

LEONARDO GONÇALVES

**EFEITO DE FOTOATIVADORES UTILIZADOS NA IRRADIAÇÃO
LASER INTRACANAL**

São Paulo

2005

Leonardo Gonçalves

**EFEITO DE FOTOATIVADORES UTILIZADOS NA IRRADIAÇÃO
LASER INTRACANAL**

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

2005

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Gonçalves, Leonardo

Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal / Leonardo Gonçalves; orientador José Luiz Lage Marques. -- São Paulo, 2005.
124p. : tab., fig., 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Endodontia) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Tratamento do canal radicular – Fotoquimioterapia – Efeitos 2. Fotoquimioterapia – Corantes – Efeitos 3. Endodontia

CDD 616.6342
BLACK D242

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gonçalves L. Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, __/__/____

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: _____

DEDICATÓRIA

À minha avó **Alice de Oliveira Rocha** (*em memória*) por ter sido como uma mãe e dedicar sua vida a mim e meus irmãos.

Ao **Professor Doutor Hildeberto Francisco Pesce** (*em memória*) pela amizade, confiança, pelos ensinamentos e acreditar em minha pessoa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **José Luiz Lage Marques** pela paciência, competência, pelas oportunidades oferecidas à minha pessoa e por ser um modelo de professor a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Ananias Gonçalves e Nancy Moscardi Gonçalves** pelo amor, dedicação, princípios e ensinamentos.

Aos meus irmãos **Edney Gonçalves e Rogério Gonçalves** pela amizade e companheirismo.

À **Adriana Marote** com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **João Humberto Antoniazzi** pela preciosa orientação na arte de ensinar.

Aos Professores da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela amizade e convivência científica compartilhada.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Endodontia, pela amizade e companheirismo.

À Secretária **Ana** pela amizade e ajuda durante todo este tempo.

Aos amigos **Ana Lúcia, Ângela, Cristiane, Luciano, Ricardo e Rodrigo**.

A Secretaria **Neusa, Aldo** e aos técnicos **Luizinho, Cleber e Arnaldo** por sua amizade.

A todo o pessoal da biblioteca da FOUSP.

À CAPES pela bolsa de Mestrado no programa Demanda Social.

Gonçalves L. Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser Intracanal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o grau de manchamento dental, após o tratamento endodôntico, quando aplicada a terapia fotodinâmica, utilizando-se os corantes azuis de metileno e de orto toluidina como fotossensibilizadores, através do sistema RGB e K de cores do programa Adobe Photoshop. Vinte dentes humanos unirradiculares tiveram seus canais preparados pela técnica seriada com instrumentos endodônticos, Endo-PTC e líquido de Dakin. Constituíram-se três grupos experimentais, Grupo C: Corante em sua forma líquida, Grupo E: Substância química Endo PTC associada ao corante em sua formulação e Grupo C+E: Corante em sua forma líquida com irrigação final de líquido de Dakin em conjunto com Endo PTC por 15 min. A leitura de cor foi executada antes (L0), imediatamente após o preparo químico-cirúrgico (L1) e dez dias depois da irradiação (L2). Análise estatística pelo teste de Wilcoxon comprovou que os resultados dos espécimes do Grupo E nas interações L1-L2 e L0-L2 não acarretaram diferenças significativas. Pelos resultados obtidos foi possível concluir que: com base no projeto experimental que executou a técnica endodôntica tradicional, todos os corantes ativadores testados, alteraram os valores de K. Na análise comprobatória dos resultados de alteração cromática pelos valores de K os melhores resultados foram observados nos espécimes dos grupos Metileno E e Toluidina E que na interação L0-L1 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes a 5%.

Palavras-Chave: Tratamento endodôntico; terapia fotodinâmica; corantes; laser

Gonçalves L. Effects of the photosensitizers used during the intracanal laser irradiation [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

The present study had as objective to evaluate the dental staining after the root canal treatment when it's used the photodynamic therapy, using the dyes methylene blue and orto toluidina blue as photosensitizers, through the RGB and K color system from the software Adobe Photoshop. Twenty human single root teeth had its roots canals prepared by the seriated technique using the endodontic instruments plus Endo-PTC and Dakin. Three experimental groups were formed: Group C: dye in its liquid form; Group E: dye associated to the Endo-PTC cream and Group CE: dye in its liquid form with final irrigation of the Dakin plus Endo-PTC for 15 minutes. The color measure was taken before (L0), immediately after (L1) and ten days after the laser irradiation. The statistical analysis performed using the Wilcoxon test proves that the results of the specimens of the E Group on the interactions L1-L2 and L0-L2 didn't have any significant differences. Based on the results obtained it was possible to conclude that: based on the experimental design that performed the traditional endodontic technique, all the activating dyes tested altered the values of K. After carrying out an analysis of the chromatic alteration results according to K values, the best results were observed in specimens of group methylene E and group toluidine E, both of which presented no statistically significant difference for the interaction L0-L1 ($p \leq 5\%$).

Keywords: Root canal treatment, photodynamic therapy, dyes; laser

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Dispositivo de resina.....	74
Figura 4.2 - Suportes de silicone.....	74
Figura 4.3 - Dispositivo de resina e suporte de silicone	74
Figura 4.4 - Espécime posicionado em seu respectivo suporte de silicone	75
Figura 4.5 - Espécime em posição para tomada.....	75
Figura 4.6 - Marcações na mesa estativa	76
Figura 4.7 Área visualizada no momento da tomada fotográfica	76
Figura 4.8 Marcações na mesa estativa	76
Figura 4.9 Corantes acondicionados em tubetes anestésicos.....	78
Figura 4.10 Equipamento laser utilizado.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Vias fotocitóticas nas células microbianas	50
Tabela 2.2 - Principais corantes utilizados em terapia fotodinâmica com suas respectivas bandas de absorção.....	51
Tabela 5.1 - Valores de RGB e K para o grupo L com o corante azul de metileno	82
Tabela 5.2 - Valores ..de RGB e K para o Grupo L com o corante azul de toluidina O	83
Tabela 5.3 - Valores de RGB e K para o Grupo E com o corante azul de metileno	84
Tabela 5.4 - Valores de RGB e K para o Grupo E com o corante azul de toluidina O .	85
Tabela 5.5 - Valores de RGB e K para o Grupo CE com o corante azul de metileno ..	86
Tabela 5.6 - Valores de RGB e K para o Grupo CE com o corante azul de toluidina O	87
Tabela 5.7 - Valores das médias de K para o Grupo L com o corante azul de metileno/azul de toluidina O	88
Tabela 5.8 - Valores das médias de K para o Grupo E com o corante azul de metileno/azul de toluidina O	89
Tabela 5.9 - Valores das médias de K para o Grupo CE com o corante azul de metileno/azul de toluidina O	90
Tabela 5.10 -Valores das médias de K entre os grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de metileno	91
Tabela 5.11 - Valores das médias de K entre os Grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de toluidina O.....	92

Tabela 5.12 - Análise das diferenças das porcentagens dos diversos grupos experimentais e análise estatística pelo teste de Wilcoxon.....	93
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Médias de K Grupo L azul de metileno/azul de toluidina O.....	88
Gráfico 5.2 - Médias de K Grupo E azul de metileno/azul de toluidina O	89
Gráfico 5.3 - Médias de K Grupo CE azul de metileno/azul de toluidina O.....	90
Gráfico 5.4 - Valores das médias de K entre os Grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de metileno	91
Gráfico 5.5 - Valores das médias de K entre os Grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de toluidina O.....	92

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AM	azul de metileno
ATO	azul de orto toluidina
CO ₂	laser de Dióxido de Carbono
Er:YAG	laser de Érbio Ítrio Alumínio Granada
FLL	fotossensibilização letal
GaAlAs	laser de Arseneto de Gálio-Alumínio
GaAs	laser de Arseneto de Gálio
He-Ne	laser de Hélio-Neônio
Ho:YAG	laser de Holmio Ítrio Alumínio Granada
HILT	high-intensity laser therapy—laser terapia de alta intensidade
InGaAlP	laser de Fosforeto de Índio Gálio Alumínio

InGaPAs	laser de Arseneto de Índio Gálio Fósforo
LILT	low-intensity laser therapy—laser terapia de baixa intensidade
LPS	lipopolissacarídeo
min	minutos
NaOCl	hipoclorito de sódio
Nd:YAG	laser de Neodímio Ítrio Alumínio Granada
PDT	photodynamic therapy (terapia fotodinâmica)
TPI	tempo de pré-irradiação
RGB	red green blue (sistema de cores digital)
PQC	preparo químico-cirúrgico

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
K	graus Kelvin
nm	nanômetro
mW	miliwatt
mm	milímetro
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
mg/kg	miligrama por kilograma
g	grama
μm	micrometro
mm/s	milímetro por segundo
λ	comprimento de onda

J joule

W/cm² watt por centímetro quadrado

ml mililitro

mW/cm² miliwatt por centímetro quadrado

mJ milijoule

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Aspectos Microbiológicos das infecções endodônticas	22
2.2 Laserterapia de baixa potência	26
2.3 Laserterapia de alta potência	34
2.3.1 alterações morfológicas produzidas pela irradiação de alta potência.....	35
2.3.2 alterações microbianas produzidas pela irradiação de alta potência.....	39
2.4 Conceito da Terapia Fotodinâmica	41
2.4.1 mecanismo de ação da fotossensibilização letal e interação fotossensibilizante / célula.....	43
2.4.2 ação da fotossensibilização letal em microrganismos	46
2.5 Aspectos de interesses clínico da fotossensibilização letal	53
2.5.1 efeitos sobre células hospedeiras	65
3 PROPOSIÇÃO	68
4 MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1 Material	69
4.2 Método	71
4.2.1 procedimentos prévios	71
4.2.1.1 <i>Preparo dos espécimes</i>	71
4.2.1.2 <i>Preparo para tomada fotográfica</i>	73
4.2.2 tomadas Fotográficas	76
4.2.3 modelos experimentais.....	77
4.2.4 dinâmica da aplicação do corante e irradiação laser.....	77
4.2.5 análise cromática.....	79

5 RESULTADOS	81
6 DISCUSSÃO	94
7 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	112
ANEXO	124

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da terapia endodôntica é fundamental para devolver ao dente plenas condições de saúde, e restabelecer sua estética e função.

Sabe-se da importância da boa qualidade do tratamento endodôntico e da criteriosa realização dos passos operatórios. A cirurgia de acesso, quando realizada corretamente, oferece condições adequadas para um bom preparo químico-cirúrgico do canal radicular, permitindo que os instrumentos tenham ação em todas as paredes e promovam, juntamente com as substâncias químicas auxiliares, a limpeza e desinfecção, além de dar forma adequada, condição que irá proporcionar uma obturação tridimensional e compacta. O canal tratado inadequadamente favorece a recontaminação e, portanto, o insucesso endodôntico.

Soma-se ainda ao fato exposto, a complexidade anatômica dos canais radiculares, em muitos casos, sua limpeza e modelagem tornam-se tarefa bastante difícil, e a alta resistência de alguns patógenos à ação dos medicamentos usados convencionalmente no tratamento endodôntico. Como exemplo, o *Enterococcus faecalis*, que se apresenta resistente ao hidróxido de cálcio, não necessita de outras bactérias para sobreviver no interior do canal radicular e mesmo em pequena quantidade pode sobreviver ao tratamento endodôntico e persistir após a obturação do canal.

Cientes da importância de se obter o processo de cura no menor lapso de tempo e da eliminação ou mesmo inativação do microorganismo no interior do complexo radicular, vários pesquisadores vêm estudando fármacos e,

principalmente, desenvolvendo técnicas novas na tentativa de lograr tal efeito, sem, contudo, lesar os tecidos vivos perirradiculares.

Com origem na língua inglesa, laser é um acrônimo para "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*" (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). A radiação laser no intervalo de 300 a 600nm é eletromagnética não-ionizante, apresenta um único comprimento de onda (monocromática), possui coerência espacial e temporal (propaga-se na mesma fase no espaço e no tempo) e pode apresentar uma alta densidade de energia em pequenos pontos devido a sua alta direcionalidade. Tais características conferem ao laser suas propriedades terapêuticas.

A fotossensibilização letal (FLL) promovida por laser de baixa potência apresenta o mesmo princípio da PDT (Terapia Fotodinâmica), a radiação laser ativa um corante depositado no organismo alvo e o sensibilizara de duas formas distintas, seja por meio do sistema redox, promovendo após interação com o meio, uma resposta citotóxica que gera radicais livres com conseqüente morte celular, seja por meio da liberação de energia, transformando o oxigênio molecular em oxigênio singlete, citotóxico para microorganismos.

Para isto, diversos corantes vêm sendo testados, nas cores azuis, roxas, marrons, verdes, entre outras. A busca por agentes fotossensibilizadores tem então sido uma constante no campo da PDT, tanto para o tratamento de cânceres, como para a eliminação de microorganismos. Corantes menos tóxicos, mais ressonantes com o comprimento de onda emitidos pelos lasers têm sido o ideal de diversos pesquisadores. E quanto mais próximos deste ideal estes agentes se mostrarem, mais a PDT realizará sua função na prática clínica endodôntica.

Com relação a FLL ligada a desinfecção do canal radicular sabe-se que ela se apresenta como uma alternativa eficiente em relação a substâncias químicas e antibióticos tradicionalmente utilizados, porém é sabido também que estes corantes apresentam um alto grau de manchamento dental inviabilizando assim sua aplicação clínica.

Estudos têm demonstrado que corantes tais como azul de orto toluidina (ATO) e azul de metileno (AM) associados a um laser com comprimento de onda por volta de 630nm, apresentam o melhor resultado na eliminação de culturas bacterianas e de fungos

Pelo exposto, a terapia fotodinâmica com fotossensibilização letal apresenta capacidade comprovada no combate à redução bacteriana, o que seria de grande interesse na área endodôntica. Justifica-se então avaliar o efeito da utilização destes agentes fotossensibilizadores (corantes), quanto a alteração cromática, quando de sua aplicação intracanal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A manutenção do órgão dental se refere à preservação da integridade morfofuncional do sistema mastigatório, onde são encontradas várias estruturas que se relacionam anatomicamente e fisiologicamente a toda dinâmica do aparelho digestivo (PESCE, 1979).

Sendo assim, as medidas de preservação têm por objetivo manter a estabilidade anátomo-funcional do elemento dentário e atuar nos processos patológicos que possam acometê-lo. Cabe considerar como fator determinante da obtenção da cura o íntimo relacionamento entre o sistema de canais radiculares e o periodonto.

Deste ponto de vista, o tratamento endodôntico visa obter a reparação dos tecidos afetados, permitindo que o dente retorne às suas atividades estéticas e funcionais.

Quanto ao tratamento do dente despulpado, é necessário observar algumas diferenças com relação àqueles portadores de polpa viva, tal como a extensão do processo infeccioso (presença ou não de lesão perirradicular) no sistema de canais radiculares, bem como os espécimes microbianos normalmente envolvidos.

2.1 Aspectos microbiológicos das infecções endodônticas

A presença de bactérias persistentes no sistema de canais radiculares pode levar a uma falha da terapia instaurada. Ando & Hoshino (1990) avaliaram a capacidade de invasão bacteriana nos túbulos dentinários em dentes contaminados e constataram que o número de anaeróbios cultivados era muito maior do que de aeróbios.

Na polpa dental a infecção bacteriana acarreta a sua decomposição, estimulando uma resposta de células inflamatórias com conseqüente reabsorção óssea do periápice. Desta forma, o sucesso do tratamento endodôntico está relacionado com o controle deste processo infeccioso e do entendimento da natureza microbiana deste processo (ØRSTAVIK; PITT FORD, 1998).

A participação dos microrganismos nos processos inflamatórios pulpare os transformam nos mais importantes agentes patogênicos, tanto em nível de cavidade pulpar quanto do tecido periapical (ESTRELA; FIGUEIREDO, 1999).

Sundqvist (1992b) analisou 65 dentes humanos portadores de polpa necrótica e lesão periapical. O autor constatou que todos os casos apresentavam microbiota predominante de anaeróbios (90%), onde a espécie mais encontrada foi o *Fusobacterium nucleatum* (48%) que apresentava associações com outras bactérias, como é o caso da *Porphyromonas endodontalis*, entre outras. A *Prevotella intermedia* que foi encontrada em 34% dos casos apareceu associada, entre outros microrganismos, com *Eubacterium sp*, *Peptostreptococcus anaerobius*. Tais resultados demonstram a natureza específica da microbiota endodôntica, e também que suas relações podem gerar mudanças populacionais.

Haapasalo (1993) demonstrou que as infecções endodônticas são polimicrobianas e que os microrganismos anaeróbios são predominantes. O autor demonstrou ainda que em um único canal o número de espécies gira em torno de 4

a 6 e as freqüentemente encontradas são *Porphyromonas*, *Streptococcus* e *Prevotellas*, entre outras.

Debelian, Olsen e Tronstad (1995) investigaram a incidência de bacteremia após tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical, relacionando a origem microbiana. Em todos os 26 dentes estudados foram encontradas bactérias anaeróbias. O número de microrganismos variou de 1 a 11, com maior freqüência para o *Fusobacterium nucleatum* seguido de *Prevotella intermedia*, *Prevotella acnes*, entre outros. Os testes bioquímicos e de antibiograma revelaram um perfil idêntico para os microrganismos do canal e da corrente circulatória, sugerindo que esses têm como origem o canal radicular.

Siqueira Jr, De Uzeda e Fonseca (1996) avaliaram a capacidade de penetração microbiana na dentina radicular através de microscopia eletrônica de varredura. Para tal experimento foram selecionadas cepas microbianas de *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *A. israeli*, *P. gingivalis*, *P. acnes* e *Enterococcus faecalis*, as quais foram inoculadas em dentina bovina por 21 dias. Os autores observaram capacidade de infiltração dentinária para todos os microrganismos, com especial atenção para *Enterococcus faecalis*, *P. acnes* e *A. israeli*.

Berkiten, Okar e Berkiten (2000a) demonstrou que a espécie *Streptococcus sanguis* apresentava uma capacidade de invasão na dentina radicular muito superior a da espécie *Prevotella intermedia*. Peters et al. (2001) avaliaram a presença de microrganismos em dentes humanos extraídos e portadores de lesão periapical. Os autores demonstraram que em 81% dos casos havia a presença de bactérias na intimidade da dentina radicular e que sua maior concentração estava na dentina próxima do canal principal.

Lana et al. (2001) avaliaram a flora microbiana envolvida em infecções endodônticas e a susceptibilidade desses microrganismos a antibióticos. Os autores isolaram anaeróbios estritos, facultativos e fungos, sendo os mais encontrados *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e para os fungos *Cândida* e *Saccharomyces*. Os autores constataram que mesmo após o tratamento realizado ainda era possível isolar anaeróbios facultativos e fungos.

Siqueira Jr et al. (2002) avaliaram a prevalência de *Actinomyces ssp*, *Streptococcus ssp* e *Enterococcus faecalis* em infecções primárias de canais radiculares utilizando-se de um método genético molecular. Os resultados foram: *Actinomyces spp* estiveram presentes em 9.4% das amostras (5 de 53 casos), *Streptococci* em 22.6% (12 de 53), e *E. faecalis* em 7.5% (4 de 53). Em geral, as espécies mais encontradas foram o *S. constellatus* (13.2), *S. intermedius* (11.3%), *S. anginosus* (7.5%), e *E. faecalis* (7.5%).

Siqueira Jr e Rôças (2003) investigaram a prevalência do *Bacteróides forsythus* em infecções primárias endodônticas utilizando o teste de reação em cadeia de polimerase. Amostras foram recolhidas de 50 dentes apresentando cárie, polpa necrótica e diferentes formas de lesões perirradiculares. Os resultados demonstraram que esta espécie bacteriana esteve presente em 26 das 50 amostras coletadas (52%) Os autores relatam que essa pesquisa confirma a associação desta bactéria às infecções endodônticas e pode estar envolvida na patogênese de diferentes formas de lesões perirradiculares.

Sedgley et al. (2005) avaliaram as características genéticas e fenotípicas de 33 enterococcus isolados em infecções endodônticas persistentes. Para tal estudo foram realizados testes de resistência antibiótica, produção de gelatinase e hemolysin e resposta a ferormônios, entre outros. Os autores identificaram

potenciais fatores de virulência do *Enterococcus* spp, especialmente a produção de gelatinase e resposta a ferormônios.

2.2 Laserterapia de baixa potência

Juntamente com a evolução dos materiais e técnicas, a laserterapia vem conquistando espaço na odontologia moderna. Na endodontia este avanço tecnológico vem contribuindo não somente na redução do tempo de trabalho clínico, mas também em aspectos biológicos do tratamento, como em alterações morfológicas das estruturas duras dentais (esmalte e dentina) e na redução significativa dos microrganismos presentes no ecossistema do canal radicular e, por conseqüência, no sucesso do tratamento endodôntico em dentes portadores de lesões periapicais.

De origem da língua inglesa, LASER é um acrônimo para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação).

A radiação em questão é eletromagnética não-ionizante (λ entre 300 e 600nm), com características bastante distintas. A radiação laser é monocromática, ou seja, apresenta um único comprimento de onda. Apresenta coerência temporal e espacial, isto é, propaga-se com mesma fase no espaço e tempo, além de concentrar uma alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos,. (BRUGNERA JR; PINHEIRO, 1998).

A radiação laser pode ser refletida, absorvida, transmitida ou espalhada pelo tecido. A absorção seletiva por parte dos tecidos é determinada pelo comprimento de onda do laser, fenômeno conhecido como ressonância a uma determinada frequência. Portanto, para cada comprimento de onda diferente encontraremos um tipo diferente de interação entre o tecido e a radiação laser (BRUGNERA JR; PINHEIRO, 1998; ALMEIDA-LOPES, 1999).

A laserterapia pode ser dividida em dois sistemas: a terapia laser de alta potência (HILT - high-intensity laser therapy) e a de baixa potência (LILT – low intensity laser therapy).

Os lasers em baixa intensidade apresentam potências inferiores àqueles em alta intensidade, tendo como potência média 30 a 100mW, com modo de emissão contínua ou pulsátil, e comprimentos de onda entre 630 a 904nm. Seus efeitos em tecidos não são térmicos, produzindo desta forma aquecimentos insignificantes de 0,1 a 0,5 C°. Suas principais aplicações estão baseadas na quantidade de luz absorvida, que produzira reações fotoquímicas e ou fotofísicas, e não na promoção de efeitos térmicos como nos lasers de alta potência.

A LILT pode ser definida como um tipo de terapia não-térmica, capaz de causar alterações celulares e teciduais, geradas pelo processo de biomodulação, ou seja, a inativação ou ativação de processos metabólicos.

No contexto da endodontia podemos citar as seguintes aplicações para os lasers de baixa potência: capeamento pulpar direto aplicado a microexposição pulpar, previamente à aplicação do hidróxido de cálcio, visando a promoção da bioestimulação dos odontoblastos, aumento da velocidade de formação de dentina reparacional, analgesia e redução do processo inflamatório; pós-preparo químico-

cirúrgico para reduzir a sensibilidade pós-instrumentação, biomodulação dos tecidos periapicais e promover maior reparação óssea periapical.

Os efeitos clínicos de um laser de baixa potência de hélio-neônio (He-Ne) no alívio da dor de doenças odontológicas foram investigados por Senda et al. (1985). Não houve casos de aumento de dor ou efeitos colaterais da irradiação laser, sendo que os resultados mais efetivos foram obtidos na dentina hipersensível e na úlcera aftosa. Como não houve diferenças significantes nos efeitos do paciente que havia sido informado da terapia com laser e daqueles que não tinham sido, pareceu que a efetividade no alívio da dor foi resultado direto da irradiação laser, e não de alguma influência psicológica sobre os pacientes.

O efeito da irradiação laser de baixa potência sobre a cicatrização de tecido conjuntivo gengival foi estudado por Chomette et al. (1987). Os autores avaliaram o efeito de um laser de baixa potência (632,6 nm) aplicado em 14 pacientes que sofriam de periodontopatia. Após biópsia inicial foram realizadas biópsias de controle nos mesmos pacientes em áreas gengivais não irradiadas. Na ausência de inflamação a cicatrização ocorreu de maneira semelhante nos tecidos irradiados e naqueles não irradiados. Depois de um crescimento vascular inicial, cilindros conjuntivos se formaram acompanhados por um aumento na atividade enzimática e uma cicatriz de aspecto longitudinal formou-se. O laser induziu uma cicatrização mais precoce (14^o dia) do que a observada nos controles (21^o dia). A presença de inflamação na gengiva retardou a cicatrização e, com freqüência, promoveu cicatrizes quelóides. Também nesses casos, seguiu-se uma cicatrização melhor e mais rápida quando houve irradiação com laser de baixa potência.

Mezawa et al. (1988) utilizaram um laser semiconductor de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As, $\lambda=790\text{nm}$) na língua de gatos, através do registro de descargas

de fibra única no nervo lingual. Um total de 11 receptores de calor foi testado, e em 60% dos casos diminuiu-se a frequência de queimação em seguida à irradiação laser por um minuto. A frequência de desconforto diminuiu em todos os receptores estudados após irradiação por 3 a 10 minutos. A redução na frequência de desconforto foi semelhante entre 5 e 10 minutos depois da irradiação, sugerindo que o efeito alcançou um platô dentro desse tempo e que a irradiação laser de baixa potência poderia ter realmente um efeito analgésico.

Os estudos sobre os efeitos da irradiação laser de baixa potência sobre a polpa dentária parecem ter sido iniciados na década de oitenta, com os trabalhos de Villa, Brugnera Jr e Aun (1988), que evidenciaram histologicamente a neoformação dentinária em polpa de ratos após a aplicação de laser de hélio/neônio e que o processo inflamatório reacional das polpas tratadas era de menor intensidade.

Estudos quantitativos conduzidos por Karu (1989), Tiphlova e Karu (1989), sobre a ação da luz visível de baixa potência sobre algumas células sugeriram que a bioestimulação pela irradiação laser é um fenômeno de natureza fotobiológica. Isso significaria que cada célula necessita de fotorreceptores primários, ou seja, compostos que absorvessem luz em comprimentos de onda efetivos para a promoção de respostas à irradiação.

A hipersensibilidade dentinária tratada com o laser semiconductor de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As, $\lambda=780\text{nm}$) foi avaliada por Yamaguchi et al. (1990). Uma avaliação global dos resultados mostrou que a aplicação do laser de baixa potência foi efetiva em 60% dos casos, indicando que este tipo de tratamento pode ser efetivo para diminuir a dor da dentina hipersensível.

Kurumada (1990), por sua vez, avaliou os efeitos da irradiação com laser semiconductor de arseneto de gálio (Ga-As, $\lambda=830\text{nm}$) sobre a ativação de células inflamatórias e sobre pulpotomia vital.

Brugnera Jr, Villa e Genovese (1991) citaram o efeito antiinflamatório, antiedematoso e normalizador circulatório como um dos efeitos terapêuticos gerais da irradiação laser de baixa potência, que influencia mudanças de caráter metabólico, energético e funcional, favorecendo o aumento da resistência e da vitalidade celular levando as células a sua normalidade funcional com rapidez. Ocorrem, ainda, transformações de prostaglandinas em prostaciclina e ativação da respiração celular, evitando-se acidose e alteração distrófica secundária da microcirculação tecidual.

Honmura et al. (1992) produziram modelos de inflamação experimental em ratos através de carragenina, e estudaram o efeito da irradiação do laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As; 780 nm de comprimento de onda; modo de emissão contínuo; $31,8 \text{ J/cm}^2$ de densidade de energia; tamanho da ponta de 0,2 mm) aplicada por 30 segundos sobre regiões inflamadas, em comparação com regiões tratadas com indometacina, um agente antiinflamatório potente. Encontrou-se que laser infravermelho de baixa potência teve um efeito antiinflamatório sobre a inflamação induzida por carragenina. O laser de baixa potência inibiu: (1) - o aumento da permeabilidade vascular durante a ocorrência de inflamação aguda; (2) - edema no estágio agudo; e (3) - a formação de granuloma, após uma irradiação laser diária. Em todos os casos, a irradiação foi suficiente para inibir a inflamação em 20 a 30%. O efeito inibitório da irradiação laser não foi comparável àquele da indometacina (4 mg/kg, V.B.) no modelo de "bolsa de ar" e no modelo de "edema de

pata”, enquanto que irradiação laser foi mais potente do que administração diária de indometacina (1 mg/kg, V.B.) no modelo de granuloma.

Silva, Cecchini e Eduardo (1992) avaliaram clinicamente os efeitos de um laser de baixa potência semicondutor de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As) em aproximadamente 300 aplicações, durante um período de 10 meses. O estudo foi desenvolvido com o Compact Laser da J. Morita Corporation, que apresenta comprimento de onda de 790 nm e uma potência de pico de 30 mW. Foram feitas aplicações do laser de baixa potência em diversas áreas e os resultados, de acordo com a avaliação clínica, foram classificados como eficiente e ineficiente. Aplicou-se o laser nos casos de hipersensibilidade dentinária e em preparos extensos, nos quais o paciente relatou sensibilidade com duração além do normal. Em relação aos preparos cavitários, obteve-se sucesso em 100% dos casos, o que sugere a capacidade do laser em inibir o processo da dor. Em Endodontia, foram feitas aplicações após instrumentação dos condutos radiculares na região apical dos condutos em 33 pacientes, sendo ineficiente em cinco casos. Nos casos onde foram detectados inflamação gengival e abscessos gengivais os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, houve redução significativa no nível de inflamação. Nas cirurgias periodontais foram feitas aplicações durante a cirurgia e imediatamente após o seu término. Em relação aos implantes, as aplicações foram feitas antes, durante e depois da cirurgia. Onde foi feito o implante e não houve aplicação do laser, o paciente relatou intensa dor em toda a região da intervenção, persistindo por cerca de 10 dias; onde foi feita a aplicação do laser, não houve sensibilidade dolorosa. Com base nos resultados, os autores concluíram que o laser semicondutor de arseneto de gálio-alumínio utilizado os auxiliou nos casos de Endodontia e Periodontia através de seus efeitos analgésico, antiinflamatório e bioestimulador,

obtendo-se também bons resultados em casos de dor pós-preparos cavitários e pós-cirurgias dentárias.

Donato e Boraks (1993) mencionaram os efeitos terapêuticos obtidos quando da utilização da irradiação laser de baixa potência nos tecidos moles e duros do organismo humano, que incluiriam: melhorar, de maneira geral, a circulação do tecido celular subcutâneo, favorecendo a drenagem linfática e tendo importante ação antiflogística e antiedematosa; provocar mudanças na polaridade celular; estimular a secreção de hormônios, como as beta-endorfinas e encefalinas, que têm a função de modificar o comportamento da dor, elevando o nível de percepção dolorosa; ação imunógena, intervindo em diferentes níveis enzimáticos das reações imunológicas, aumentando os níveis de prostaglandinas dos tecidos e estimular o tecido conjuntivo provocando o aumento do número de fibroblastos e, conseqüentemente, maior desenvolvimento das fibras colágenas.

Um estudo conduzido por Honmura et al. (1993) avaliou o efeito analgésico de irradiação com um laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As) na hiperalgesia da inflamação induzida pela carragenina. Empregou-se irradiação com um laser de 780 nm de comprimento de onda; 31,8 J/cm² de densidade de energia; 0,2 mm de tamanho da ponta, aplicada por três minutos sobre hiperalgesia induzida na pata traseira de ratos através de injeção de carragenina. Duas doses de irradiação laser dadas sobre a região inflamada imediatamente antes e depois da injeção de carragenina inibiram parcialmente (aproximadamente 50%) a ocorrência de hiperalgesia acompanhada com a progressão de inflamação. Em um outro grupo, a hiperalgesia foi removida quase completamente por pelo menos 24 horas, através de uma dose de irradiação laser dada três horas após a injeção de carragenina enquanto o edema não foi inibido. Os resultados sugeriram que a irradiação com

laser de baixa potência em regiões inflamadas de ratos tratados pela carragenina tem um efeito analgésico acentuado.

Com o objetivo de determinar o efeito de cura de ferida da irradiação laser de Hélio-Neônio (He-Ne) sobre tecido pulpar pulpotomizado, Thwe et al. (1994) conduziram um experimento em primeiros molares superiores em desenvolvimento de ratos Wistar jovens, pesando cerca de 50 g. Em 30 molares, a irradiação laser de He-Ne foi realizada sobre a polpa amputada. A potência utilizada foi de 6 mW (comprimento de onda de 632 nm) e o tempo de irradiação foi um minuto. Após a irradiação, o tecido pulpar remanescente foi coberto com hidróxido de cálcio puro misturado com solução salina esterilizada. Em outros 30 molares, a pasta de hidróxido de cálcio foi colocada sobre o tecido pulpotomizado, que não sofreu irradiação laser. Todas as cavidades foram restauradas com amálgama de prata. Exame histológico dos espécimes foi feito após a operação e duas semanas após a realização do procedimento. Uma grande quantidade de barreira calcificada formou-se como dentina na polpa remanescente irradiada. Nos molares não irradiados, menor quantidade de barreira calcificada ou nenhuma ocorrência de formação de ponte de dentina foi notada, sugerindo que irradiação laser de He-Ne sobre a polpa amputada pode ser útil para pulpotomia de dentes em desenvolvimento.

Com relação à biomodulação, Almeida-Lopes (1999) realizou um estudo trabalhando com fibroblastos de gengiva humana em condições de déficit nutricional parcial e total, simulando desta forma situações de estresse. Analisou-se então a proliferação celular por meio da contagem do número de células existentes antes e depois da irradiação com lasers de diodo com diferentes comprimentos de onda. Em ambos os casos, os grupos irradiados apresentaram proliferação celular

significativamente maior nos grupos irradiados, quando comparado ao grupo controle.

Silveira (2000) verificou o comportamento dos mastócitos no tecido gengival da parede de bolsa periodontal supra-óssea submetida à radiação laser de baixa potência. Foram selecionados 20 pacientes com doença periodontal necessitando de tratamento cirúrgico. Parte dos tecidos removidos cirurgicamente receberam radiação laser de GaAsAl ($\lambda=780\text{nm}$), com potência de 50mW e fluência de $8\text{J}/\text{cm}^2$, enquanto a outra parte dos tecidos não recebeu irradiação. O autor observou que dos mastócitos presentes, o índice de desgranulação foi maior nas amostras irradiadas quando comparadas ao grupo não irradiado.

De Souza (2001) avaliou a influência da radiação laser de baixa potência na velocidade de reparação óssea de lesões perirradiculares. Foram selecionados 15 pacientes divididos em 2 grupos: um grupo submetido a tratamento e outro recebeu o mesmo tratamento com posterior irradiação laser de baixa potência com comprimento de onda igual a 904nm. A velocidade de reparação óssea foi avaliada através das medidas das lesões obtidas através das radiografias com tela milimetrada. O autor concluiu que no grupo irradiado houve diferença estatística significativa no reparo das lesões quando comparadas ao grupo não irradiado.

2.3 Laserterapia de alta potência

Os lasers de alta potência ou lasers cirúrgicos são aqueles que emitem alta intensidade de energia e são indicados para procedimentos cirúrgicos, podendo causar danos térmicos aos tecidos alvos.

Os lasers de alta potência mais utilizados em odontologia são: CO₂ (Dióxido de Carbono), Nd:YAG (Granada de Ítrio-Alumínio dopada com Neodímio), Er:YAG (Granada de Ítrio-Alumínio dopada com Érbio), Argônio e Ho:YAG (Granada de Ítrio-Alumínio dopada com Hólmio), que por apresentarem diferentes comprimentos de onda terão diferentes aplicações na prática clínica odontológica.

Dentro dos lasers de alta potência o mais utilizado na endodontia é o laser de Nd:YAG, que tem aplicações tanto na área de alterações morfológicas das paredes do canal radicular como na redução microbiana intracanal.

O laser de Nd:YAG é um laser de estado sólido. Com emissão no infravermelho e comprimento de onda de 1,064µm, sendo necessário uma luz guia para sua localização e aplicação clínica, além de uma fibra óptica com diâmetro variando entre 200 a 400µm (MALDONADO; RIBEIRO; ZEZZEL, 2000).

2.3.1 alterações morfológicas produzidas pela irradiação de alta potência

Os efeitos do laser de Nd:YAG nos tecidos duros dentais promove alterações estruturais na dentina, as quais têm sido estudadas, observando os seus benefícios para a terapia endodôntica.

Gutknecht e Behrens (1991) salientaram a capacidade do laser de Nd:YAG de promover a fusão das substâncias inorgânicas presentes na superfície dentinária, no interior de canais radiculares, mostrando que em altas densidades de energia praticamente todos os túbulos na área de incidência do laser eram obliterados.

Stabholtz et al. (1992) verificaram que quando a apicectomia é a conduta de escolha, a luz laser pode agir como um importante coadjuvante neste tratamento, a partir da redução da permeabilidade da raiz seccionada.

Goodis et al. (1992) relataram a completa retirada de magma dentinário remanescente no canal radicular com o laser de Nd:YAG, assim como a redução de microrganismos em comparação com canais tratados convencionalmente, na ausência de irradiação laser.

Lage Marques, Eduardo e Matsumoto (1995) demonstraram que a irradiação do laser de Nd:YAG nas paredes do canal radicular causavam não só uma redução da microbiota interna como também a remoção do magma e o posterior selamento deste sistema, pois os canais eram fundidos e então fechados.

Harashima et al. (1997) concluíram que o laser de Nd:YAG era útil para a remoção do magma, como também causava “melting” interno, que selava as paredes do canal radicular.

A luz laser quando irradiada no tecido produz um efeito térmico, esse aquecimento está diretamente relacionado com a energia utilizada e o tempo de irradiação (KHAN et al., 1997).

Tanji, Gouw-Soares e Eduardo (1998) em um estudo comparativo sobre alterações morfológicas, avaliaram as alterações provocadas pela irradiação dos lasers de Er:YAG e Nd:YAG. Como resultados encontraram a fusão e recristalização

da dentina com ausência de magma dentinário e selamento de parte dos túbulos quando da irradiação com o laser de neodímio, e uma superfície rugosa com túbulos dentinários abertos e isenta de magma, alterações que seriam interessantes no tratamento endodôntico.

Nesse sentido Lan (1999) avaliou *in vitro* a elevação de temperatura na superfície radicular externa durante a irradiação laser de Nd:YAG. Foram utilizados noventa dentes unirradulares irradiados com energias de: 50, 80, 100,150 e 200mJ/ 10, 20 e 30 pulsos por segundo. A temperatura externa não ultrapassou 10°C.

Kimura et al. (1999) pesquisando alterações morfológicas nas paredes dos canais radiculares pós-irradiação com laser de Argônio, Neodímio e Érbio, observaram através da infiltração com corante de rodamina B e microscopia de varredura, 100% de redução na infiltração apical após obturação para o grupo do Nd:YAG associado ao corante. Para os lasers de Er:YAG e Argônio somente dois espécimes apresentaram infiltração apical.

Analisando a permeabilidade do sistema de canais radiculares após fase de instrumentação associado à irradiação final com laser de Nd:YAG, Silva (2000) concluiu que a utilização do laser provocou a diminuição significativa da permeabilidade dentinária ao corante azul de metileno quando comparado ao grupo controle.

Bachman et al. (2000) avaliaram as mudanças de temperatura externa radicular quando da irradiação com laser Nd:YAG, no sentido de proporcionar uma efetiva ação nas paredes do canal radicular. Foram utilizados trinta e dois caninos superiores irradiados mantendo-se a fibra por três segundos no limite apical de instrumentação e com movimentos helicoidais de apical para cervical, na velocidade

de 2 mm/s, com 4 repetições e intervalos de vinte segundos. A maior mudança de temperatura constatada foi de aproximadamente 0,8°C, podendo-se afirmar desta forma que para as condições utilizadas nesse estudo não haveria dano térmico para o osso alveolar e ligamento periodontal.

Através de uma análise ultra-estrutural, valendo-se do microscópio eletrônico de transmissão, Lee, Lin e Lin (2002) avaliaram a superfície dentinária após a aplicação do laser de Nd:YAG e concluíram que o laser em questão pode ser empregado com o intuito de diminuir a permeabilidade dentinária.

Gekelman, Prokopowitsch e Eduardo (2002) utilizaram 30 dentes humanos extraídos para avaliar o selamento apical quando da utilização do laser de Nd:YAG. Os autores concluíram que a irradiação laser do terço apical, com a presença ou não de plug de dentina, aumentava consideravelmente a qualidade do selamento apical nas condições testadas.

Brugnera Jr et al. (2003) avaliaram os efeitos dos lasers de Nd:YAG e Er:YAG na dentina radicular quando da utilização de NaOCl 1% e água destilada como soluções irrigantes. Os autores demonstraram que a permeabilidade quando da utilização do laser de Nd:YAG com qualquer dos irrigantes foi a menor entre todos os grupos.

Arisu et al. (2004) avaliaram as alterações morfológicas e a penetração apical de corante quando da irradiação com laser de Nd:YAG com diferentes potências e a utilização de um ativador. Os resultados demonstraram que a utilização de um ativador como tinta da índia aumentava a capacidade de “melting” e recristalização da dentina.

2.3.2 alteração microbiana produzida pela irradiação de alta potência

Entre as muitas indicações da terapia laser na endodontia, a ação antimicrobiana está entre os de maior importância, onde a sanificação do sistema de canais radiculares é a condição fundamental para que ocorra a reparação dos tecidos periapicais. Dentre os vários comprimentos de ondas indicados para esta finalidade, podemos citar o Nd:YAG como um dos mais estudados.

Em uma análise da capacidade de esterilização de canais radiculares infectados irradiados com Nd:YAG, Hardee et al. (1994) concluíram que houve uma significativa redução microbiana quando comparados ao grupo controle, porém nenhum dos grupos apresentou completa esterilização dos canais.

Moshnov et al. (1995) estudaram a eficácia da irradiação intracanal do laser de neodímio na desinfecção dos canais radiculares. Os espécimes foram inoculados com cepas de *E. faecalis* e divididos em seis grupos experimentais. Os resultados obtidos mostraram a capacidade de redução bacteriana do laser em questão.

Gutknecht et al. (1996) realizaram um estudo clínico com acompanhamento radiográfico de 3, 6 e 12 meses em dentes portadores de lesões periapicais tratados com laser de Nd:YAG. Como resultado obtiveram sucesso em 82% dos casos, com regressão da lesão periapical após dois meses.

Moritz et al. (1997) realizaram um estudo em pacientes portadores de canal infectado e reação periapical. Foram realizadas coletas antes da irradiação, após 4 e 8 dias. Constataram a presença de *Streptococcus* e *Staphylococcus* antes da irradiação e uma redução significativa após a primeira irradiação.

Koba et al. (1998) realizaram tratamentos endodônticos em dentes infectados de cães em uma única sessão, e co-irradiação do laser de Nd:YAG. Os autores relataram uma significativa redução da inflamação na região apical e a remoção eficiente de debris e magma dentinário na mesma região de todos os grupos tratados com laser.

Moritz et al. (1999) avaliaram *in vitro* o efeito antimicrobiano dos lasers de Nd:YAG, Er:YAG e Ho:YAG. Um total de quarenta dentes unirradiculares foram instrumentados, esterilizados e a seguir inoculados com cepas de *E. coli* e *E. faecalis*. Os resultados mostraram potencial efeito antimicrobiano para todos os lasers testados.

O potencial antimicrobiano do laser de Nd:YAG sobre cepas de *P. intermedia* e *S. sanguis* foi analisado através de microscopia eletrônica de varredura e microscópio óptico. Obteve-se redução da população microbiana de 86,3% do *S. sanguis* e 98,5% quando utilizada uma energia maior. Já no grupo inoculado com *P. intermedia* ambas as energias testadas promoveram total eliminação dos espécimes (BERKITEN; BERKITEN; OKAR, 2000b).

Cecchini (2001) valendo-se de dentes bovinos infectados com *E. faecalis*, avaliou o efeito da irradiação laser na descontaminação intracanal. Foram utilizados 3 aparelhos de laser diferentes: Nd:YAG, Er:YAG e Ho:YAG com e sem refrigeração e um grupo com medicação intracanal de hidróxido de cálcio. A autora apresenta os melhores resultados para o laser de Ho:YAG seguido do hidróxido de cálcio, laser de Nd:YAG e Er:YAG.

Folwaczny (2002) estudaram os efeitos antimicrobianos da irradiação laser intracanal do laser de Nd:YAG. Observou-se que o mesmo, sem a presença de qualquer corante fotossensível, apresentou uma redução antimicrobiana intensa, no

entanto houve um grande aumento de temperatura com os parâmetros utilizados, o que pode ser prejudicial aos tecidos vizinhos.

Schoop et al. (2004) avaliou os efeitos bactericidas de diferentes tipos de laser, entre eles o Nd:YAG. Um total de 360 fatias de dentina com espessura de 1 mm foram inoculadas com uma suspensão de cepas de *Escherichia coli*. e *Enterococcus faecalis*. Os autores demonstraram que todos os lasers utilizados apresentavam capacidade de desinfecção nas condições estudadas e que tal terapia pode ser de grande valia na terapia endodôntica.

D'Ercole et al. (2004) analisaram a capacidade do laser de Nd:YAG em desinfetar o canal radicular utilizando-se dois parâmetros diferentes em comparação com o NaOCl a 5,25%. Trinta dentes foram infectados com cepas das bactérias *P. aeruginosa* e *A. naeslundii*. Os resultados demonstraram que o laser, para os parâmetros utilizados, não foi capaz de esterilizar o canal radicular como o hipoclorito de sódio.

2.4 Conceito da terapia fotodinâmica (PDT)

É neste contexto que, na busca incansável de alternativas para ação antimicrobiana, se insere a terapia fotodinâmica com fotossensibilização letal (FLL).

Os primeiros relatos sobre terapia fotodinâmica (PDT) datam do início do século XX, quando Raab (1900) e Von Tappeiner (1900) constataram

acidentalmente durante um estudo da ação da acridina sobre culturas de paramécios, que quando foi exposta a uma luz intensa (no caso, os raios de uma tempestade), apresentava como resultado uma reação não usual destes àquela solução. Estes pesquisadores, em estudos posteriores observaram que quando a cultura de microrganismos e corante era exposta à luz intensa ocorria como consequência a morte dos mesmos. Eles postularam então que tal efeito era produto da transferência de energia da luz para a substância química.

Foi a partir disto que a hematoporfirina, substância de origem no sangue, começou a ser explorada. Pesquisas anteriores relatavam que sua inoculação em roedores seguidos de exposição à luz intensa resultava em fotossensibilidade por parte destes animais. Os relatos mais antigos da utilização de fotossensibilizantes em seres humanos datam de 1913 quando Meyer-Betz injetou hematoporfirina e observou reação de edema nas áreas que entraram em contato com a luz.

O primeiro relato de fluorescência induzida de tumores ocorre em 1924 com o auxílio de uma lâmpada de Wood, onde Policard (1924) relaciona tal fenômeno à porfirina.

A partir daí as pesquisas tomaram novo rumo, o que levou ao direcionamento das mesmas à área de diagnóstico e combate de tumores. Em meados do século XX, já se conhecia o potencial tóxico das hematoporfirinas aos seres humanos. Pesquisas demonstraram que sua composição era resultante da mistura de porfirina acética e porfirina sulfúrica, as quais possuem grande afinidade por células tumorais, levando ao desenvolvimento de novos fotossensibilizantes, como clorinas, benzoporfirinas, naftocianinas e ftalocianinas. Novas fontes de luz também foram desenvolvidas, portanto apresenta-se como uma nova alternativa para o diagnóstico e tratamento de tumores. Atendo-se à idéia de seletividade dual, um conjunto de

fonte de luz de comprimento de onda específico somado a uma droga específica para o tumor leva a um tratamento sem efeitos colaterais como os da radio e quimioterapia (WAINWRIGHT, 1996).

Com relação às fontes de luz temos que as primeiras a serem utilizadas foram lâmpadas convencionais, com luz não coerente e policromática associado, na maioria das vezes, a um componente térmico. Com o desenvolvimento da tecnologia laser, se obtém uma luz monocromática com comprimento de luz específico, sua grande densidade de energia, dose de radiação bem controlada e sistema de entrega através de fibras ópticas, facilitando o acesso à lesão alvo. Portanto, o correto entendimento da tecnologia laser se faz de extrema importância para a correta utilização da terapia fotodinâmica com FLL.

2.4.1 mecanismo de ação da fotossensibilização letal e interação fotossensibilizante/célula

Com relação ao mecanismo de ação da FLL, Baugh e Clarck (1958) estudaram sensibilidade à ação fotodinâmica e outros tipos de radiação em microrganismos como *Staphylococcus pyogenes*, *Chromobacterium violaceum*, entre outros. Os autores observaram que existe uma diferença entre a fotoinativação de bactérias Gram-negativas, onde a morte ocorre numa velocidade exponencial, e nas Gram-positivas, onde a curva resposta apresentou duas áreas distintas. Desta forma, mecanismos diferentes devem ocorrer, dependendo de sua estrutura celular.

Wilson (1993) afirma que para a luz poder interagir com uma célula, esta deve ser primeiramente absorvida por um ou mais componentes celulares, onde luzes com comprimentos de ondas até 300nm (luz ultravioleta) são absorvidas por proteínas e ácido nucléico resultando em morte. Para procedimentos realizados em seres humanos, e devido a sua capacidade mutagênica, torna-se inviável.

Já voltando a atenção para a luz com comprimento de onda maior, Wilson (1993) afirma que certos compostos bacterianos podem absorver a luz no espectro visual e ocasionar a morte da bactéria em questão. A interação luz visível e fotossensibilizante forma um composto em seu estado excitado (triplete) devido a uma transferência de elétrons para níveis de energia mais altos, o que reagiria com o oxigênio molecular, formando oxigênio singleto altamente reativo, processo conhecido como fotoproceto do Tipo II. No entanto, se ocorrer esta interação com substratos diferentes do oxigênio molecular são gerados espécies reativas do oxigênio (fotoproceto do Tipo I). Estes produtos acabam por lesar componentes essenciais da bactéria como, por exemplo, membrana citoplasmática e ou interromper suas atividades metabólicas resultando na morte celular.

A ocorrência da interação da luz laser e uma célula bacteriana dependerão de alguns fatores inerentes aos dois, tais como: laser - comprimento de onda, produção de energia do laser e tempo de exposição, diâmetro do feixe e conseqüentemente densidade de energia e também o modo de operação do laser; bacterianos - natureza da bactéria, estado fisiológico, entre outros, e por ultimo as condições do meio em que está ocorrendo a reação (WILSON, 1993).

Em uma revisão de literatura das aplicações da laserterapia produzida por Walsh (1997) com destaque para os tecidos duros dentais descreve a FLL do laser no tratamento de lesões de cáries, onde se compara a redução microbiana

promovida pelos lasers de alta potência e a produzida pela FLL. O estudo confere à fotossensibilização a vantagem pela não geração de calor, sendo assim mais segura em relação aos danos que podem ser causados à polpa e ao tecido periodontal. Para o autor a fotossensibilização letal (FLL) é uma reação específica, onde o tratamento somente com o laser ou apenas o corante não produzem efeito. Entretanto, quando a exposição ao corante vem seguida por irradiação laser, mudanças no corante geram reações químicas dentro da célula alvo que acabam por perder a viabilidade. A FLL se baseia no uso de um cromóforo (corante fotossensibilizador), sendo de vital importância que este e o comprimento de onda do laser sejam ressonantes, como também que o próprio corante não apresente efeitos tóxicos aos tecidos, semelhante ao que ocorre na terapia fotodinâmica.

Após inúmeros estudos, descreve que a luz vermelha produzida pelo laser de He-Ne (λ -632nm) apresenta capacidade inibitória em microrganismos de placa bacteriana quando associado a um corante apropriado. Ressalta também que os *S. sobrinus* são susceptíveis a FLL. Para o autor, os corantes são potentes sensibilizadores para uma faixa de bactérias, para emissões de laser na porção vermelha do espectro. Porém Walsh ressalta que a possibilidade de utilização do laser de He-Ne como fonte de energia laser é reduzida, pois este sistema requer fontes de energia e de transmissão muito complexos. No entanto, o laser de semicondutor de arseneto de índio gálio fósforo, que emite comprimentos de onda semelhante ao de He-Ne, porém com maior eficiência e menor custo, poderia ser uma opção mais viável.

Walsh (1997) ainda considera que existem trabalhos avaliando a viabilidade do uso do laser de diodo em conjunto com o corante azul de metileno para esterilizar uma lesão cariosa contaminada por *S.mutans*. Isto se demonstra de extrema

aplicabilidade no tratamento de lesões profundas de cárie de dentina, pois sem calor significativo esta seria uma forma mais conservadora de tratamento para o caso em questão. Uma outra aplicabilidade da FLL seria ainda a descontaminação de canais radiculares e bolsas periodontais.

Salienta ainda que os principais efeitos danosos da aplicação laser nos tecidos duros dentais seriam as variações térmicas que poderiam agredir os tecidos pulpares e periodontais adjacentes, e revendo a literatura descreve que o limiar crítico para a elevação da temperatura pulpar é de 10°F (5,5°C), além do qual haveria altos níveis de necrose pulpar.

A partir daí, o autor cita um estudo utilizando-se o laser de arseneto de gálio alumínio com comprimento de onda de 830nm, que mensurou as alterações térmicas produzidas na polpa quando este laser era utilizado para o tratamento de hipersensibilidade tanto no modo contínuo como no pulsado. Verificou-se que não houve alteração superior a 2,2°C mesmo quando se utilizou energias superiores a 9,0J.

O autor conclui que a terapia FLL pode ser uma técnica eficiente para a inativação de microrganismos orais sem acarretar grandes danos aos tecidos adjacentes, porém estudos ainda devem ser realizados para se estabelecer um protocolo de tratamento.

2.4.2 ação da fotossensibilização letal em microrganismos

Em 1980, em uma pesquisa utilizando-se a bactéria *Saccharomyces cerevisiae* AD₄, o corante azul de toluidina O fotoativado e uma luz branca de xenônio com densidade de 150W/m² Ito avaliou o dano celular ocorrido na membrana celular, através das medidas de fluxo de uma sonda molecular. Como resultado obteve que a permeabilidade da célula subiu drasticamente pela ação fotodinâmica, com um fluxo indiscriminatório do corante para o interior celular, significando um potencial destrutivo da ação fotodinâmica na membrana celular.

Malik, Hanania e Nitzan (1990), ao realizarem uma revisão de literatura sobre as novas tendências da PDT, afirmam que as diferenças estruturais existentes entre os diferentes tipos de bactérias devem ser levadas em consideração. No geral, bactérias Gram-positivas desenvolvem a fotossensibilização através da produção de oxigênio singleto (¹O₂), já as anaeróbias são sensibilizadas sem este último, mas pela formação de radicais livres. No entanto, as Gram-negativas devem ser tratadas com substâncias que promovam o rompimento das estruturas de sua membrana. Nesta mesma revisão, os autores salientam ainda que para ocorrer a inativação o fotossensibilizante deve ser absorvido pela parede celular, unir-se à membrana interna da célula e ainda ocorrer a possível translocação deste para o citoplasma celular, ocasionando a inibição da síntese de DNA e posteriormente de RNA e proteínas.

Girotti (1990) estudou os mecanismos de ação da ação fotodinâmica em relação à membrana celular, o que foi denominado peroxidação lipídica fotodinâmica, afirmando que como outros tipos de peroxidação lipídica, a fotoperoxidação é danosa à estrutura e função da membrana celular. Tal peroxidação ocorre da seguinte forma: a absorção de fóton por um agente fotossensibilizante converte-o do seu estado fundamental singleto (S) para um

estado singleto excitado (1S). Um cruzamento intersistema com inversão de “spin” oferece um estado excitado tripleto menos energético (3S). A partir deste ponto, dois tipos diferentes de reação podem ocorrer: Tipo I, que envolve radicais livres intermediários e oxigênio em seu estado fundamental; e tipo dois, com oxigênio ativado em seu estado singleto.

Em um estudo *in vitro* realizado por Okamoto, Iwase e Morioka (1992), foram testados os efeitos fotodinâmicos de dez tipos de corantes associados ao laser de He-Ne em microrganismos cariogênicos, avaliando-se por meio de zona de inibição de crescimento. Verificaram-se neste estudo zonas de inibição em todas as cepas de *S. mutans*, onde quanto mais longo o tempo de irradiação maior era a zona de inibição. Concluiu-se então que as bactérias cariogênicas podem ser mortas por irradiação laser de He-Ne, porém quando em presença de corantes específicos.

Paardekooper et al. (1995) estudaram o efeito da FLL em complexos enzimáticos intracelulares utilizando-se o azul de toluidina. Os resultados demonstraram que ocorria uma inibição destes complexos enzimáticos e também uma queda nos níveis de adenosina trifosfato (ATP), portanto, as enzimas intracelulares são inativadas, inviabilizando assim a célula.

Em uma revisão de literatura Wainwright (1998), afirma que se um microrganismo demonstra seletividade por um corante como o azul de metileno, este deve ser passível de ser fotossensibilizado. No que se refere ao mecanismo de ação, o autor explica que se um corante absorve a energia gerada por uma fonte de luz, pode ocorrer uma transição de elétrons para um estado singleto excitado. Assim, dependendo de sua estrutura molecular e do meio onde está ocorrendo essa transferência eletrônica, a molécula pode perder sua energia através de processo físico, voltando desta forma ao seu estado fundamental, ou ainda passar para um

estado excitado tripleto. A partir daí, a molécula pode cair novamente para o seu estado fundamental, sofrer reações de redox com o meio, ou então sua energia pode ser transferida para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singleto (ver tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Vias fotocitóticas nas células microbianas

Área de ação	Ação	Resultado	Consequência	Evento citotóxico
Água	Abstração do hidrogênio Perioxidação	Formação do radical hidroxila OH ⁻	Formação de peróxido de hidrogênio, superóxido (O ₂ ⁻)	Processos oxidativos adicionais
Parede/membrana celular lipídeos e esteróis insaturados	Abstração do hidrogênio	Peroxidação Ligação cruzada peptídeos	Formação de hidroperóxido Inativação enzimática	Permeabilidade aumentada aos íons (perda Na ⁺ / K ⁺)
Peptídeos	Oxidação dos resíduos Tyr/Met/His	Degradação protéica		Perda de facilidade de reparo; lise
Cobertura Protéica viral	Reações de oxido redução (REDOX)			Perda da infectividade viral
Cadeia respiratória	Oxidação ou ligações cruzadas			Inibição da respiração
Enzimas citoplasmáticas/ enzimas virais (transcriptase reversa)				Inibição do conjunto ribossômico; Inibição da replicação, infectividade
Resíduos de ácidos nucleicos (guanosina)	Oxidação da base ou do açúcar	8-hidroxi-guanosina	Degradação de nucleotídeo; degradação do açúcar/clivagem	Substituição da base; clivagem; partição; mutação; inibição da replicação

Fonte: Wainwright, 1998.

O autor explica ainda que os fotossensibilizantes são geralmente moléculas aromáticas, que são eficientes formadores de estados tripleto de longa duração, e que em termos de energia absorvida pelo sistema π aromático existe dependência da estrutura molecular envolvida, conforme a tabela 2.2 (agentes fotossensibilizantes e a média de λ_{\max} em solução tampão).

Tabela 2.2 – Principais corantes utilizados em terapia fotodinâmica com suas respectivas bandas de absorção

Tipo de Fotossensibilizante	Média de λ_{max} em Tampão (nm)
Fenotiazínicos	620-660
Fenazina	500-550
Acridina	400-500
Cianino	500-600
Porfirina	600-650
Ftalocianino	660-670
Psolaren	300-380-
Perylenequinoide	600-650

Fonte: Wainwright, 1998

Os corantes azul de metileno e azul de toluidina pertencem à classe dos fenotiazínicos cujos primeiros estudos datam de 1930, quando eram usados em procedimentos de identificação cirúrgica em concentrações razoavelmente altas (normalmente 1% p/v) sem causar toxicidade. O formato e o tamanho de tais corantes os tornam ótimos intercaladores de ácidos nucleicos. Um outro fator importante salientado pelo autor é o tempo de exposição ao corante antes de se expor à radiação luminosa.

Em estudos fisiológicos espectroscópicos Oldham e Phillips (1999) demonstraram que não existe um único mecanismo responsável pela morte celular de microrganismos. Para eles a fotoinativação, por exemplo, de bactérias Gram-positivas com o *S. mutans* necessitam apenas da produção de oxigênio singleto, no entanto, as Gram-negativas como é o caso da *P. gingivalis* requerem a formação de radicais livres.

Outro estudo demonstrando o mecanismo de ação da PDT em colônias bacterianas avaliou se este procedimento poderia afetar fatores de virulência bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS) e proteases. Utilizando-se de LPS de culturas de *E. coli*, proteases de *P. aeruginosas*, azul de toluidina O e luz vermelha a atividade de cada fator de virulência foi determinada previamente e logo após a irradiação. Concluiu-se que a ação fotodinâmica pode ser um tratamento adicional para se reduzir a atividades dos fatores de virulência de agentes microbianos (Kömerick; Wilson; Poole, 2000).

Bhatti et al. (2001) identificaram nas proteínas fotossensíveis da membrana externa de *Porphyromonas gingivalis* um importante patógeno periodontal. Para tal estudo foram utilizados um laser de He-Ne e o corante azul de toluidina em concentrações de 0,5 e 5µg/mL e foi criado um painel de anticorpos monoclonais para o patógeno em questão. Os anticorpos reconheceram várias proteínas fotossensíveis, os autores concluíram então que tais proteínas são os principais alvos das espécies citotóxicas geradas durante a FLL e que tal terapia pode se tornar mais seletiva e assim, potencialmente mais efetiva.

Komerick e Wilson (2002) avaliaram o efeito de fatores fisiológicos e microambientais na FLL de patógenos gram-negativos mediada por azul de toluidina O. Suspensões de *Pseudomonas aeruginosas*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em saliva humana, soro de cavalo e solução salina foram utilizadas em conjunto com um laser de He-Ne, azul de toluidina O (50µg/mL) e tempo de pré-irradiação (TPI) de 60s. Os autores concluíram que a composição e o pH do fluido no qual a bactéria está suspensa influenciam na efetividade da FLL mediada pelo agente em questão. No entanto, a redução bacteriana não foi afetada pelo estado de crescimento do microrganismo em questão.

2.5 Aspectos de interesse clínicos da fotossensibilização letal

Wilson, Dobson e Harvey (1992) avaliaram vinte e sete fotossensibilizantes em concentrações variadas associados a um laser de He-Ne de 7,5 mW de potência e sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias com *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Foram efetivos os corantes: azul de metileno, azul de toluidina O, cristal de violeta, hematoporfirina e éster de hematoporfirina e os tempos de morte variaram entre 5 a 60 segundos, com dose de energia de 2,75 a 33J/cm².

Dobson e Wilson (1992), em uma pesquisa *in vitro*, avaliaram a morte bacteriana por FLL de bactérias de biofilme oral como: *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Streptococcus sanguis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gengivalis*. Utilizando sobre amostras de biofilme bacteriano sobre placas de petri, uma combinação de vários corantes e laser de He-Ne de 7,3 mW de potência, concluiu-se que os corantes azul de toluidina e azul de metileno foram capazes de inviabilizar as quatro espécies de bactérias, enquanto os outros fotossensibilizantes como ftalocianino, éster de hematoporfirina, entre outros, somente foram capazes de sensibilizar algumas das espécies em questão. Sugerem desta forma que a FLL pode ser efetiva em eliminar microrganismos periodontopatogênicos de placa dental.

Culturas de *Actinobacillus actinomycetencomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis* foram tratadas com uma diversidade de agentes fotossensibilizadores e expostas a um laser de He-Ne de potencia de 7,5mW por um

tempo de até 80 segundos. Como resultado se obteve que o azul de toluidina O (25µg/mL) e o azul de metileno na mesma concentração foram letais para as três culturas de bactérias. Na ausência do corante, a luz laser não se mostrou eficaz (WILSON; DOBSON; SAKAR, 1993).

Um estudo *in vitro* para avaliar levedura *Cândida albicans*, entre outras causadoras de candidose associada ao HIV, foi realizado por Wilson e Mia (1993). Culturas de *C. albicans* foram expostas a uma série de fotossensibilizantes associados ao laser de He-Ne ou de Arseneto de Gálio Alumínio (AsGaAl, $\lambda=660\text{nm}$) por um tempo de dois minutos. Os corantes azul de toluidina O, tionina e cristal de violeta foram eficazes em gerar a morte da levedura. O azul de toluidina O também foi capaz de levar à morte várias outras espécies de *Cândida*. O azul de metileno associado ao laser de Arseneto de Gálio Alumínio com uma densidade de energia de $2,04\text{J}/\text{cm}^2$ causou a morte da *C. albicans*. A viabilidade das leveduras não foi afetada somente pela exposição ao laser.

Burns, Wilson e Pearson (1994) avaliaram se bactérias cariogênicas como: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* e *A. viscosus* poderiam ser mortas pela FLL utilizando-se um laser de arseneto de gálio alumínio ($\lambda=660\text{nm}$) e ftalocianino de alumínio dissulfonado em concentrações de 100, 50 e 10 µg/mL e tempos de pré-irradiação (TPI) de 15 a 300 segundos. Os autores concluíram que a binômica concentração de fotossensibilizante/TPI influenciou nas mortes dos respectivos microrganismos, e que a combinação utilizada pode ter relevância na prática clínica.

Em uma revisão de literatura Wilson (1994) afirma que embora a luz dos lasers de baixa potência não tenham efeito bactericida, as bactérias podem ser sensibilizadas para a morte através de um tratamento prévio com um agente fotossensibilizante. As vantagens da técnica são a morte em curtos períodos de

tempo, improbabilidade de desenvolvimento de resistência e de se evitar danos aos tecidos do hospedeiro quando comparada ao laser de alta potência.

Wilson e Mia (1994) em um estudo semelhante ao de 1993 trataram suspensões de *C. albicans* com azul de toluidina O e azul de metileno, expondo-os aos lasers de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$) e AsGaAl ($\lambda=660\text{nm}$), respectivamente, por 120 segundos com um tempo de incubação de 3 minutos. Ambos os corantes foram capazes de induzir a morte à levedura nos parâmetros utilizados.

Wilson et al. (1995), em estudo *in vitro*, avaliaram se bactérias de placa dental supragengival poderiam ser sensibilizadas com a utilização do laser de baixa potência na presença de um fotossensibilizante. Amostras de biofilme dental foram tratadas com azul de toluidina O ou ftalocianino de alumínio dissulfonado e expostas à luz laser de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$) ou arseneto de gálio alumínio ($\lambda=660\text{nm}$) respectivamente. Após a irradiação, reduções substanciais no total das bactérias anaeróbicas foram obtidas, bem como no número de *Streptococcus* e *Actinomyces* presentes nas amostras. Na ausência da luz laser, os fotossensibilizantes por si só apresentaram pequeno efeito na viabilidade bacteriana nas amostras de biofilme dental. A combinação da luz laser de He-Ne e corante azul de toluidina O pareceu ser mais efetiva que a de arseneto de gálio alumínio/ftalocianino de alumínio dissulfonado, obtendo reduções em \log_{10} na ordem de 2,95; 5,40 e 3,34 na contagem total de anaeróbicos, *Streptococcus* e *Actinomyces*, respectivamente, com dose de energia de 1,31J.

Wilson et al. (1996) avaliaram *in vitro* a fotossensibilização letal com laser de Arseneto de Gálio Alumínio ($\lambda=660\text{nm}$ 11 mW de potencia e densidade de energia 4,1 J/cm², 61,2 J/cm²) e ftalocianino dissulfonado de alumínio (8,0 μl) dos *S. sanguis*, quando presente num biofilme dental. Para os autores, a utilização apenas do laser

(61,2 J/cm²) nos biofilmes dentais de *S. sanguis* não resultou em qualquer redução estatisticamente significativa na contagem dos microrganismos viáveis, da mesma forma com o uso apenas do fotossensibilizante. No entanto, com o uso de 61,2 J/cm² de densidade de energia do laser e o fotossensibilizante, não foram detectados quaisquer *Streptococcus*. A acessibilidade das células alvo à droga e iluminação é a principal desvantagem no uso da terapia fotodinâmica no tratamento de cárie dentária, como de fato tem sido também constatado no aspecto clínico da terapia fotodinâmica para o câncer.

A FLL de microrganismos foi avaliada em relação à alteração da concentração de azul de toluidina O e do tempo de pré-irradiação por Jackson et al. em 1996. Utilizando-se azul de toluidina em concentrações entre 12,5 a 100 µg/mL e variando-se o tempo de pré-irradiação de 2 a 360 minutos com uma dose constante de energia laser obteve-se 99% de morte com concentrações de 25µg/mL. As mortes também dependeram do tempo de pré-irradiação (TPI) com sensibilização total alcançada com TPI de 5 minutos. A redução da dose de energia resultou em um decréscimo de morte de bactérias.

Em um estudo realizado para determinar o efeito da variação da concentração, da dose de energia e do tempo de pré-irradiação, Bhatti et al. (1996) utilizaram culturas bacterianas de *P gingivalis*, concentrações de 12,5, 25 e 50µg/mL de azul de toluidina O (ATO), TPI de 2, 60 e 180 minutos e de energia de 876, 2190 e 4380 mJ/cm². Como resultado obtiveram 99% de morte com todas as concentrações de ATO utilizadas, 99% com energia de 876 e 2190 mJ/cm² e 100% com 4380 mJ/cm² de energia. Com relação às variações do TPI houve pequena alteração no número de redução microbiana.

Bhatti et al. (1997a) determinaram o efeito da dosimetria, a influência da concentração do agente fotossensibilizante, tempo de irradiação, soro e fase de crescimento na captação do sensibilizante pelos *P. gingivalis* na FLL das *Porphyromonas gingivalis* usando azul de toluidina O e luz irradiada a partir de um laser de He-Ne. Os fatores dosimétricos estudados foram a concentração de azul de toluidina O, dose da luz e de tempo de pré-irradiação. Na presença de azul de toluidina O, um aumento de morte dose-dependente evidente esteve presente (100% de morte com 4,4 J). Não houve efeito significativo nos números de morte quando aumentou-se a concentração de azul de toluidina O de 12,5 para 50 µg/mL. Um aumento no tempo pré-irradiação (TPI) conduziu a um leve aumento nas mortes substanciais em presença de soro, estas foram menores que aquelas obtidas na presença de solução salina. Células nas três fases (lag, log e estacionária) de crescimento foram suscetíveis.

Em um outro estudo Bhatti et al. (1997b) estudaram a influência da concentração do agente sensibilizante ATO, soro, tempo de pré-irradiação (TPI), fase de crescimento na captação do sensibilizante. Ademais, a distribuição de ATO dentro da bactéria foi averiguada. Incubação em ATO com concentração de 12,5; 25 e 50 µg/mL e exposição a 876 mJ de energia proveniente de laser de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$) resultou em reduções de 4,5; 4,0 e $3\log_{10}$ na viabilidade, respectivamente. Células incubadas em concentrações crescentes (12,5 – 200 µg/mL) de ATO marcadas com radioisótopo de hidrogênio ($^3\text{H-ATO}$) mostrou aumento na captação de 50 µg/mL. Não houve diferença significativa nas mortes em TPIs de 1,5 e 15 minutos, e a captação de $^3\text{H-ATO}$ alcançou o máximo após 5 segundos. Na presença de soro, houve uma redução de $3\log_{10}$ nas contagens de viáveis comparada com uma redução de $5,5\log_{10}$ na presença de solução salina. A

captação de $^3\text{H-ATO}$ no soro foi 6 vezes menor que em solução salina. Com relação à influência das fases lag, log e estacionária na fotossensibilização, o estudo demonstrou que houve, respectivamente, reduções de 4,0; 5,0 e 3,0 na contagem dos viáveis. nas células na fase log, a captação do $^3\text{H-ATO}$ ocorreu mais rapidamente que nas outras duas fases. A distribuição celular do agente sensibilizante foi avaliada pelo fracionamento das células sensibilizadas. A distribuição foi de 86% na membrana externa, 5,4% na membrana plasmática, 5,7% nas proteínas citoplasmáticas, 1,9% em outros constituintes citoplasmáticos e 0,25% em DNA.

Komerick, Hooper e Wilson (1997) realizaram um estudo para identificar se os microrganismos Gram-negativos responsáveis pela mucosite poderiam ser inativados pela combinação fotossensibilizante-laser e também o efeito da dose de energia, concentração do corante, tempo de pré-irradiação e o efeito da presença de saliva. Suspensões de bactérias em solução salina foram incubadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ de azul de toluidina por 60 segundos (TPI) e expostas a dosagens de 1,05 a 31,5J por um laser de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$). O mesmo experimento foi repetido utilizando-se concentrações de azul de toluidina O de 3,1 a 50 $\mu\text{g/mL}$ com um TPI de 60 segundos e dose de energia de 6,3J. O efeito do tempo de pré-irradiação também foi testado com uma variação de 5 a 300 segundos. Foi constatada uma redução significativa na viabilidade de todos os microrganismos na dependência da dose de energia e concentração de corante, porém variações no TPI não promoveram qualquer efeito na morte dos mesmos.

Bhatti et al. (1998), com o objetivo de verificarem o mecanismo de ação do corante azul de toluidina O, determinaram a distribuição do fotossensibilizante dentro de *Porphyromonas gingivalis* e o possível ou possíveis mecanismos de ação

envolvidos na FLL deste microrganismo com laser de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$). A distribuição do azul de toluidina O foi determinada incubando-se o microrganismo com azul de toluidina O marcado com radioisótopo de hidrogênio e fracionando-se as células na membrana externa, membrana plasmática, proteínas citoplasmáticas, outros constituintes citoplasmáticos e DNA. A porcentagem do corante em cada uma das frações foi 86,7; 5,4; 1,9; 5,7 e 0,3% respectivamente. Houve evidência de alteração na massa molecular de várias proteínas das membranas plasmática e externa, comparando-se os controles, bem como de dano ao DNA obtido das células irradiadas. Os resultados do estudo sugerem aos autores que a FLL dos *P. gingivalis* pode envolver alterações nas proteínas das membranas externas e/ou plasmática e danos em DNA mediados por oxigênio singleto.

Wainwright et al. (1999) mediram a capacidade tóxica e fototóxica do azul de metileno e dois de seus derivados (azul de metil-metileno e azul de dimetil-metileno) contra um tipo sensível e outro resistente a vancomicina de *Enterococcus faecalis* e dois tipos resistentes a vancomicina de *Enterococcus faecium*. Todos os compostos apresentaram atividade bactericida, porém os agentes derivados do azul de metileno apresentaram taxas de morte bacteriana superiores ao composto original. Os autores concluíram que este fato se devia aos compostos metilados apresentarem uma hidrofobicidade maior que o azul de metileno, o que permitia uma maior interação dos mesmos com a parede celular, exibindo desta forma uma maior eficácia bactericida.

Jackson et al. (1999), em um estudo *in vitro*, investigaram a redução microbiana da *Candida albicans* em suas formas de levedura e hifas. Os autores utilizaram para tal estudo um laser de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$) de 35 mW e o corante de azul de toluidina O como fotossensibilizador. Foram avaliados nesse estudo a

concentração do corante, a dose de aplicação do laser e o tempo de pré-irradiação. Concluiu-se que: a associação laser e corante reduz substancialmente a morte microbiana nas duas formas testadas, a morte microbiana é dose dependente e que para a forma de levedura do microrganismo testado o tempo de pré-irradiação de 5 minutos é o mais efetivo, pois a forma de hifa não foi influenciada por tal variável.

A terapia fotodinâmica com FLL contra patógenos oportunistas da microflora oral foi avaliada por Ivanov et al. (2000). Concentrações de 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% do corante azul de metileno, um laser de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$) com intensidade de $100\text{mW}/\text{cm}^2$ e suspensões bacterianas de *Staphilococcus ssp* foram utilizadas. Avaliou-se também o efeito do tempo de pré-irradiação. Os autores constataram que a concentração do corante a 1% era tóxico para as bactérias durante a avaliação do tempo de pré-irradiação e, portanto, esta concentração foi abandonada. Os resultados demonstraram que as concentrações de 0,1% e de 0,01% com tempo de pré-irradiação de 3 minutos apresentaram efeitos antimicrobiano nas bactérias testadas, e que o azul de metileno é um efetivo sensibilizante de bactérias patogênicas da cavidade oral.

Bhatti et al. (2000) avaliaram os efeitos na atividade de enzimas proteolíticas em microrganismos após a irradiação com laser de He-Ne na presença de ATO. Suspensões de *P. gingivalis* foram avaliadas quanto a sua viabilidade na presença de várias concentrações do fotossensibilizante. Para uma concentração de $12,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ e uma energia de 126 J houve 100% de redução da atividade enzimática, o que demonstra que o principal fator de virulência da referida bactéria pode ser inativado através da FLL.

A capacidade de a FLL reduzir a contaminação bacteriana em canais radiculares foi testada por Silbert et al. (2000). Após instrumentação mecânica e

esterilização, raízes de dentes humanos foram divididas em dois grupos, onde o primeiro foi inoculado com uma suspensão de *Streptococcus mutans* e o segundo com uma suspensão de *Enterococcus faecalis*. Utilizando-se uma fonte de laser de diodo de fosforeto índio gálio alumínio (InGaAlP) de 670nm de comprimento de onda associado ao corante azul de metileno, as raízes foram irradiadas por períodos de tempo que variaram de 30 a 240 segundos. Os autores concluíram que a FLL pode ser um efetivo método de redução bacteriana intracanal, porém os parâmetros devem ser ajustados para que se consiga uma eliminação mais eficaz de bactérias como o *Enterococcus faecalis*.

A efetividade da terapia fotodinâmica com FLL foi avaliada em relação à redução de bactérias patogênicas de bolsas periodontais de 30 pacientes, por Dortbudak et al. (2001a). Suspensões de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia* foram tratadas com uma solução de 100µg/mL de azul de toluidina O e um laser de diodo de 690nm de comprimento de onda. Os resultados demonstraram que uma redução significativa dos três patógenos testados in vivo foi alcançada e, portanto, este tratamento pode ser de considerável contribuição ao tratamento de pacientes com doença periodontal.

A descontaminação de superfícies de implantes de 15 pacientes com periimplantite constatada foi avaliada por Dortbudak et al. (2001b). Os autores investigaram se a associação de um laser de diodo (690nm) e o corante azul de metileno (100µg/mL) seria capaz de uma redução nas culturas (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermédia*) coletadas antes e depois do uso da combinação em questão. Foi constatada uma redução significativa nas culturas dos três patógenos estudados.

Usacheva, Teichert e Biel (2001) compararam a capacidade de redução bacteriana dos corantes azul de metileno e azul de toluidina O com concentrações que variavam de 1 a 200µg/mL em suspensões bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*. Para tal estudo foi utilizado um laser de diodo com comprimento de onda de 630nm. Como resultados os autores obtiveram que ambos os corantes utilizados foram capazes de inativar as bactérias em questão, estando, no entanto, condicionados à concentração do corante ao tipo de bactéria e à quantidade de energia produzida pelo laser.

Em um estudo para avaliar a eficácia da FLL em bactérias envolvidas no desenvolvimento da doença cárie, Zanin, Brugnera Jr e Gonçalves (2002) utilizaram suspensões de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*, em conjunto com uma fonte laser de diodo de Arseneto de Gálio-Alumínio ($\lambda=660\text{nm}$) e fotossensibilizador azul de toluidina O (100µg/mL) e tempo de pré-irradiação de cinco minutos. Os resultados sugeriram que a terapia fotodinâmica com fotossensibilização local é efetiva para a redução de bactérias cariogênicas.

Em um estudo clínico microbiológico Yilmaz et al. (2002) comparam a eficácia da FLL mediada por azul de metileno e/ou debridamento mecânico subgingival. Os autores concluíram que o conjunto azul de metileno/laser de baixa potência não trouxe benefícios clínicos e microbiológicos comparados ao debridamento mecânico.

Seal et al. (2002) compararam a eficácia da FLL em relação ao hipoclorito de sódio a 3%. Trinta e cinco dentes unirradiculares recém extraídos foram instrumentados, esterilizados e depois incubados com colônias de *Streptococcus intermedius*. Neste estudo foi utilizado um laser de He-Ne com comprimento de onda

de 632.8nm com energias de 2.1, 3.2, 4.2, 10.5 e 21 J, o corante azul de toluidina O em concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL e tempo de pré-irradiação de 60, 90, 120, 300, e 600 segundos. Para o grupo do hipoclorito de sódio a 3% os dentes foram preenchidos com o irrigante durante 5 minutos, foram secos e depois o procedimento foi repetido por mais 5 minutos. Os resultados demonstraram que para a concentração de 100 µg/mL, tempo de pré-irradiação de 600 segundos e energia de 21J houve eliminação total da bactéria em questão, como também no grupo do hipoclorito.

Segundo (2002) avaliou o potencial de redução bacteriana intracanal de canais contaminados com *Enterococcus faecalis*. Para o estudo foram utilizados grupos de dez dentes cada, onde se comparou a eficácia da FLL em relação ao hipoclorito de sódio a 0,5%. Uma pasta de corante azuleno (25%) e endo-PTC foi utilizada com um tempo de pré-irradiação de 5 minutos, e laser de diodo de comprimento de onda de 685nm. O autor constatou que a redução bacteriana foi significativamente mais alta no grupo laser do que quando comparada ao grupo da substância química. O autor concluiu que a terapia fotodinâmica com FLL é um método efetivo de redução bacteriana intracanal.

Phoenix et al. (2003) avaliaram a fototoxicidade dos fenotiazínicos e seus derivados contra os microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Foram utilizados como agentes fotossensibilizadores os corantes novo azul de metileno, dimetil azul de metileno, azure A, azure C, azure B, orto azul de toluidina, azul cristal brilhante, pyronin Y e vermelho neutro em concentrações mínimas letais de 3.1-1000µM, e fonte de luz com dose total de luz de 3.15J/cm². Os autores concluíram que a grande maioria dos corantes utilizados foi eficaz contra os

microrganismos em questão e que tal terapia pode ser de grande benefício contra patógenos gram negativos.

Zampieri et al. (2003) avaliaram *in vitro* a atividade bactericida da terapia fotodinâmica com laser de baixa potência de diodo AsGaAl sobre bactérias constituintes da microflora bucal humana (*Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*), além de verificar as melhores densidades energéticas na potência de 30mW para a atividade bactericida. Nessa pesquisa foi utilizado o corante azul de toluidina orto como fotossensibilizador, na concentração de 75µg/mL. A cepa de bactéria foi submetida a três lasers de baixa potência de AsGaAl com densidade energética variando em 3J, 6J e 9J/cm². Os resultados obtidos para cepas do *Streptococcus mitis* foram: 30mW 3J/cm² 83,3%; 6J/cm² 84,9%; 9J/cm² 77,6%; e para cepas de *Streptococcus sanguis* foram: 30mW 3J/cm² 98,9%; 6J/cm² 92,6%; 9J/cm² 94,3%.

A capacidade da irradiação laser de He-Ne ($\lambda=632,8\text{nm}$) em conjunto com um agente fotossensibilizante foi comparada a de uma fonte de luz convencional em produzir efeitos tóxicos no patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis*, por Matevski et al. em 2003. O corante utilizado foi o azul de toluidina O (50µg/mL) e a fonte de luz convencional foi uma lâmpada de Xenon com filtro vermelho e tempo de pré-irradiação de 5 min. Os resultados demonstraram que o uso de uma fonte de luz convencional pode ser, no mínimo, tão efetiva como quando se utiliza um laser, porém o aumento de temperatura causado pela fonte de luz convencional pode comprometer a sua aplicabilidade clínica.

2.5.1 efeitos sobre células hospedeiras

Soukos et al. (1996) avaliaram se os tecidos hospedeiros poderiam ser afetados por doses de luz e a concentração dos fotossensibilizantes efetivos contra bactérias. Em uma cultura de queratinócitos e fibroblastos obtidos de tecido gengival humano sadio, os autores avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de azul de toluidina O (0,5 a 50 μ g/mL) no crescimento das células por meio de método colorimétrico para determinar o número de células viáveis. Como resultado obtiveram que em baixas concentrações o ATO foi citotóxico para os fibroblastos. A mais alta concentração do corante que não exibiu efeito estatisticamente significativa na viabilidade foi de 2,0 μ g/mL para os queratinócitos e de 5,0 μ g/mL para os fibroblastos. Outro parâmetro avaliado no estudo foi a absorvância do ATO pelas células, e se concluiu que a porcentagem de entrada do fotossensibilizante foi de 7,5% para os queratinócitos e de 6,9% para os fibroblastos.

A fototoxicidade dos corantes fenotiazínicos, como azul de metileno e seus semelhantes (faixa de absorção entre 620 e 660 nm) foram avaliadas por Wainwright et al. (1997) contra cepas Gram-positivas e negativas. Soluções aquosas de azul de toluidina (ATO), azul de metileno (AM), azul de dimetil metileno (ADM), verde de metileno (VM), laranja de acridina (LA) e proflavina (P) foram avaliadas quanto à capacidade de produção de oxigênio singleto. A avaliação também foi feita em relação à concentração mínima letal de cada droga pela sua capacidade de inibição de crescimento em culturas das cepas de bactérias. Os resultados demonstraram que quando se altera a estrutura do corante pode-se melhorar a fotoatividade contra uma gama de bactérias. Também demonstraram que cada composto fenotiazínico

tem capacidade de produzir singletos sendo que ADM>AM>ATO>VM. Concluiu-se então que os fenotiazínicos apresentam ação antibacteriana equivalente ou melhorada em relação as acridinas, tendo como vantagem o fato de seus comprimentos de onda de iluminação não se justaporem aos das porfirinas endógenas, não levando desta forma a efeitos colaterais citotóxicos nas células normais, apresentando aplicabilidade clínica.

O efeito do azul de toluidina O combinado com luz laser na mucosa bucal de ratos foi avaliado por Komerick et al. (1998). Nesse estudo foram avaliados a concentração de ATO (50-200µg/mL), a dose de luz laser (50-200 J/cm²), o tempo de pré-irradiação (5 segundos a 20 minutos) e o efeito isolado do laser e do corante. Em cada grupo experimental foi utilizado um lado da boca do animal como meio de trabalho e o lado oposto como grupo controle. Realizados os estudos, os animais foram sacrificados a cada 72 horas, obtendo-se assim tecidos para exame histopatológico. Os resultados demonstraram que não houve quaisquer alterações de necrose ou inflamatórias na mucosa com todos os parâmetros utilizados no estudo.

Bhatti et al. (2000) avaliaram se uma combinação de um anticorpo e azul de toluidina O poderia ser utilizada para agir especificamente em cepas de *P. gingivalis* quando na presença de *S. sanguis* e de fibroblastos humanos gengivais. Em um grupo, uma mistura de *P. gingivalis* e *S. sanguis* foi tratada com 4µg/mL de ATO e irradiada com um laser de He-Ne, obtendo-se uma redução no numero de unidades formadoras de colônias viáveis (1,5 e 4,0 log₁₀ respectivamente). Quando se utilizou a combinação do fotossensibilizante com o anticorpo específico, obteve-se uma redução significativa de *P. gingivalis* não observada para o *S sanguis* (5,0 e 0,1 log₁₀ respectivamente). Com relação ao grupo comparado com os fibroblastos humanos,

quando não se utilizou a combinação com anticorpo obteve-se 0,7 log₁₀ de redução na quantidade de unidades formadoras de colônia para o *P. gingivalis* e 99% de diminuição na incorporação de timidina pelos fibroblastos. Os autores concluíram que um alvo específico pode ser alcançado utilizando-se um fotossensibilizante combinado com um anticorpo, contra um componente de superfície celular desta bactéria.

Desta forma, a terapia fotodinâmica com fotossensibilização letal apresenta capacidade comprovada no combate à redução bacteriana, o que seria de grande interesse na área endodôntica. Justifica-se então avaliar o efeito da utilização destes agentes fotossensibilizadores (corantes) quando de sua aplicação intracanal.

3 PROPOSIÇÃO

Desta forma, constitui proposta experimental avaliar o efeito dos agentes fotoativadores, azul e metileno e azul de toluidina orto, quanto ao grau de manchamento da coroa dental tendo como variáveis o protocolo endodôntico e o veículo do corante, valendo-se do sistema digital de cores RGB e K.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Água destilada – Farmácia Oficinalis

4.1.2 Brocas FG diamantadas esféricas – KG Sorensen Ind. E Com., São Paulo

4.1.3 Brocas FG carbide esféricas KG Sorensen Ind. E Com., São Paulo

4.1.4 Brocas Gates-Glidden – Maillefer

4.1.5 Brocas de Largo – Maillefer

4.1.6 Brocas Endo-Z – Maillefer

4.1.7 Dentes humanos extraídos – unirradiculares (FOUSP)

4.1.8 EDTA-T – Farmácia Fórmula&Ação

4.1.9 Endo PTC – Farmácia Fórmula&Ação

4.1.10 Limas Tipo K – Maillefer

4.1.11 Limas Tipo H – Maillefer

4.1.12 Líquido de Dakin -- Farmácia Fórmula&Ação

4.1.13 Azul de Metileno 0,01% -- Farmácia Fórmula&Ação

4.1.14 Azul de orto toluidina 0,01%-- Farmácia Fórmula&Ação

4.1.15 Pincel tipo microbrush -- KG Sorensen Ind. E Com., São Paulo

4.1.16 Cola super-bonder – Loctite

4.1.17 Cimento temporário -- CIMPAT

4.1.18 Endo PTC corado com Azul de Metileno 0,01% – Farmácia Fórmula&Ação

4.1.19 Endo PTC corado com Azul de Toluidina orto 0,01% – Farmácia

Fórmula&Ação

4.1.20 Lâmpada PL D 65

4.1.21 Laser de baixa potência – Thera Lase DMC equipamentos

4.1.22 Máquina Fotográfica digital Olympus Camedia C3020

4.1.23 Micro computador – AMD ATLHON 1800 MHz 512Mb

4.1.24 Software Adobe Photoshop 7.0

4.1.25 Mesa Estativa com 2 refletores --Incaf

4.1.26 Silicone de adição -- Silon Herpo, Petrópolis, Brasil

4.1.27 Resina Acrílica -- Acrilex

4.2 Métodos

Foram selecionados no banco de dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo vinte dentes incisivos centrais superiores com as seguintes características: rizogênese completa, sem anomalias, portadores de face vestibular íntegra e nas demais faces permitiu-se cáries e ou restaurações rasas e ao exame radiográfico apresentavam canal único e sem alterações significantes.

A seguir, foram lavados, durante uma hora, em água corrente e submetidos ao processo de limpeza e remoção de sujidades, com o auxílio de: ultra-som, curetas periodontais, escovas de polimento e pasta aquosa de pedra pomes. As lesões de cárie foram removidas com auxílio de brocas esféricas carbide montadas em motor de baixa rotação e essas cavidades foram preenchidas com ionômero de vidro tipo I. Na seqüência, os dentes foram mantidos em estufa durante setenta e duas horas, e submersos em água destilada à temperatura de 37 C°.

4.2.1 procedimentos prévios

4.2.1.1 *preparo dos espécimes*

O acesso à câmara pulpar foi executado com instrumentos rotatórios esféricos diamantados até o limite esmalte/dentina, prosseguindo-se com rotatórios esféricos em aço carbide.

Após o acesso à câmara pulpar, a remoção do seu teto foi realizada com brocas esféricas em aço carbide, e o preparo das paredes da cavidade pulpar com brocas em formato tronco-cônico e ponta embotada (endo z).

O preparo da entrada do canal e de sua porção cervical foi realizado inicialmente com limas endodônticas tipo K e complementado pela utilização de brocas tipo Gates-Glidden e largo adaptadas em motor de baixa rotação.

A mensuração do canal radicular foi realizada com instrumento tipo k de diminuto calibre, introduzido no canal até que sua ponta coincidisse com o forame apical, o que foi comprovado pelo auxílio de uma lupa com cinco vezes de aumento.

Limas tipo K de pequeno calibre com suas pontas encurvadas foram utilizadas para a remoção do conteúdo orgânico do canal, utilizando-se como solução irrigante o hipoclorito de sódio a 0,5% com o auxílio de seringa descartável de 10mL e agulha hipodérmica (30X5).

A escolha do primeiro instrumento recaiu naquele que ao atingir o comprimento de trabalho, ajustou-se às paredes do canal.

Em todos os espécimes realizou-se a técnica seriada, utilizando-se limas tipo K, em seqüência de pelo menos cinco instrumentos, tendo como comprimento real de trabalho 1 mm aquém do ápice anatômico. Durante a instrumentação, todos os espécimes foram preparados com a utilização de creme Endo PTC e de líquido de Dakin, segundo técnica proposta por Paiva e Antoniazzi (1993). Após o último instrumento, alternou-se irrigação com líquido de Dakin e agitação do conteúdo do

canal pelo uso do ultimo instrumento utilizado, até a total eliminação do creme Endo PTC, constatado pela ausência de efervescência.

Após a eliminação de todo o Endo PTC, o conteúdo do canal foi aspirado e secado com o auxílio de cones de papel absorvente. Na seqüência, os canais foram irrigados com solução de EDTA-T ,10 mL durante cinco minutos. Prosseguiu-se com a aspiração do conteúdo do canal e secagem, seguidos de nova irrigação final com 5 mL de Dakin. Finalizou-se o procedimento, com a armazenagem dos espécimes em água destilada.

Feito isso, os espécimes foram divididos em dois grupos de dez onde suas coroas foram separadas de suas raízes a cerca de 2 mm da junção amelo-dentinária e a superfície exposta selada com cola super-bonder (Loctite) com o auxílio de pincel microbrush e a abertura do canal com cimento temporário (CIMPAT).

4.2.1.2 preparo para tomada fotográfica

Para análise cromática foi necessária a confecção de dispositivo de resina acrílica para que a leitura cromática a cada tempo experimental fosse realizada exatamente no mesmo ponto. O dispositivo foi confeccionado com resina acrílica com 45 mm de comprimento, 32 mm de largura e 7 mm de altura.

No centro do dispositivo foi confeccionada uma loja com 18 mm de comprimento, 11 mm de largura e 7 mm de profundidade, tais medidas foram obtidas a partir da medição de todos os dentes, que uma vez preparados, foram medidos em relação a sua largura, altura e comprimento com o auxílio de um paquímetro.

Uma tela milimetrada foi colada em toda sua superfície para que na fase de análise cromática fossem utilizados sempre os mesmo pontos de avaliação.

Para cada espécime foi confeccionado um suporte com silicone de adição (Silon – Herpo, Petrópolis, Brasil) de modo a encaixar dentro da loja e manter a superfície vestibular do dente para cima.

Cada suporte de silicone recebeu a designação M (1-10) para grupo de metileno e T (1-10) para o grupo de toluidina (figuras de 4.1 a 4.5).

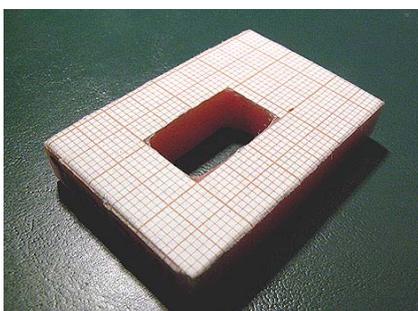


Figura 4.1 - Dispositivo de resina



Figura - 4.2 Suportes de silicone

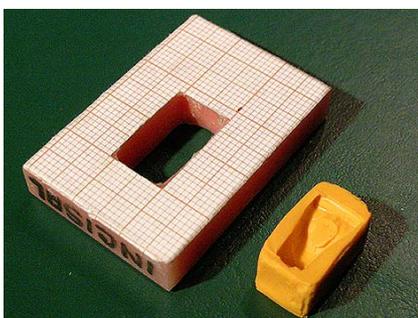


Figura 4.3 - Dispositivo de resina e suporte de silicone



Figura 4.4 - Espécime posicionado em seu respectivo suporte de silicone

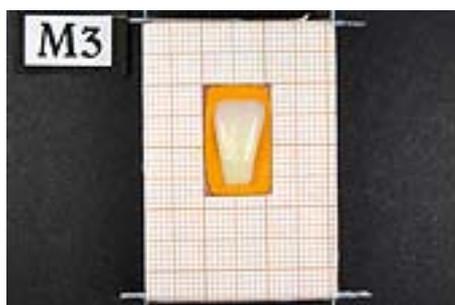


Figura 4.5 - Espécime em posição para tomada

Para a realização das tomadas fotográficas foi utilizada uma mesa estativa de dois refletores associada a duas lâmpadas de 6500 Kelvin.

Para as tomadas fotográficas foi colada na base da mesa estativa uma cartolina de cor preta. Nesta mesma cartolina foi realizada uma marcação com caneta branca feita de tal forma que sua imagem coincidissem com a área visualizada através do display digital da máquina.

A haste vertical da mesa estativa foi posicionada em sua posição mais inferior e as angulações dos braços articulados onde se encontravam os refletores travados a partir de roldanas e marcados com fita crepe e caneta de retroprojeter (figuras de 4.6 a 4.8).



Figura 4.6 - Marcações na mesa estativa



Figura 4.7 - Área visualizada no momento da tomada fotográfica



Figura 4.8 - Marcações na mesa estativa

4.2.2 tomadas fotográficas

Após os procedimentos prévios, os espécimes de cada grupo foram fotografados com o auxílio de máquina fotográfica digital acoplada a uma mesa

estativa com uma distância focal de 20 cm, abertura de 5.0 e velocidade de abertura de 1/320 segundos.

Tomadas fotográficas foram realizadas em três tempos experimentais: imediatamente após o preparo químico-cirúrgico (L0), após a aplicação do corante e da irradiação laser (L1) e dez dias após esta última (L2).

4.2.3 modelo experimental

Foram utilizados dois diferentes veículos de aplicação e dois protocolos para remoção do corante da câmara pulpar.

Grupo C: Corante em solução aquosa (0,01%) preenchendo a cavidade de acesso com irrigação final de 10 mL de líquido de Dakin;

Grupo E: Substância química Endo PTC associada ao corante (0,01%) em sua formulação com irrigação final de 10 mL de líquido de Dakin;

Grupo CE: Corante em solução aquosa (0,01%) com irrigação final de líquido de Dakin em conjunto com Endo PTC por 15 min;

4.2.4 dinâmica da aplicação do corante e irradiação laser

Grupo C - Os espécimes foram preenchidos (cavidade de acesso) com os corantes: azul de toluidina O a 0,01% e azul de metileno 0,01%, para isso foram

empregados tubetes de anestésico acoplados em seringa “carpule” com agulhas do tipo gengival curta, permanecendo por um período de 5 minutos (tempo de pré-irradiação) seguidos da aplicação do laser por um tempo adicional de três minutos de irradiação. Os parâmetros do laser utilizado (Thera Lase DMC equipamentos, laser de InGaAlP $\lambda = 685\text{nm}$) foram: Potência de 35mW, dose de $2228,5 \text{ J/cm}^2$ e aplicação pontual (diâmetro da ponteira 0.60mm). Após a irradiação dos espécimes foi realizada a irrigação (10mL) com hipoclorito de sódio a 0,5%, seguida da aspiração e tomada fotográfica.



Figura 4.9 - Corantes acondicionados em tubetes anestésicos



Figura 4.10 - Equipamento laser utilizado

Grupo E - Os espécimes foram preenchidos com Endo PTC contendo os corantes em sua formulação com o auxílio de seringa descartável de 5mL e cânula de metal 40/20, por um tempo de 5 minutos (tempo de pré-irradiação) seguidos da aplicação do laser por um tempo adicional de três minutos de irradiação. Os

parâmetros do laser utilizado (Thera Lase DMC equipamentos, laser de InGaAlP $\lambda=685\text{nm}$) foram: Potência de 35mW e dose de 2228,5 J/cm² (diâmetro da ponteira 0.60mm). Após a irradiação dos espécimes foi realizada a irrigação (10mL) com hipoclorito de sódio a 0,5%, seguida da aspiração e tomada fotográfica.

Grupo CE - Os espécimes foram preenchidos os corantes: azul de toluidina O a 0,01% e azul de metileno 0,01%, para isso foram armazenados em tubetes de anestésico acoplados em seringa “carpule” com agulhas do tipo gengival, por um tempo de 5 minutos (tempo de pré-irradiação) seguidos da aplicação do laser por um tempo adicional de três minutos de irradiação. Os parâmetros do laser utilizado (Thera Lase DMC equipamentos, laser de InGaAlP $\lambda=685\text{nm}$) foram: Potência de 35mW e dose de 2228,5 J/cm² (diâmetro da ponteira 0.60mm). Após a irradiação os espécimes foram preenchidos com creme de Endo PTC e irrigados com hipoclorito de sódio a 0,5% até o final da reação de efervescência durante quinze minutos, aspirados e levados para tomada fotográfica.

4.2.5 análise cromática

As imagens obtidas de todos os espécimes nos tempos experimentais antes (L0), imediata (L1) e dez dias após (L2), para todos os grupos, foram avaliadas por um software para tratamento de imagens (Adobe Photoshop 7.0).

Um mesmo local para cada um dos dentes foi selecionado para avaliação, utilizando as coordenadas x e y – eixo horizontal e vertical, respectivamente, onde o

ponto zero foi estabelecido no canto inferior esquerdo do espaço onde era encaixado o suporte de silicone.

A cada leitura, antes da avaliação do espécime, o suporte de resina era sempre avaliado num mesmo ponto: o centro do quadrado inferior esquerdo ($x = -1$ mm e $y = -1$ mm). A partir da primeira leitura de todos os grupos (L, E e C+E), o valor para o suporte de resina foi sempre de $k=18\%$.

Para cada um dos dentes em cada tempo experimental, foram obtidos os valores R (red), G (green) e B (blue) e o valor de K (originariamente do Sistema CYMK, onde C=cian, Y=yellow, M=magenta e K=black).

Os valores de K serviram como parâmetros de avaliação nos diferentes tempos experimentais L0, L1 e L2. (CARVALHO, 2002)

As fotos de cada tempo experimental dos espécimes de cada grupo foram então analisadas através do programa Adobe Photoshop 7.0. Com o dispositivo em resina acrílica foi possível mensurar, com o auxílio da tela milimetrada a alteração cromática dos espécimes sempre no mesmo ponto através do sistema RGB e K de cores e a partir daí proceder-se com a análise estatística.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos pela aplicação do modelo experimental encontram-se expressos nas tabelas de 5.1 a 5.12 e gráficos de 5.1 a 5.5.

Para a melhor compreensão, abaixo segue a legenda dos itens dispostos nas figuras desse capítulo:

Grupo C: Corante em sua forma líquida

Grupo E: Substância química Endo PTC associada ao corante em sua formulação

Grupo CE: Corante em sua forma líquida com irrigação final de líquido de Dakin em conjunto com Endo PTC por 15 min

RGB K – Sistema de cores utilizado para avaliação da alteração cromática

L0 - tomada fotográfica logo após o pqc

L1 - tomada fotográfica logo após a irradiação

L2 - tomada fotográfica dez dias após

Tabela 5.1 - Valores de RGB e K para o grupo C com o corante azul de metileno

LEITURA RGB E K METILENO DO GRUPO C						
	LO		L1		L2	
M1	R 205	K 22%	R 258	K 30%	R 196	K 24%
	G 201		G 186		G 196	
	B 156		B 161		B 158	
M2	R 214	K 18%	R 182	K 25%	R 191	K 24%
	G 211		G 196		G 197	
	B 170		B 170		B 171	
M3	R 215	K 16%	R 199	K 21%	R 202	K 21%
	G 217		G 207		G 206	
	B 180		B 184		B 179	
M4	R 212	K 17%	R 186	K 21%	R 198	K 21%
	G 214		G 207		G 207	
	B 193		B 192		B 186	
M5	R 200	K 21%	R 181	K 23%	R 201	K 22%
	G 204		G 201		G 204	
	B 171		B 174		B 175	
M6	R 207	K 18%	R 199	K 21%	R 198	K 21%
	G 214		G 204		G 202	
	B 173		B 181		B 175	
M7	R 211	K 18%	R 202	K 19%	R 210	K 18%
	G 213		G 213		G 214	
	B 173		B 183		B 181	
M8	R 205	K 24%	R 184	K 27%	R 195	K 26%
	G 197		G 192		G 192	
	B 135		B 136		B 137	
M9	R 196	K 30%	R 181	K 30%	R 181	K 30%
	G 180		G 184		G 175	
	B 93		B 107		B 97	
M10	R 200	K 23%	R 177	K 26%	R 199	K 23%
	G 197		G 195		G 200	
	B 154		B 155		B 160	

Tabela 5.2 - Valores de RGB e K para o Grupo C com o corante azul de toluidina O

LEITURA RGB E K TOLUIDINA DO GRUPO C						
	LO		L1		L2	
T1	R 215	K 16%	R 208	K 18%	R 208	K 18%
	G 218		G 211		G 211	
	B 199		B 192		B 194	
T2	R 212	K 17%	R 195	K 23%	R 202	K 21%
	G 214		G 200		G 206	
	B 177		B 178		B 173	
T3	R 206	K 19%	R 192	K 22%	R 191	K 22%
	G 211		G 205		G 204	
	B 181		B 188		B 187	
T4	R 205	K 25%	R 193	K 27%	R 193	K 27%
	G 193		G 189		G 191	
	B 141		B 141		B 140	
T5	R 210	K 20%	R 199	K 23%	R 197	K 23%
	G 204		G 201		G 195	
	B 151		B 166		B 149	
T6	R 193	K 34%	R 174	K 39%	R 174	K 39%
	G 166		G 157		G 157	
	B 57		B 58		B 59	
T7	R 200	K 28%	R 183	K 31%	R 185	K 31%
	G 187		G 181		G 181	
	B 89		B 96		B 98	
T8	R 208	K 22%	R 188	K 27%	R 186	K 27%
	G 201		G 190		G 188	
	B 157		B 152		B 154	
T9	R 195	K 29%	R 184	K 31%	R 185	K 30%
	G 182		G 178		G 181	
	B 128		B 123		B 134	
T10	R 200	K 25%	R 186	K 28%	R 186	K 28%
	G 196		G 187		G 187	
	B 135		B 139		B 37	

Tabela 5.3 - Valores de RGB e K para o Grupo E com o corante azul de metileno

LEITURA RGB E K METILENO DO GRUPO E						
	L0		L1		L2	
M1	R 201	K 22%	R 193	K 24%	R 201	K 22%
	G 202		G 200		G 202	
	B 160		B 159		B 160	
M2	R 203	K 20%	R 199	K 21%	R 202	K 21%
	G 207		G 205		G 207	
	B 170		B 169		B 169	
M3	R 213	K 17%	R 201	K 18%	R 212	K 17%
	G 216		G 213		G 116	
	B 189		B 189		B 189	
M4	R 214	K 16%	R 204	K 17%	R 214	K 16%
	G 218		G 215		G 217	
	B 199		B 198		B 200	
M5	R 210	K 18%	R 201	K 21%	R 207	K 19%
	G 214		G 206		G 211	
	B 179		B 174		B 179	
M6	R 212	K 18%	R 194	K 22%	R 201	K 18%
	G 213		G 207		G 212	
	B 181		B 178		B 179	
M7	R 214	K 16%	R 189	K 20%	R 214	K 16%
	G 218		G 213		G 219	
	B 184		B 186		B 187	
M8	R 208	K 20%	R 194	K 24%	R 212	K 20%
	G 208		G 200		G 206	
	B 148		B 144		B 146	
M9	R 200	K 27%	R 181	K 30%	R 198	K 27%
	G 187		G 183		G 188	
	B 119		B 117		B 117	
M10	R 207	K 20%	R 195	K 23%	R 206	K 20%
	G 208		G 201		G 207	
	B 168		B 162		B 167	

Tabela 5.4 - Valores de RGB e K para o Grupo E com o corante azul de toluidina O

LEITURA RGB E K TOLUIDINA DO GRUPO E						
	L0		L1		L2	
T1	R 213	K 16%	R 207	K 19%	R 213	K 16%
	G 218		G 211		G 218	
	B 198		B 189		B 198	
T2	R 210	K 17%	R 207	K 19%	R 210	K 17%
	G 213		G 212		G 213	
	B 182		B 181		B 182	
T3	R 205	K 18%	R 199	K 20%	R 204	K 18%
	G 212		G 208		G 213	
	B 192		B 189		B 196	
T4	R 198	K 25%	R 200	K 25%	R 197	K 25%
	G 196		G 195		G 193	
	B 146		B 141		B 147	
T5	R 203	K 23%	R 199	K 25%	R 199	K 23%
	G 202		G 196		G 199	
	B 152		B 145		B 154	
T6	R 183	K 34%	R 176	K 38%	R 181	K 36%
	G 165		G 160		G 164	
	B 69		B 72		B 69	
T7	R 192	K 29%	R 186	K 30%	R 193	K 29%
	G 183		G 182		G 185	
	B 97		B 87		B 101	
T8	R 196	K 24%	R 198	K 24%	R 198	K 24%
	G 198		G 198		G 198	
	B 160		B 164		B 164	
T9	R 201	K 24%	R 200	K 25%	R 201	K 24%
	G 191		G 195		G 196	
	B 149		B 152		B 151	
T10	R 188	K 27%	R 185	K 28%	R 189	K 27%
	G 190		G 189		G 186	
	B 142		B 137		B 145	

Tabela 5.5 - Valores de RGB e K para o Grupo CE com o corante azul de metileno

LEITURA RGB E K METILENO DO GRUPO CE						
	L0		L1		L2	
M1	R 201	K 22%	R 195	K 23%	R 195	K 23%
	G 202		G 201		G 202	
	B 160		B 163		B 161	
M2	R 203	K 20%	R 200	K 21%	R 200	K 21%
	G 207		G 206		G 206	
	B 168		B 170		B 170	
M3	R 211	K 17%	R 199	K 18%	R 201	K 18%
	G 215		G 215		G 215	
	B 188		B 189		B 190	
M4	R 215	K 16%	R 206	K 17%	R 202	K 17%
	G 218		G 217		G 217	
	B 201		B 200		B 198	
M5	R 207	K 19%	R 202	K 21%	R 202	K 21%
	G 211		G 206		G 206	
	B 179		B 178		B 179	
M6	R 211	K 18%	R 196	K 22%	R 196	K 22%
	G 212		G 204		G 203	
	B 178		B 177		B 177	
M7	R 212	K 16%	R 193	K 19%	R 190	K 19%
	G 218		G 214		G 215	
	B 180		B 188		B 186	
M8	R 211	K 19%	R 193	K 23%	R 194	K 23%
	G 210		G 201		G 203	
	B 147		B 148		B 149	
M9	R 198	K 27%	R 184	K 31%	R 182	K 31%
	G 188		G 180		G 180	
	B 117		B 119		B 118	
M10	R 208	K 19%	R 197	K 22%	R 196	K 22%
	G 209		G 204		G 203	
	B 169		B 161		B 162	

Tabela 5.6 - Valores de RGB e K para o Grupo CE com o corante azul de toluidina O

LEITURA RGB E K TOLUIDINA DO GRUPO CE						
	L0		L1		L2	
T1	R 212	K 16%	R 209	K 18%	R 208	K 18%
	G 217		G 212		G 211	
	B 196		B 191		B 190	
T2	R 214	K 16%	R 206	K 19%	R 207	K 19%
	G 217		G 211		G 210	
	B 186		B 179		B 179	
T3	R 205	K 18%	R 197	K 20%	R 196	K 20%
	G 214		G 208		G 208	
	B 197		B 188		B 188	
T4	R 198	K 25%	R 198	K 25%	R 200	K 25%
	G 194		G 196		G 195	
	B 147		B 145		B 143	
T5	R 199	K 23%	R 199	K 25%	R 198	K 25%
	G 199		G 195		G 195	
	B 153		B 147		B 146	
T6	R 181	K 36%	R 177	K 38%	R 176	K 38%
	G 164		G 159		G 160	
	B 69		B 75		B 70	
T7	R 193	K 29%	R 189	K 30%	R 188	K 29%
	G 185		G 181		G 183	
	B 101		B 89		B 94	
T8	R 200	K 23%	R 200	K 23%	R 199	K 23%
	G 200		G 199		G 199	
	B 167		B 163		B 165	
T9	R 203	K 24%	R 196	K 25%	R 199	K 25%
	G 196		G 195		G 194	
	B 152		B 152		B 149	
T10	R 189	K 28%	R 185	K 28%	R 180	K 28%
	G 188		G 190		G 190	
	B 144		B 134		B 137	

Tabela 5.7 - Valores das médias de K para o Grupo C com o corante azul de metileno/azul de toluidina O

MÉDIAS K GRUPO C METILENO	
L0	20,7
L1	24,3
L2	23,0

MÉDIAS K GRUPO C TOLUIDINA	
L0	23,5
L1	26,9
L2	26,6

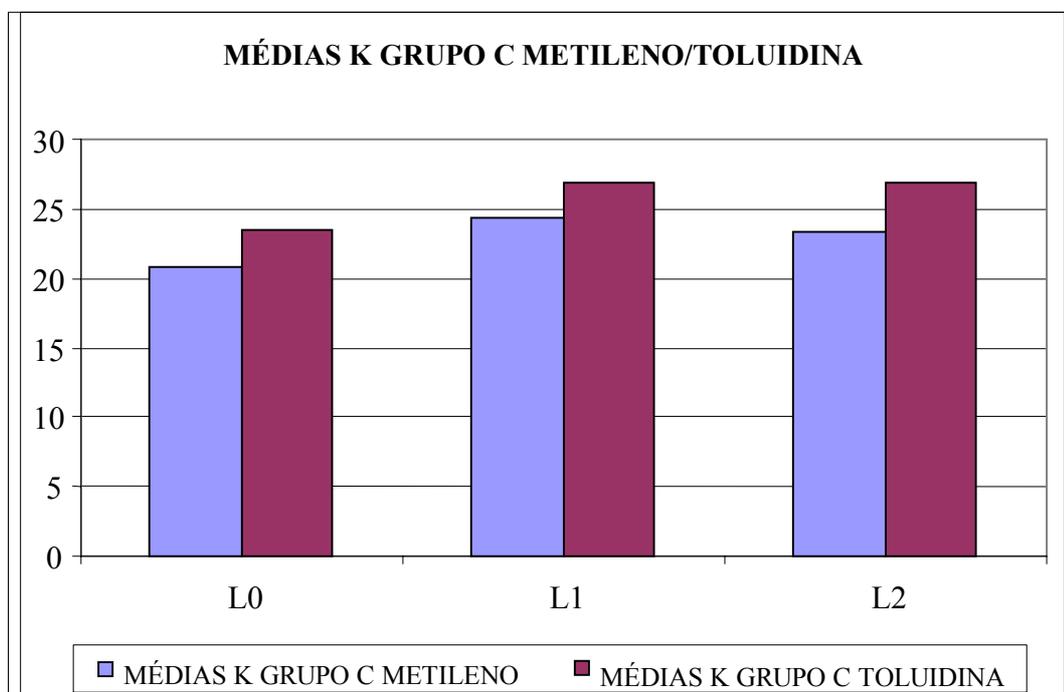


Gráfico 5.1 - Médias de K Grupo C azul de metileno/azul de toluidina O

Tabela 5.8 - Valores das médias de K para o Grupo E com o corante azul de metileno/azul de toluidina O

GRUPO E METILENO	
L0	19,4
L1	22,0
L2	19,6

GRUPO E TOLUIDINA	
L0	23,7
L1	25,3
L2	23,9

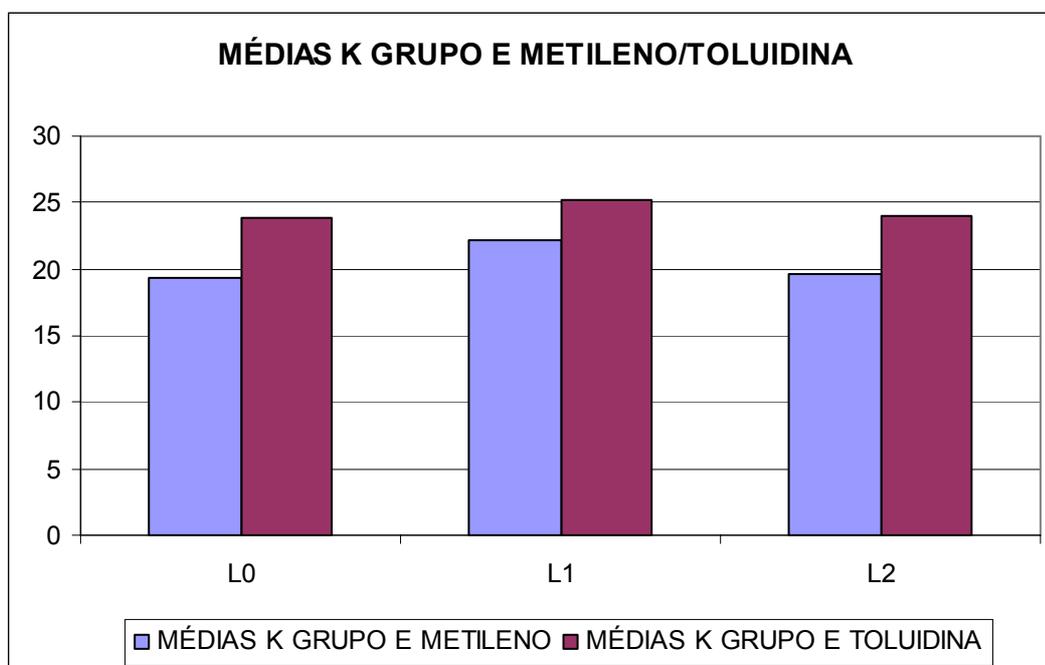


Gráfico 5.2 - Médias de K Grupo E azul de metileno/azul de toluidina O

Tabela 5.9 - Valores das médias de K para o Grupo CE com o corante azul de metileno/azul de toluidina O

GRUPO CE METILENO	
L0	19,3
L1	21,7
L2	21,7

GRUPO CE TOLUIDINA	
L0	23,8
L1	25,1
L2	25,0

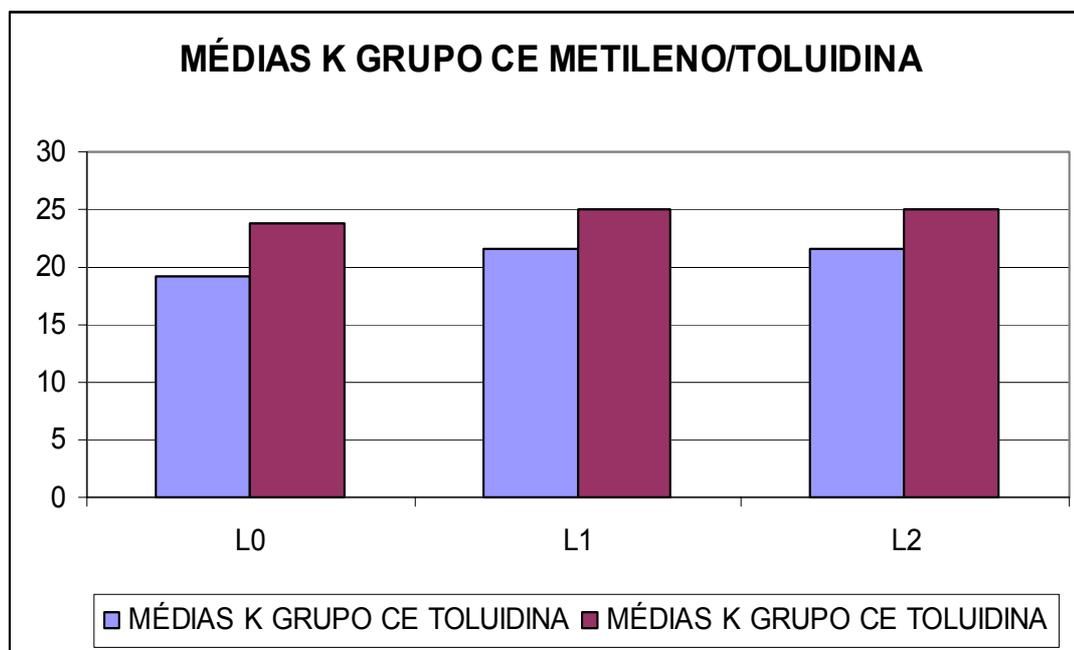


Gráfico 5.3 - Médias de K Grupo CE azul de metileno/azul de toluidina O

Tabela 5.10 - Valores das médias de K entre os grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de metileno

GRUPOS C/E/CE METILENO			
	L	E	CE
L0	20,7	19,4	19,3
L1	24,3	22,0	21,7
L2	23,0	19,6	21,7

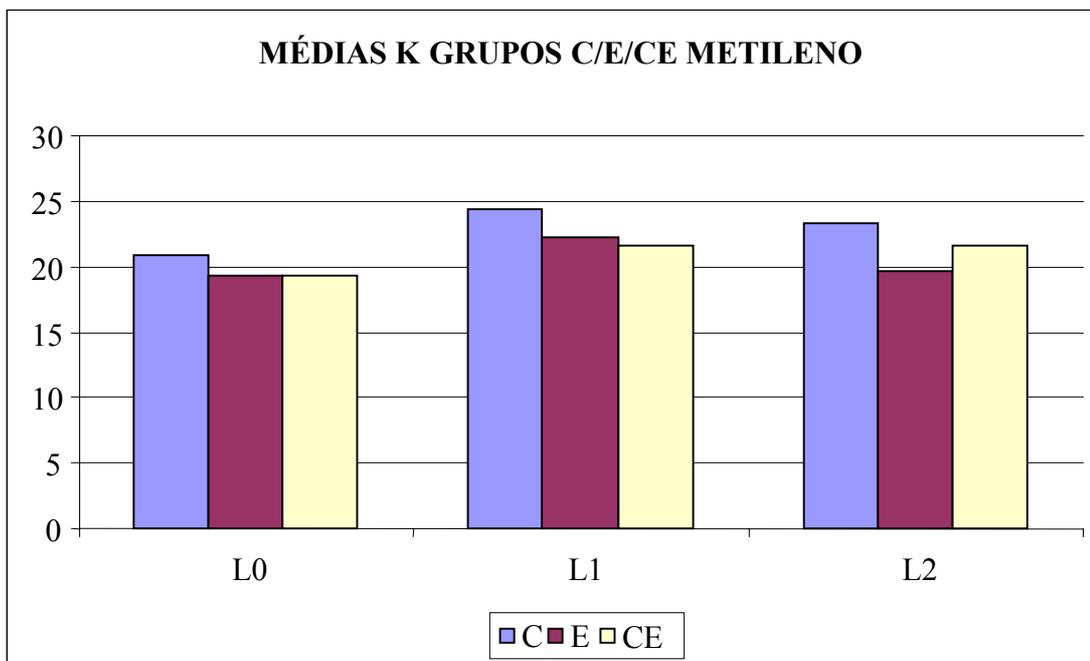


Gráfico 5.4 - Valores das médias de K entre os Grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de metileno

Tabela 5.11 - Valores das médias de K entre os Grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de toluidina O

GRUPOS C/E/CE TOLUIDINA			
	L	E	CE
L0	23,5	23,7	23,8
L1	26,9	25,3	25,1
L2	26,6	23,9	25,0

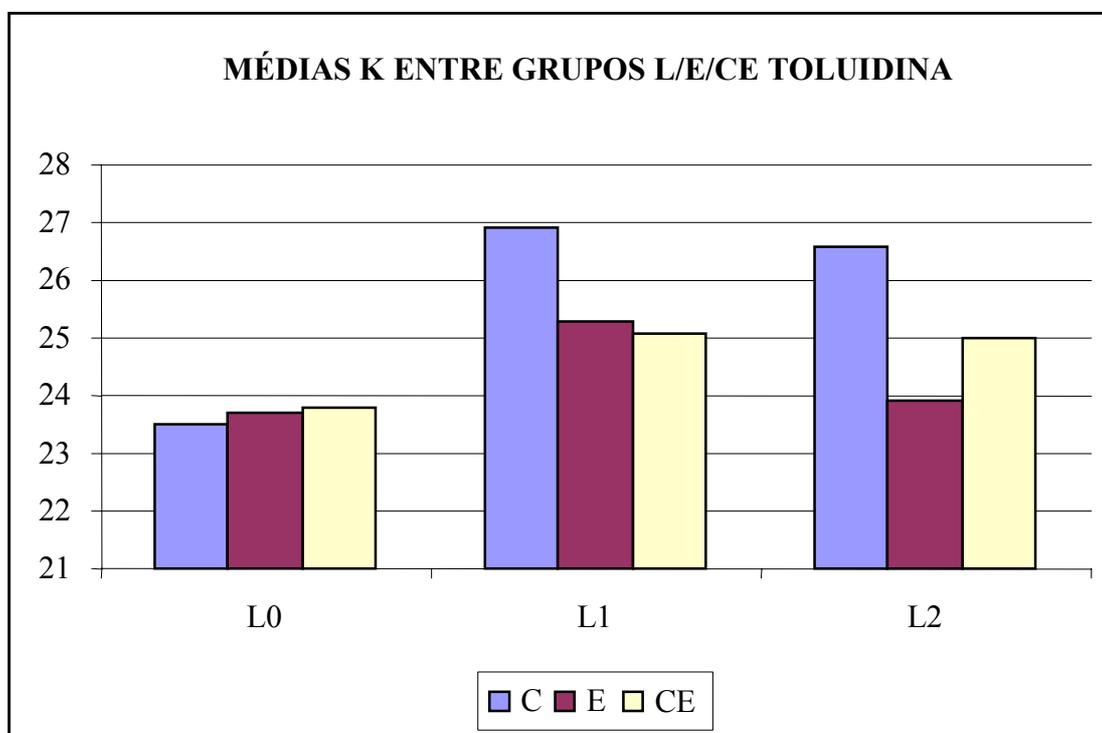


Gráfico 5.5 - Valores das médias de K entre os Grupos nos diferentes tempos experimentais com o corante azul de toluidina O

Tabela 5.12 - Análise das diferenças das porcentagens dos diversos grupos experimentais e análise estatística pelo teste de Wilcoxon ($p \leq 0,05$)

Grupos/ Espécimes	Grupo C				Grupo E				Grupo CE			
	Metileno		Toluidina		Metileno		Toluidina		Metileno		Toluidina CE	
	L1-L2	L2-L0	L1-L2	L2-L0	L1-L2	L2-L0	L1-L2	L2-L0	L1-L2	L2-L0	L1-L2	L2-L0
1	6%	2%	0%	2%	2%	0%	3%	0%	0%	1%	0%	2%
2	1%	6%	2%	4%	0%	1%	2%	0%	0%	1%	0%	3%
3	0%	5%	0%	3%	1%	0%	2%	0%	0%	1%	0%	2%
4	0%	4%	0%	2%	1%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%
5	1%	1%	0%	3%	2%	1%	2%	0%	0%	2%	0%	2%
6	0%	3%	0%	5%	4%	0%	2%	2%	0%	4%	0%	2%
7	1%	0%	0%	3%	4%	0%	1%	0%	0%	3%	1%	0%
8	1%	2%	0%	5%	4%	0%	0%	0%	0%	4%	0%	0%
9	0%	0%	1%	1%	3%	0%	1%	0%	0%	4%	0%	1%
10	3%	0%	0%	3%	3%	0%	1%	0%	0%	3%	0%	0%
Média das diferenças	1,30%	2,30%	0,30%	3,10%	2,40%	0,20%	1,40%	0,20%	0,00%	2,40%	0%	1,20%
Wilcoxon (p- valor)	(0,027)	(0,018)	0,18	(0,005)	(0,007)	0,157	(0,011)	0,317	1	(0,005)	0,317	(0,026)

Grupo C: Corante em solução aquosa

Grupo E: Substância química Endo PTC associada ao corante em sua formulação

Grupo CE: Corante em solução aquosa com irrigação final de líquido de Dakin em conjunto com Endo PTC por 15 min

L0 - tomada fotográfica logo após o pqc

L1 - tomada fotográfica logo após a irradiação

L2 - tomada fotográfica dez dias após

6 DISCUSSÃO

O êxito da terapia endodôntica tem aumentado significativamente com o avanço do conhecimento e o emprego de novas tecnologias. As constatações clínicas, aliadas aos conhecimentos proporcionados pela literatura especializada, esclarecem que o insucesso tem como justificativa falhas no processo de limpeza e desinfecção, isto é, perpetuando no sistema de canais, na intimidade da massa dentinária e algumas vezes na face externa do ápice radicular, não só produtos da decomposição pulpar, como também microrganismos, que impedirão o processo de cura.

A infecção endodôntica não se restringe apenas ao canal principal mas estende-se também à dentina radicular em profundidade, com especial atenção ao terço apical pela colonização de microrganismos anaeróbios (ANDO; HOSHINO, 1990; BERKITTEN et al., 2000a; PETERS et al., 2001). A contaminação invariavelmente superara o limite endodôntico atingindo o cemento apical e a ausência do mesmo, ocasionada por processos de reabsorção periapical, o que também facilita a infecção dentinária (HAAPASALO; ØRSTAVIK, 1987; KYRIU; HOSHINO; IWAKU, 1994).

Com o advento de novas tecnologias foi possível identificar e compreender melhor a natureza da infecção endodôntica. Experimentos demonstram a sua natureza polimicrobiana com um número reduzido de espécies, com microrganismos originários da cavidade oral e semelhantes aos encontrados em infecções

periodontais (HAAPASALO, 1993; KIPIOTI et al., 1984; ØRSTAVIK; PITT FORD, 1998).

A luz do sistema de canais radiculares determina uma seletividade à infecção microbiana, que é guiada pela tensão de oxigênio, viabilidade de nutrientes e interações entre os microrganismos, de modo que esta inicialmente é ditada por microrganismos aeróbios facultativos. Com o passar do tempo, esses microrganismos, devido ao consumo do oxigênio, diminuem em proporção em relação às anaeróbias estritas. Com o consumo das reservas de carboidratos, inicia-se a hidrólise protéica e fermentação de aminoácidos, alterando desta forma a flora sacarolítica por proteolítica. As relações ecológicas de comensalismo e antagonismo vão determinar então associações positivas e negativas entre microrganismos, onde o produto de certo tipo microbiano é essencial para o desenvolvimento de um outro e vice-versa (FABRICIUS et al., 1982; SUNDQVIST, 1992a, 1992b; THILO; BAEHNI; HOLTZ, 1986).

A presença de microrganismos no sistema de canais radiculares sempre representou um obstáculo a ser transposto, a fim de se obter condições favoráveis para a cura dos tecidos periapicais no menor tempo possível.

A utilização da laserterapia na endodontia tem sido amplamente estudada e indicada para utilização clínica. Vários são os aparelhos e técnicas que apresentam características adequadas para a terapia endodôntica, dando atenção especial a sua capacidade de redução bacteriana.

A utilização do laser de Nd:YAG tem sido comprovada na literatura há mais de dez anos, assim como sua capacidade de redução microbiana, atuando principalmente frente a cepas microbianas resistentes a terapia convencional com resultados animadores (BERKITEN et al., 2000b; CECCHINI, 2001; FOLWACZNY et

al., 2002; GUTKNETCH et al., 1996; KOBAYASHI et al., 1998; LAGE-MARQUES; EDUARDO; MATSUMOTO, 1995; MORITZ et al., 1997, 1999; MOSHNOV et al., 1995;).

Além de sua capacidade de redução microbiana, esse laser também promove a obliteração parcial dos túbulos dentinários, reduzindo desta forma a permeabilidade apical após a obturação do canal radicular (HARASHIMA et al., 1997; KIMURA et al., 1999; LAGE-MARQUES; EDUARDO; MATSUMOTO, 1995; SILVA, 2000; LEE; LIN; LIN et al., 2002; STABHOLTZ et al., 1992; TANJI; GOUW-SOARES; EDUARDO, 1998).

Outra área de aplicação da terapia laser na endodontia é o controle do processo inflamatório e do pós-operatório da terapia endodôntica. Na terapia endodôntica, após o preparo químico-mecânico, seguem-se repercussões no tecido periapical que se manifestam como fenômenos dolorosos de intensidade variável.

Tais manifestações não provêm exclusivamente do ato operatório, mas também das condições anátomo-clínicas do dente, do estado patológico da polpa ou dos tecidos periapicais, além do potencial irritativo do tratamento em si, quer por traumas mecânicos, quer por químicos (PAIVA; ANTONIAZZI, 1993).

A sensibilidade dolorosa do tecido pulpar se manifesta fundamentalmente como consequência do estabelecimento de uma reação inflamatória, com consequente produção de substâncias algógenas e potencializadoras da dor (PAIVA; ANTONIAZZI, 1993).

É devido a este fato que entre as sessões de obturação e de instrumentação do dente se preconiza a utilização de substâncias antiinflamatórias (além de antimicrobianas) como medicações intracanaís, para que se module estes sinais

próprios da inflamação. Essa modulação busca propiciar um pós-operatório favorável, traduzido na maior parte das vezes pela ausência de sensibilidade dolorosa (PAIVA; ANTONIAZZI, 1993).

O controle do pós-operatório é de grande importância para o sucesso da terapia endodôntica, pois uma reação inflamatória exacerbada gerada pelo preparo do canal radicular pode em alguns casos, retardar e até mesmo impedir uma reparação ideal dos tecidos periapicais, como também o é para o relacionamento do profissional com o seu paciente (PAIVA; ANTONIAZZI, 1993).

O efeito biomodulador da terapia laser de baixa potência apresenta várias aplicações na odontologia, como por exemplo, as melhoras significativas nos principais sinais da inflamação como: na circulação do tecido celular subcutâneo, favorecendo assim a drenagem linfática e tendo importante ação antiedematosa, estimular a secreção de hormônios, como as beta-endorfinas e encefalinas, que têm a função de modificar o comportamento da dor (ação analgésica), elevando assim o nível de percepção dolorosa além de estimular o tecido conjuntivo provocando o aumento do número de fibroblastos e, conseqüentemente, maior desenvolvimento das fibras colágenas, facilitando assim o processo de cicatrização (BRUGNERA JR; VILLA; GENOVESE et al., 1991; DONATO; BORAKS, 1993).

Mais especificamente na endodontia é utilizado pós-preparo químico-cirúrgico para reduzir a sensibilidade pós-instrumentação (SILVA; CECCHINI; EDUARDO, 1992), bioestimulação (ou modulação como está escrito no original) dos tecidos periapicais e promover maior reparação óssea periapical e analgesia e redução do processo inflamatório (MEZAWA et al., 1988), capeamento pulpar direto, aplicado a microexposição pulpar, previamente à aplicação do hidróxido de cálcio, visando à promoção da bioestimulação dos odontoblastos, aumento da velocidade de

formação de dentina reparacional (ALMEIDA-LOPES, 1999; KURUMADA, 1990; VILLA; BRUGNERA JR; AUN et al., 1988; THWE et al., 1994).

A fotossensibilização letal de microrganismos através da terapia fotodinâmica se insere neste contexto como mais uma alternativa de terapia que pode nos auxiliar no dia a dia da terapêutica endodôntica.

Este tipo de técnica apresenta como vantagem em relação ao laser de alta potência, a característica de não elevar a temperatura externa radicular devido ao fato de a fonte de luz laser provir de um laser de baixa potência (WALSH, 1997), independente da quantidade de energia utilizada e do tempo de irradiação (BACHMAN et al., 2000; KHAN et al., 1997; LAN, 1999).

A forma pela qual ocorre a morte bacteriana durante a fotossensibilização letal pode ser decorrência do aumento da permeabilidade da membrana ou perda do controle da permeabilidade pela ação de radicais livres como, por exemplo, hidroxila (OH^\cdot) que podem levar à produção de peróxido de hidrogênio com resultados citotóxicos, fotoperoxidação lipídica da membrana por meio da reação do tipo I, (ITO, 1980; WAINWRIGHT, 1998) ou a partir da reação do tipo II decorrente da produção de oxigênio no estado singleto formado pela transferência de energia do fotossensibilizante, no estado tripleto, para o oxigênio molecular, que então reage rapidamente *in situ* com o seu meio (parede celular, ácidos nucleicos, etc.) assegurando desta forma uma resposta localizada.

Na reação de tipo I ocorre na membrana citoplasmática bacteriana a abstração de hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas como os fosfolipídios. Os radicais formados podem ser submetidos a uma reação com o oxigênio, produzindo hidroperóxido lipídico. A peroxidação lipídica é danosa à integridade da

membrana, causando desta forma perda da fluidez e aumento da permeabilidade de íons.

Na fotossensibilização letal o processo de maior peso na inativação de microrganismos é a reação de tipo II. Da mesma forma que no Tipo I, o oxigênio singleto também reage com moléculas envolvidas na manutenção e estrutura da membrana/parede celular como os fosfolipídios, peptídeos e esteróis. Reação do oxigênio singleto com outras moléculas envolvidas na membrana/parede celular também podem ocorrer. Sabe-se também, que os ácidos nucleicos são atingidos pela reação de tipo II (Wainwright, 1998).

A partir destes processos várias foram as pesquisas demonstrando a inativação de vários tipos de microrganismos utilizando-se os corantes estudados neste estudo (BHATTI et al., 1996, 1997a, 1997b, 1998, 2000; BURNS; WILSON; PEARSON, 1994; DOBSON; WILSON, 1992; DORTBUDAK et al., 2001a, 2001b; IVANOV et al., 2000; JACKSON et al., 1996, 1999; KOMERICK; HOPPER; WILSON, 1997; KOMERICK; WILSON, 2002; PHOENIX et al., 2003; SEAL et al., 2002; SEGUNDO, 2002; SILBERT et al., 2000; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; WILSON; DOBSON; HARVEY, 1992; WILSON; DOBSON; SAKAR, 1993; WILSON; MIA, 1993; WILSON; MIA, 1994; ZAMPIERI et al., 2003 ZANIN; BRUGNERA JR; GONÇALVES, 2002).

A fotossensibilização letal utilizando-se um laser de baixa potência em modelo de dente infectado (SEAL et al., 2002) produziu resultados similares aos estudos onde o laser de alta potência de Nd:YAG foi utilizado (BERKITEN et al., 2000b; GUTKNETCH et al., 1996; HARDEE et al., 1994; KOBAYASHI et al., 1998; MORITZ et al., 1997, 1999; MOSHNOV et al., 1995; ZAMPIERI et al., 2003).

Com relação aos corantes a escolha de um agente fotossensibilizante efetivo é de essencial importância para o sucesso da terapia em questão. Este não deve ser citotóxico, deve ser ressonante com o laser que está sendo utilizado, isto é, deve ter alta capacidade de absorção no comprimento de onda utilizado e ter grande eficiência de excitação e longa vida relativa do estado tripleto/excitado.(WAINWRIGHT, 1998; WILSON, 1994).

O efeito bactericida do agente fotossensibilizante está relacionado tanto com a sua cor como também com sua estrutura química. Os corantes que pertencem ao grupo dos fenotiazínicos são compostos básicos e heterocíclicos. Talvez sua capacidade de se combinar com determinadas regiões da célula bacteriana esteja relacionada com sua estrutura química (OKAMOTO; IWASE; MORIOKA,1992).

A distribuição dos agentes fotossensibilizantes nas células bacterianas recai sobre várias estruturas e compartimentos celulares, dependendo de suas propriedades físico-químicas. Os compostos fenotiazínicos foram encontrados em diversas estruturas celulares, tais como: membrana externa (com inativação não só da membrana como também de compostos presentes em sua estrutura como por exemplo os lipopolissacarídeos LPS, importantes fatores de virulência bacteriana), membrana plasmática, proteínas citoplasmáticas, organelas citoplasmáticas (alterando desta forma a liberação de proteases, outro importante fator de virulência bacteriana) e ácidos nucleicos. (BHATTI et al., 1997b, 1998; KOMERIK; WILSON; POOLE, 2000; WAINWRIGHT et al., 1999).

As características físico-químicas dos agentes fotossensibilizantes, tais como lipofilia e ionização são importantes na hora de sua escolha. Fatores mais direcionados com características de absorção de luz e eficiências de produção de espécies reativas são essenciais (WAINWRIGHT, 1998).

A eficiência fotodinâmica dos corantes é determinada por suas características fotofísicas, tais como potencial de redução (reação Tipo I), capacidade de formação de oxigênio singleto (reação Tipo II) e excitação ao seu estado tripleto (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001).

Tanto o corante azul de toluidina O, como o azul de metileno utilizados neste estudo fazem parte dos corantes fenotiazínicos; estes são corantes azuis como o próprio nome indica (λ_{Max} 620 a 660nm), cujos primeiros relatos de capacidade fotodinâmica ocorreram nos anos trinta (WAINWRIGHT, 1998). Tanto para Walsh (1997), Wilson, Dobson e Harvey (1992) e Okamoto, Iwase e Morioka (1992) os corantes azuis são potentes sensibilizadores para uma faixa de microrganismos e para emissões de laser na faixa vermelha do espectro visível.

Inúmeras são as dúvidas sobre a utilização de corantes em medidas terapêuticas de saúde, devido principalmente ao fato de seu potencial carcinogênico e mutagênico e a sua toxicidade às células hospedeiras. No entanto, tanto o azul de metileno como o azul de toluidina O são utilizados em procedimentos de identificação cirúrgica em concentrações razoavelmente altas (normalmente 1%) sem causar toxicidade (KOMERIK et al., 1998; SOUKOS et al., 1996). Para evitar tais questionamentos, uma alternativa segura seria a de combinar os agentes fotossensibilizantes a anticorpos contra as células alvo. (BHATTI et al., 2000).

Outra característica a ser considerada quando da escolha de agentes fotossensibilizantes se refere ao desempenho em situações clínicas como, por exemplo, a presença de biofilme dental. Neste aspecto, Wainwright (1998) afirmou que agentes fotossensibilizantes da série dos fenotiazínicos, não tem sua capacidade fototóxica alterada nem mesmo na presença de sangue. Porém,

Komerick, Wilson e Poole (2002) afirmaram que o pH do fluido em questão pode alterar a efetividade final da fotossensibilização letal.

Ainda com relação aos agentes sensibilizantes utilizados, cabe agora discutir a concentração utilizada durante a pesquisa. Muitas foram as variações encontradas na literatura no tocante às concentrações utilizadas, portanto para o presente trabalho optou-se pela maior concentração relatada sem que esta apresente efeitos nocivos aos microrganismos antes da irradiação laser (BHATTI et al., 1996, 1997a, 1997b, 2001; BURNS; WILSON; PEARSON, 1994; DOBSON; WILSON, 1992; DORTBUDAK et al., 2001a, 2001b; IVANOV et al., 2000; JACKSON et al., 1996, 1999; KOMERICK; HOOPER; WILSON, 1997; KOMERICK; WILSON, 2002; PHOENIX et al., 2003; SEAL et al., 2002; SILBERT et al., 2000; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; WAINWRIGHT et al., 1999; WILSON; MIA, 1993; WILSON; DOBSON; HARVEY., 1992; ZANIN; BRUGNERA JR; GONÇALVES, 2002). Outro fator levado em conta foram as diferenças relatadas para microrganismos portadores de membrana externa e também para fungos, onde tais microrganismos apresentavam uma resistência maior a FLL do que outros (USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001). Com base no exposto, para o presente trabalho, foi escolhida a concentração de 0,01% para ambos os corantes.

Existem ainda outros fatores que devem ser levados em conta quando da eficácia da fotossensibilização letal, como por exemplo, o tempo de pré-irradiação, a concentração do corante, a fase fisiológica da bactéria e ainda o pH do ambiente em que está sendo realizado o procedimento (BHATTI et al., 1997b; WILSON; MIA, 1993). No entanto, somente os dois primeiros serão discutidos a seguir por não utilizarem microrganismos.

O tempo de pré-irradiação (TPI) é denominado na literatura como o tempo necessário para que o agente fotossensibilizante possa penetrar nas estruturas celulares tais como: membrana externa (com inativação não só da membrana como também de compostos presentes em sua estrutura, como os lipopolissacarídeos (LPS), importantes fatores de virulência bacteriana), membrana plasmática, proteínas citoplasmáticas, organelas citoplasmáticas (alterando desta forma a liberação de proteases, outro importante fator de virulência bacteriana) e ácidos nucléicos. (BHATTI et al., 1997b, 1998; WAINWRIGHT et al., 1999; KOMERIK; WILSON; POOLE, 2000) e ser capaz de sensibilizar tais estruturas para posterior ativação pelo laser. Bhatti et al. (1997a) consideraram que quanto maior o TPI, maior a eficiência de morte bacteriana. Entretanto Bhatti et al. (1997b) relataram que não havia diferença estatisticamente significante entre 1 minuto e 15 minutos, apesar de relatarem que a captação máxima do agente fotossensibilizante azul de toluidina O ocorria após um tempo de 5 minutos. Como no caso da concentração dos agentes fotossensibilizantes, vários foram os tempos encontrados na literatura variando de um total de 30 segundos a 360 minutos (JACKSON et al., 1996; KOMERICK; HOPPER; WILSON, 1997; KOMERICK; WILSON, 2002; SEAL et al., 2002). No entanto, como intervalos de tempos muito longos tornariam a prática clínica impossível, optou-se por um tempo de pré-irradiação de 5 minutos que se considerou viável à prática clínica e que apresentou ótimos resultados na literatura (JACKSON et al., 1996; JACKSON et al., 1999; MATEVSKI et al., 2003; SEGUNDO, 2002; ZANIN; BRUGNERA JR; GONÇALVES, 2002).

Com relação à potência, tipo de emissor e densidade de energia utilizados na terapia fotodinâmica com fotossensibilização letal, na grande maioria dos trabalhos utiliza-se de um laser de He-Ne com potências que variam de 6mW a 40mW

(OKAMOTO; IWASE; MORIOKA, 1992; Dobson; Wilson, 1992; SOUKOS et al., 1996; BHATTI et al., 1996, 1997a, 1997b, 1998, 2000; KOMERICK; HOPPER; WILSON, 1997; MATEVSKI et al., 2003; SEAL et al., 2002) enquanto outros fizeram uso de um laser de arseneto de gálio alumínio ($\lambda = 660\text{nm}$) com 10-15mW (WILSON; MIA, 1993, 1994; WILSON et al., 1995, 1996).

Porém, para Walsh (1997), a utilização de um laser de He-Ne para tal finalidade é menor que a ideal, devido ao fato destes aparelhos necessitarem de sistemas ópticos e fontes de energia mais complexas. Para Walsh, a utilização de um laser de semiconductor diodo de arseneto índio gálio fósforo (laser de InGaAIP $\lambda = 685\text{nm}$) ou fosforeto de índio gálio alumínio (InGaAIP), que geram comprimentos de onda semelhantes aos do laser de He-Ne seriam ideais, devido ao seu menor custo, maior eficiência e maior versatilidade.

Em face do exposto optou-se pela utilização de um laser de diodo de InGaAIP (laser de arseneto de índio gálio fósforo), por suas características de comprimento de onda serem compatíveis às dos corantes utilizados.

A densidade de energia da luz empregada é um fator de extrema relevância quando da utilização da terapia fotodinâmica com finalidade antimicrobiana, onde segundo Bhatti et al. (1997); Matevski et al. (2003) e Okamoto, Iwase e Morioka, (1992) quanto maior a densidade de energia utilizada maior será a morte microbiana observada. Novamente esbarra-se no fator tempo, onde a dose de energia liberada em um aparelho laser é diretamente proporcional ao tempo de irradiação. A revisão de literatura relata tempos de irradiação superiores há 10 minutos (OKAMOTO; IWASE; MORIOKA, 1992; PHOENIX et al., 2003).

Claro está que ao utilizar um aparelho laser com potência média de 35mW atinge-se doses de energia superiores, com tempos de irradiação menores. Portanto

com base nos trabalhos de Segundo em 2002 (tempo de irradiação de 3 minutos), Seal et al. (2002) (tempo de irradiação de 60 a 600 segundos), Wilson e Mia (1993) (tempo de irradiação de 4 minutos), Burns, Wilson e Pearson (1994) (tempo de irradiação de 15 a 300 segundos) e Wilson e Mia (1993) (tempo de irradiação de 80 segundos), foi selecionado o tempo de 3 minutos de irradiação, pois está próximo aos ideais relatados pelos trabalhos citados e gerando uma dose de energia de $2228,5 \text{ J/cm}^2$ muito superior a qualquer densidade de energia relatada neste trabalho.

Com sua capacidade antimicrobiana testada por muitos pesquisadores, resta ainda avaliar a aplicabilidade clínica da fotossensibilização letal como, por exemplo, na endodontia, onde tal seria de grande valia devido ao seu baixo custo em relação aos aparelhos de laser de alta potência encontrados no mercado e aos resultados encontrados na literatura (BHATTI et al., 2000; KOMERICK; HOPPER; WILSON, 1997; USACHEVA; TEICHERT; BIEL, 2001; SEAL et al., 2002; SEGUNDO, 2002; SILBERT et al., 2000; WALSH, 1997).

O maior obstáculo encontrado para utilização na prática clínica é a possibilidade de manchamento dos dentes pelos agentes fotossensibilizantes utilizados, que em sua grande maioria das vezes são corantes, comprometendo desta forma a estética dental do elemento em tratamento.

O modelo experimental foi realizado em dentes incisivos centrais superiores humanos extraídos com alto grau de integridade, constituindo assim, grupos dentais mais homogêneos, visto que essa é a proposta que mais se aproxima da realidade clínica, além de serem dentes intimamente relacionados com o fator estético.

No entanto, devido à importância estética do grupo dental selecionado, a obtenção de espécimes com coroa íntegra torna-se de extrema dificuldade onde em

sua grande maioria os espécimes obtidos apresentavam restaurações extensas e ou grande destruição coronária, o que impediria a realização de tal experimento.

Desta forma, optou-se pela presente metodologia por propiciar a avaliação de leitura em três grupos, utilizando-se dos mesmos espécimes. A avaliação da alteração cromática foi feita através da diferença dos valores de K, obtidos em três tempos diferentes. É importante frisar que os espécimes utilizados, num total de vinte, foram divididos aleatoriamente em grupos de dez espécimes, respectivamente ao corante a ser utilizado (azul de metileno e azul de toluidina O).

Os grupos experimentais C (corantes em solução a 0,01%), grupo E (corantes na formulação do creme de Endo-PTC) e grupo CE (grupo com irrigação final com endo-PTC e dakin por quinze minutos) apresentavam então dez espécimes.

A seleção dos corantes recaiu sobre o azul de metileno e de orto toluidina em virtude da larga aplicação na área da saúde. Os respectivos corantes foram então manipulados, em farmácia de manipulação, para se obter as concentrações desejadas. Outro fator importante foi a utilização dos corantes associados ao creme de Endo-PTC onde sua concentração deveria permanecer inalterada quando adicionada a substância auxiliar. Desta forma, como no primeiro caso, a substância auxiliar de PTC foi manipulada mantendo a mesma concentração do corante na sua composição.

O preparo químico-cirúrgico foi realizado valendo-se de cinco instrumentos acima do inicial que se apresentou justo no canal. Sua mensuração foi realizada de tal forma, que o comprimento real de trabalho recaí-se um milímetro aquém do ápice radicular.

Em relação às substâncias químicas utilizadas durante a fase de preparo do canal radicular, optou-se pela associação do creme de Endo-PTC e hipoclorito de sódio a 0,5% (Líquido de Dakin), uma vez que este apresenta boa tolerância tecidual, ação anti-séptica e baixa tensão superficial, assim sendo o creme de Endo-PTC foi neutralizado pelo uso da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante toda a instrumentação, buscando desta forma índices de permeabilidade dentinária favoráveis.

Essas substâncias têm como missão remover restos orgânicos, auxiliar na ação dos instrumentos, impedir a deposição da sujidade, além de ter ação antimicrobiana. Terminada a fase de preparo, os espécimes foram irrigados com solução final de EDTA-T com objetivo de remover o magma dentinário residual (PAIVA; ANTONIAZZI, 1993; GAVINI, 1993).

Para a avaliação cromática optou-se por três tempos experimentais: após o PQC (L0), imediatamente após a aplicação do corante e da irradiação laser (L1) e dez dias depois, pois este é o tempo médio que ocorre no dia a dia da prática clínica, entre as sessões de cirurgia de acesso e obturação do canal radicular.

Em relação ao método de leitura selecionado, optou-se pela utilização do método digital em contrapartida ao espectrofotométrico, devido ao fato deste último, apesar de fornecer alta precisão na avaliação cromática, exigir treinamento prévio, ser de difícil manuseio e apresentar alto custo.

O presente experimento se refere à avaliação da alteração cromática dental, quando da utilização de fotossensibilizadores em endodontia, ou seja, se ela ocorre ou não, e se pode ser revertida pelo protocolo endodôntico tradicional.

Outro motivo pelo qual a metodologia aqui utilizada foi escolhida, foi a facilidade da obtenção das fotos, instantes após a metodologia experimental ser empregada e somente depois, através do programa de tratamento de imagens colher os dados que podem ser revisados a qualquer momento, pois as fotos podem ser armazenadas digitalmente, através do software Adobe Photoshop 7.0. (Carvalho 2002)

O sistema RGB: red, green e blue, utiliza a três faixas de maior sensibilidade das células cone do olho humano onde nota-se o azul ($\lambda = 430\text{nm}$), verde ($\lambda = 540\text{nm}$) e vermelho ($\lambda = 630\text{nm}$). No entanto, para a leitura da alteração cromática, além dos valores de RGB é possível também, através da metodologia aplicada, avaliar a alteração cromática em 256 tons de cinza, além do preto e do branco (valor de K) onde temos que 0 % = branco e 100 % = preto, podendo desta forma averiguar se o dente escureceu ou não, e a que nível houve o escurecimento.

O condicionamento dentinário alcançado com o uso de substâncias químicas auxiliares favorece a penetração do agente fotossensibilizante, simulando assim sua ação em profundidade na dentina contaminada. Desta forma, ao se avaliar a alteração cromática promovida pelos agentes fotossensibilizadores, deve-se ter em mente que, quanto maior for a infiltração do corante, maior será o grau de manchamento dental percebido na face vestibular do elemento dental.

Portanto, para os grupos C e CE, onde os corantes foram utilizados em solução, claro está que estes apresentem um maior grau de manchamento dental em relação ao grupo E (creme), diminuindo assim sua penetração em profundidade na dentina condicionada.

Já em relação às diferenças encontradas nos valores de K entre os grupos com os corantes azul de toluidina O e azul de metileno, cabe aclarar que devido ao

maior peso molecular do corante azul de metileno em relação ao do azul de toluidina O, ou seja, por este apresentar uma molécula maior ($M= 373,9$) que a do azul de toluidina O ($M= 305,83$), este apresenta uma maior dificuldade em percolar pelo sistema de canalículos dentinários, provocando desta forma uma menor alteração cromática.

Em uma análise exploratória das médias das porcentagens de K onde L1-L2 é a diferença entre os tempos logo após a irradiação e dez dias após e L2-L0 a diferença entre os tempos dez dias após e inicial, nota-se que para o grupo L, as médias foram de 1,3% para 2,3% com o corante azul de metileno e de 0,3% para 3,1% com o corante azul de toluidina O, e para o grupo CE de 0,0% para 2,4% com o azul de metileno e de 0,1% para 1,2% com o corante azul de toluidina O, o que indica não só um aumento no valor de K inicial como também a não remissão deste valor após dez dias, com especial atenção para o último grupo onde a diferença L1-L2 para ambos os corantes foi de 0% para 19 dos 20 espécimes utilizados. Diferentemente para o grupo E (corante na formulação do Endo-PTC) que apresentou uma média de 2,4% (L1-L2) para 0,2% (L2-L0) para o corante azul de metileno e de 1,4% para 0,2% para o azul de toluidina, onde em 17 dos vinte espécimes utilizados apresentaram diferença da média de L2-L0 igual a 0%, fato este que comprova a assertiva acima mencionada,

A análise comprobatória dos dados originais utilizando-se o teste de Wilcoxon com $p \leq 0,05$, mostra que para grupo L com o corante azul de metileno é estatisticamente significativa a diferença L1-L2 ($p=0,027$) como a de L2-L0 ($p=0,018$) fato que comprova uma alteração cromática relevante e que após dez dias esta alteração persistiu. Já para o corante azul de orto toluidina praticamente não houve diferença da leitura L1-L2 mostrando uma pequena remissão após o tempo

experimental e estatisticamente significativa para a diferença L2-L0 o que nos demonstra uma alteração cromática relevante para o fotossensibilizador em questão.

No grupo CE nota-se uma resposta semelhante para ambos os corantes, onde se obteve valor de p igual a 1 (para o corante metileno) o que significa um desvio padrão igual a zero demonstrando assim uma manutenção do valor de K após dez dias.

Em contrapartida no grupo E, tanto para o azul de metileno como para o azul de toluidina foram observadas diferenças estatisticamente significantes para a diferença L1-L2 ($p = 0,007$ e $0,011$ respectivamente), ou seja houve uma alteração no valor de K, porém, as diferenças das médias de L2-L0 para ambos os corantes foram de p igual a $0,157$ e p igual a $0,317$ respectivamente para o azul de metileno e azul de toluidina.

Nestes termos, a proposta metodológica da avaliação da alteração cromática dos espécimes submetidos a FLL foi apropriada, uma vez que foi observada a alteração cromática de todos os espécimes utilizados.

Entretanto, considerando-se ser esse o primeiro experimento sobre a FLL, que discute a repercussão sobre a alteração cromática de coroas submetidas à terapia tradicional, julga-se necessário estudo de novos métodos para a aplicação na prática clínica diária.

Finalizando, cumpre ressaltar a necessidade eminente de desenvolvimento de novos experimentos que possam aprimorar o protocolo de aplicação clínica com vistas ao controle da alteração cromática e métodos efetivos que resultem na remoção do fotoativador durante a execução da prática endodôntica.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente experimento foi possível concluir que:

- Com base no projeto experimental que executou a técnica endodôntica tradicional, todos os corantes fotoativadores testados, alteraram os valores de K .
- A análise exploratória das porcentagens de K permitiu observar que os espécimes dos Grupos Metileno E e Toluidina E foram os que apresentaram menores alterações nos valores de L2 - L0, ambos 0,2%.
- Na análise comprobatória dos resultados de alteração cromática pelos valores de K os resultados dos espécimes dos Grupos Metileno E e Toluidina E na interação L2 - L0 não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.
- Dos protocolos aplicados, o fotoativador associado ao Endo-PTC foi o que produziu a menor alteração cromática tendo como parâmetro as condições originais da coroa com base nos valores de K.

REFERÊNCIAS¹

Almeida-Lopes L. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. [Dissertação de Mestrado] São José dos Campos: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 1999.

Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endod J* 1990;23(1):20-7.

Arisu HD, Bala O, Alimzhanova G, Turkoz E. Assessment of morphological changes and permeability of apical dentin surfaces induced by Nd:Yag laser irradiation through retrograde cavity surfaces. *J Contemp Dent Pract* 2004;5(2):102-13

Bachman L, Strefezza C, Zezzel D, Eduardo CP. Alternative procedure for laser irradiation in endodontic therapy. In: 7^o International Congress on Laser in Dentistry; 2000;Brussels:5.

Baugh CL, Clark JB. Photodynamic response in bacteria. *J Gen Physiol* 1958;42(5):917-23.

Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In Vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strain into human dentinal tubules. *J Endod* 2000a;26(4):236-9.

Berkiten M, Berkiten R, Okar I. Comparative evaluation of antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation in root canals and dentinal tubules. *J Endod* 2000b;26(5):268-70.

Bhatti M, Mac Robert A, Meghji S, Herderson B. Uptake and cellular distribution of light activated antimicrobial agent by *Porphyromonas gingivalis* [resumo IADR n.133]. *J Dent Res* 1997a;76(5):1035.

Bhatti M, Mac Robert A, Herderson B, Shepherd P, Cridland J, Wilson M. Antibody-targeted lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(10):2615-8.

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

Bhatti M, Mac Robert A, Meghji S, Herderson B, Wilson M. Effect of dosimetric and physiological factors of the lethal photosensitization of Phorphyromonas gingivalis. Photochem Photobiol 1997b;65(6):1026-31.

Bhatti M, Mac Robert A, Meghji S, Herderson B, Wilson M. Study of uptake of toluidine blue O by Phorphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization. Photochem Photobiol 1998;68(3):370-6.

Bhatti M, Sean PN, Mac Robert A, Herderson B, Shepherd P. Identification of photolabile outer proteins of Phorphyromonas gingivalis. Curr Microbiol 2001;43:96-9.

Bhatti M, Wilson M, Mac Robert A, Meghji S, Herderson B. A study of the susceptibility of Phorphyromonas gingivalis to a light activated antimicrobial [resumo IADR n. 65]. J Dent Res 1996;75(5):1138.

Brugnera Jr A, Pinheiro ALB. Lasers na odontologia. São Paulo: Pancast;1998.

Brugnera Jr A, Villa RG, Genovese WJ. Laser na odontologia. São Paulo: Pancast;1991.

Brugnera Jr A, Zanin F, Barbin EL, Spano JC, Santana R, Pecora JD. Effects of Er:YAG and Nd:YAG laser irradiation on radicular dentine permeability using different irrigating solutions. Lasers Surg Med 2003;33(4):256-9.

Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Killing of cariogenic bacteria by light from a gallium aluminium arsenide diode laser. J Dent 1994;22(5):273-8.

Burns T, Wilson M, Pearson GJ. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. J Med Microbiol 1993;38(6):401-5.

Carvalho BCF. Avaliação da eficácia do clareamento exógeno sobre a dentina realizado pela técnica por ativação química comparada com a técnica por ativação pelo laser de diodo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: IPEN-USP;2003.

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

Chomette G, Auriol M, Zeitoun R, Mousques T. Effet du soft-laser sur le tissu conjonctif gingival II – Effet sur la cicatrisation. Etude en microscopie optique, histoenzymologie et microscopie électronique. *J. Biol. Buccale* 1987;15(1):51-57.

Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:142-9.

D'Ercole S, D'Arcangelo C, Catamo G, Prosperi GD, Tripodi D, Pasquantonio G, et al. Microbiological study and scanning electron microscopic analysis of root canal wall dentin following pumped Diodium Nd:YAG laser irradiation. *New Microbiol* 2004;27(1):55-63.

De Souza GR. Avaliação radiográfica da reparação óssea em lesões perirradiculares de elementos dentários submetidos a radiação com laser de baixa intensidade de $\lambda=904\text{nm}$. [Dissertação de Mestrado Profissionalizante]. São Paulo: IPEN-FOUSP;2001.

Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low power laser. *Arch Oral Biol* 1992;37(11):883-7.

Donato AC, Boraks S. Laser clínico - aplicações práticas em odontoestomatologia. São Paulo: Robe;1993.

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

Dortbudak O, Haas R, Berhart T, Matejka M. Photodynamic therapy for bacterial reduction of periodontal microorganisms. *J Oral Laser Applicat* 2001;1(2):115-8.

Estrela C, Figueiredo JAP. ENDODONTIA: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 1999.

Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times closure. *Scand J Dent Res* 1982;90(2):134-44.

Folwaczny M, Mehl A, Jordan C, Hickel R. Antibacterial effects of pulsed Nd:YAG laser radiation at different energy settings in root canals. *J Endod* 2002;28(1):24-9.

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; 1993.

Gekelman D, Prokopowitsch I, Eduardo CP. In vitro study of the effects of Nd:YAG laser irradiation on the apical sealing of endodontic fillings performed with and without dentin plugs. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20(3):117-21.

Girotti AW. Photobiology school. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochem Photobiol* 1990;51(4):497-509.

Goodis HE, White JM, Marshall SJ, Marshall GM, Moskowitz E. Root canal preparation in endodontics: Conventional vs Laser method. *Spie* 1992;1643:412-22.

Gutknecht N, Behrens VG. Die bearbeitung der wurzelkanalwände mit dem Nd:YAG laser. *Zahnärztl Rundsch Zahnärztl Reform* 1991;100(10):748-55.

Gutknecht N, Behrens VG. The Nd:YAG laser as an aid to root canal obturation. 79th Annual World Dental Congress of FDI 1991;275-80.

Gutknecht N, Kaiser F, Hassan A, Lampert F. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14(1):7-11.

Haapasalo MPP. Black pigmented Gram negative anaerobes in endodôntica infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6(213):213-7.

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

Harashima T, Takeda FH, Kimura Y, Matsumoto K. Effect of Nd:YAG laser irradiation for removal of intracanal debris and smear layer in extracted human teeth. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15(3):131-5.

Hardee MW, Miserendino L, Kos W, Walia H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. *J Endod* 1994;20(8):377-80.

Honmura A, Ishil A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. *Lasers Surg Med* 1993;13(4):463-9.

Honmura A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med* 1992;12(4):441-9.

Ito T. The dependence of photosensitizing efficacy of acridine orange and toluidine blue on the degree of sensitizer-cell interaction. *Photochem Photobiol* 1980;31(6):565-70.

Ivanov KN, Titorenko VA, Shoub GM, Lepilin AV, Ovichinnikov IS, Mischenko OS, et al. Photodynamic action of laser radiation and methylene blue on some opportunistic microorganisms of oral cavity. *Lasers Dent* 2000;39(10):30-4.

Jackson Z, Mac Robert AJ, Henderson B, Meghji S, Wilson M. Killing of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* using a light activated antimicrobial agent. *Lasers Med Sci* 1999;14:150-7.

Jackson Z, Mac Robert AJ, Henderson B, Meghji S, Wilson M. Susceptibility of *Candida albicans* to a light activated antimicrobial agent [resumo IADR n 64]. *J Dent Res* 1996;75(5):1137.

Karu T. Photobiology of low power laser effects. *Health Phys* 1989;56(5):691-704.

Khan A, Kham FR, Khan W, Matsumoto W. Effects of laser treatment on root canal of human teeth. *Endod Dent Traumatol* 1997;13:139-45.

Kimura Y, Yamazaki R, Goya C, Tomita Y, Yokoyama K, Matsumoto K. A comparative study on the effects of three types of laser irradiation at the apical stop and apical leakage after obturation. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(9):261-6.

Kipioti A, Nakov M, Legakis N, Mitsis F. Microbiological findings of infected root canals and adjacent periodontal pockets in teeth with advanced periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984;58(2):213-20.

Kiryu T, Hoshino E, Iwaku M. Bacteria invading periapical cementum. *J Endod* 1994;20(4):169-72.

Koba K, Kimura Y, Matsumoto K, Takeuchi T, Ikarugi T, Shimizu T, et al. Pulsed Nd:YAG laser application to one-visit treatment of infected root canals in dogs: A histopathological study. *J Clin Laser Med Surg* 1998;16(4):217-21.

Komerick N, Hopper C, Wilson M. Lethal photosensitization of mucositis-associated bacteria [resumo IADR n 43]. *J Dent Res* 1997;76(5):1024.

Komerick N, Speight P, Curnow A, Postle-Hacon M, Wilson M, Hopper C. The effect of photodynamic therapy on rat buccal mucosa [resumo IADR n 978]. *J Dent Res* 1998;77:754.

Komerick N, Wilson M. Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. *J Appl Microbiol* 2002;92:618-23.

Komerick N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol* 2000;72(5):676-80.

Kurumada F. A study on the application of Ga-As semiconductor laser to endodontics. The effects of laser irradiation on the activation of inflammatory cells and the vital pulpotomy. *Ohu Daigaku Shigakushi* 1990;17(3):233-44.

Lage-Marques JL, Eduardo CP, Matsumoto K. Study of microscopic changes of apical and intracanal surface after laser irradiation. *J Clin Laser Med Surg* 1995;13(3):113-5.

Lan WH. Temperature elevation the root surface during Nd:YAG laser irradiation in the root canal. *J Endod* 1999;25(3):155-6.

Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stherling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS, et al. Microorganisms isolated from root canals presentig necrotic pulp and their drug succptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(2):100-5.

Lee BS, Lin CP, Lin FH. Ultrastructural changes on human dentin after irradiation by Nd:YAG laser. *Lasers Surg Med* 2002;30:246-52.

Maldonado EP, Ribeiro MS, Zezzel DM. Interação da luz laser com tecidos biológicos. São Paulo; 2000 [Apostila de curso: IPEN/FOUSP].

Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. New trends in photobiology (invited review) Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobiol drugs. *J Photochem Photobiol B* 1990;5(3-4):281-93.

Matevisk D, Weersink R, Tenenbaum HC, Wilson B, Ellen RP, Lépine G. Lethal photosensitization of periodontal pathogens by a red-filtered Xenon-lamp in vitro. *J Periodont Res* 2003;38:428-35.

Matsumoto K, Nagayama TA. Morfological study on the enamel and dentin irradiated by pulsed Nd:YAG laser (at laser 300). In: 3rd International Congress on Laser Dentistry, Salt Lake City:6-8.

Meyer-Betz e. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderen Derivate des Blut Gallenfarbstoffs. *Arch Dtsch Klin Med* 1913;112:476.

Mezawa S, Iwata K.; Naito K, Kamogawa H. The possible effect of soft-laser irradiation on heat nociceptors in the cat tongue. *Arch Oral Biol* 1988;33(9):693-4.

Moritz A, Doertbudak O, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Sper W. Nd:YAG laser irradiation of infected root canals in combination with microbiological examinations. *J Am Dent Assoc* 1997;128(11):1525-30.

Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Jokalitsch S, Kluger W, Wernish J, et al. The bactericidal effect of Nd:YAG and Er:YAG laser irradiation in the root canal: an in vitro comparison. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(4):161-4.

Moshnov J, Ørstravik D, Yamaushi S, Pettiette M, Trope M. Nd:YAG laser irradiation in root canal wall disinfection. *Endodo Dent Traumatol* 1995;11(5):220-4.

Okamoto H, Iwase T, Morioka T. Dye-mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surg Med* 1992;12(4):450-8.

Oldham TC, Phillips D. Flash photolysis of sensitizers in microbes. *J Phys Chem B* 1999;103(43):9333-49.

Ørstavik D, Pitt Ford TR. *Essential Endodontology*. London: Blackwell Science; 1998.

Paardekooper M, De Bruijne A, Van Stevenick J, Van Den Broek PJ. Intracellular damage in cells caused by photodynamic treatment with toluidine blue. *Photochem Photobiol* 1995;61(1):84-9.

Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia; bases para a prática clínica*. São Paulo: Artes Médicas; 1993.

Pesce, HF. Contribuição ao estudo atual da questão da etiopatogenia dos dentes despolpados e seu provável papel como foco primário de infecção [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1979.

Peters LB, Wesselinj PR, Buijs JF, Winkelhoff A. Viable bacteria in root canal dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001;27(2):76-81.

Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:17-22.

Policard A. *Compt Rend Séan Mem Soc Biol.* 1924;91:1414-23.

Raab OZ. Ueber die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. *Z Biol* 1900;39:524-46.

Sakar S, Wilson M. Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 1993;28(3):204-10.

Schoop U, Kluger W, Moritz A, Nedjelic N, Georgopoulos A, Sperr W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med.* 2004;35(2):111-6

Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K. An in vitro efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals *Int Endod J* 2002;35(3):268-74.

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(1):10-9.

Segundo ASG. Laser em baixa intensidade associado à fotossensibilizador para redução bacteriana intracanal comparado ao controle químico [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: IPEN-USP; 2002.

Senda A, Gomi A, Tani T, Yoshino H, Hara G, Yamagushi M, et al. A clinical study on "soft laser 632", a He-Ne low energy medical laser. 1st report: the effects in relieving pain just after irradiation. *Aichi Gakuin Daigaku Shigakkai Shi* 1985;23(4):773-80.

Silbert T, Bird PS, Milburn GJ, Walsh LJ. Disinfection of root canals by laser dye photosensitization [resumo IADR]. J Dent Res 2000;79:569.

Silva LX. Avaliação *in vitro* do efeito da irradiação do laser de Nd:YAG na permeabilidade dentinária, após o preparo do canal radicular, tendo como fonte de variação a substância química auxiliar [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2000.

Silva NMM, Cecchini RCM, Eduardo CP. Aplicações clínicas do “soft laser” em Odontologia. Rev Paul Odontol 1992;14(4):30-2.

Silveira LB. Verificação do comportamento dos mastócitos na parede não-mineralizada da bolsa periodontal supra-óssea submetida a radiação laser de baixa intensidade. [Dissertação de Mestrado Profissionalizante]. São Paulo: IPEN-FOUSP;2000.

Siqueira Jr JF, De Uzeda M, Fonseca MEF. A scanning electron microscopic evaluation of *in vitro* dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. J Endod 1996;22(6):674-6.

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

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Bacteroides forsythus in Primary Endodontic Infections as Detected by Nested PCR. J Endod 2003;29(6):390-3

Siqueira Jr, JF, Rôças IN, Souto, RB, De Uzeda, M, Colombo, AP. *Actinomyces* Species, Streptococci, and *Enterococcus faecalis* in Primary Root Canal Infections. J Endod 2002;28(3):168-72.

Soukos N, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and Streptococcus sanguis evaluated *in vitro*. Lasers Surg Med 1996;18(3):253-9.

Stabholz A, Khauat A, Ravanshad S, McCarty DW, Neev J, Mahmoud T. Effects of Nd:YAG laser on apical seal of teeth after apicectomy and retrofill. J Endod 1992;18(8):371-5.

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

Sundqvist G. Association between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992b;7(5):257-62.

Tanji EY, Gouw-Soares SC, Eduardo CP. Mev de canais radiculares irradiados com Er:YAG e Nd:YAG lasers. In: 15ª reunião da SBPqO;1998;Aguas de São Pedro:47.

The Merck Index – an encyclopedia of chemicals and drugs. Merck & Co, Inc Rahway. New Jersey USA.

Thilo BE, Baehni P, Holtz J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. *J Endod* 1986;12(5):202-5.

Thwe TT, Kato J, Hashimoto M, Nagai Y, Hashimoto H. Pulp reaction after pulpotomy with He-Ne laser irradiation. In: International Congress on Lasers in Dentistry 4;Singapore 1994;6-10;Abstracts of papers. Singapore, 1994;108. [resumo].

Tiphlova O, Karu T. Role of primary photoacceptors in low power laser effects: action of He-Ne laser radiation on bacteriophage T4-Escherichia coli interaction. *Lasers Surg Med* 1989;9(1):67-9.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against Gram positive and Gram negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29:165-73.

Villa RG, Brugnera Jr A, Aun CE. Estudo histológico da atuação do laser de He-Ne na neoformação dentinária em polpas de ratos. In: 5ª Reunião da SBPqO;1988;Pirassununga:9;215.

Von Tappeiner H. Ueber die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien nach Versuchen von O Raab. *Munch Med Wochenschr* 1900;47:5-7.

Wainwright M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. *Chem Soc Rev* 1996;25(5);351-9.

Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42(1):13-28.

Wainwright M, Phoenix DA, Gaskell M, Marshal B. Photobactericidal activity of methylene blue derivates against vancomycin –resistant *Enterococcus* spp. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:823-5.

Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DRA, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;19(1):75-80.

Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry, Part 2, Hard tissue applications. *Aust Dent J* 1997;42(5):302-6.

Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol* 1993;75(4):299-306.

Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int Dent J* 1994;44(2):181-9.

Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol* 1995;78(5):569-74.

Wilson M, Burns T, Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent. *J Antimicrob Chem* 1996;37(2):377-81.

Wilson M, Dobson J, Harvey W. Sensitization of oral bacteria to killing by low power laser radiation. *Curr Microbiol* 1992;25(2):77-81.

Wilson M, Dobson J, Sakar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low power laser. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8(3):182-7.

Wilson M, Mia N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low power laser light. *J Oral Pathol Med* 1993;22(8):354-7.

Wilson M, Mia N. Effect of environmental factors on the lethal photosensitization of *Candida albicans* in vitro. *Lasers Med Sci* 1994;9(2):105-9.

Yamaguchi M, ITO, M.; Miwata T, Horiba N, Matsumoto T, Nakamura H, et al. Clinical study on the treatment of hypersensitive dentin by Ga-Al-As laser diode using a double blind test. *Aichi Gakuin Daigaku Shigakkai Shi* 1990;28(2):703-7.

Yilmaz S, Kuru B, Noyan U, Argun D, Kadir T. Effect of gallium arsenide diode laser on human periodontal disease: A microbiological and clinical study. *Lasers Surg Med* 2002; 30:60-6.

Zampieri MJP, Cogo JC, Genovese WJ, Barbosa AD. Ação bactericida da terapia fotodinâmica (AsGaAl) sobre bactérias *St mitis* *St sanguis* : *in vitro*. Rev Bras de Implant 2003;9(2):16-7.

Zanin IC, Brugnera Jr A, Gonçalves RB. Aplicação da terapia fotodinâmica na descontaminação bacteriana. Revista da Ass Paul Cir Dent 2002;56 Supl:7-11.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética.**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER nº 156/02
Protocolo 178/02**

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Efeito de fotoativadores utilizados na irradiação laser intracanal**", de responsabilidade do pesquisador **Leonardo Gonçalves**, sob orientação do Professor Doutor **José Luiz Lage Marques**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios referentes ao andamento da pesquisa em 09 de fevereiro de 2003 e em 09 de agosto de 2003. Ao término da pesquisa, cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 09 de agosto de 2002


Prof. Dra. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues
Coordenadora do CEP-FOUSP