitro" da permeabilidade dentinária radicular do terço apical, tendo como fonte de variação a substância química auxiliar da instrumentação. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1989;3(2):345-53.

Radaelli CM, Zezell DM, Cai S, Antunes A, Gouw-Soares SC. Effect of a high power diode laser irradiation in root canals contaminated with Enterococcus faecalis. "In vitro study". Int Congr Ser 2003;1248:273-6.

Robazza CRC, Costa WF, Pécora JD, Antoniazzi JH, Paiva JG. Avaliação da permeabilidade dentinária radicular apical segundo a quantidade de instrumentos empregados durante o preparo químico-mecânico. Rev Bras Odontol 1987;44(1):20-5.

Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotatory or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide 1 % chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99(5):628-36.

Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata Jr R. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. Int Endod J 2003;36(12):848-52.

Schafer E, Lohmann D. Efficiency of rotary nickel-titanium FlexMaster instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile--Part 2. Cleaning effectiveness and instrumentation results in severely curved root canals of extracted teeth. Int Endod J 2002;35(6):514-21.

Schafer E, Schlingemann R. Efficiency of rotary nickel-titanium K3 instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile. Part 2. Cleaning effectiveness and shaping ability in severely curved root canals of extracted teeth. Int Endod J 2003;36(3):208-17.

Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Dent Traumatol 1995;11:6-9.

Shibli JA, Martins MC, Theodoro LH, Lotufo RF, Garcia VG, Marcantonio EJ. Lethal photosensitization in microbiological treatment of ligature-induced peri-implantitis: a preliminary study in dogs. J Oral Sci 2003;45(1):17-23.

Silva Garcez A, Nunez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006;102(4):93-8.

Siqueira Jr JF. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: MEDSI; 1997. cap. 3, p. 31-51.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* Species, Streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. J Endod 2002a;28(3):168-72.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhães FAC, Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. J Endod 2002b;28(3):181-4.

Sirén EK, Haapasalo MPP, Waltimo TMT, Ørstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. Eur J Oral Sci 2004;112(4):326–31.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Avaliação da permeabilidade dentinária provocada por laser diodo em superfície externa de raiz [resumo Ic23]. Pesqui Odontol Bras 2003;17 Supl:82.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Avaliação de permeabilidade dentinária relacionada à dinâmica de substituição das substâncias químicas auxiliares do preparo dos canais radiculares. RPG 2005;12(2):195-8.

Souza EB, Amorim CVG, Lage-Marques JL. Effect of diode laser irradiation on the apical sealing of MTA retrofillings. Braz Oral Res 2006;20(3):231-4.

Stabholz A, Khayat A, Weeks DA, Neev J, Torabinejad M. Scanning electron microscopic study of the apical dentine surfaces lased with Nd:YAG laser following apicectomy and retrofill. Int Endod J 1992a;25(6):288-91.

Stabholz A, Khayat A, Ravanshad SH, McCarthy D, Neev J, Torabinejad M. Effects of Nd:YAG laser on apical seal of teeth after apicoectomy and retrofill. J Endod 1992b;18(8):371-5.

Stabholz A, Zeltser R, Sela M, Peretz B, Moshonov J, Ziskind D, et al. The use of lasers in dentistry: principles of operation and clinical applications. Compend Cont Educ Dent 2003;24(12):935-41.

Stern RH, Sognnaes RF. Laser beam on dental hard tissues [abstract 307]. J Dent Res 1964;43(5):873.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod 1992;18(9):427-30.

Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson AP, Sjogren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. Infect Immun 1979;25(2):685-93

Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. Eur J Oral Sci 2004;112:523–9.

Taşdemir T, Aydemir H, Inan U, Ünal O. Canal preparation with Hero 642 rotary Ni-Ti instruments compared with stainless steel hand K-file assessed using computed tomography. Int Endod J 2005;38(6):402-8.

Theodoro LH, Haypek P, Bachmann L, Garcia VG, Sampaio JEC, Zezell DM, et al. Effect of Er:YAG and diode laser irradiation on the root surface: morphological and thermal analysis. J Periodontol 2003;74(6):838-43.

Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. Int Endod J 2005;38(10):697–704.

Walia HM, Brantley WA, Gerstein H. An initial investigation of the bending and torsional properties of Nitinol root canal files. J Endod 1988;14(7):346-51.

Wey Filho R, Aun CE, Paiva JG, Rezende E. Efeito antimicrobiano *in vitro* de algumas substâncias químicas auxiliares do preparo químico-mecânico do canal, utilizada na desinfecção de canais radiculares (Contribuição ao estudo). Rev Assoc Paul Cirurg Dent 1975;29(6):40-7.

Wyman A, Duffy S, Sweetland HL, Sharp F, Rogers K. Preliminary evaluation of a new high power diode laser. Lasers Surg Med 1992;12(5):506-9.

Yamashita JC, Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as root-canal irrigant. Inter Endod J 2003;36(6):391-4.

Zegaib S. Análise microbiológica em bolsas periodontais infectadas, tratadas pelos métodos de raspagem e alisamento radicular, raspagem ultra-sônica e raspagem e alisamento radicular coadjuvado pelo laser de diodo de alta potência (815nm) Estudo *in vivo* [Dissertação Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Zehnder M, Grawher M, Hasselgren G, Waltimo T. Tissue-dissolution capacity and dentin-disinfecting potential of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(5):608-13.

Zoletti GO, Siqueira Jr JF, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod* 2006;32(8):722-6.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 40/04
2ª Via

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *“Avaliação da desinfecção da dentina radicular em profundidade provocada pela irradiação do laser de diodo de alta potência”*, de responsabilidade da Pesquisadora Eliana Barbosa de Souza, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê **relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa** e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 31 de março de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP