



BR0645450

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

INIS-BR--4031

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO BACTERIANA EM CONDUTO
RADICULAR INFECTADO E IRRADIADO COM
LASER DE DIODO ESTUDO *IN VITRO***

CLAUDIA AMARAL RABELLO DE MELLO RADAELLI

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
Profissional na área de Lasers em
Odontologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Sheila C. Gouw Soares (FOUSP)

Co-orientadora:

Profa. Dra. Denise Maria Zezell (IPEN)

**São Paulo
2002**





**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE
LASERS EM ODONTOLOGIA**

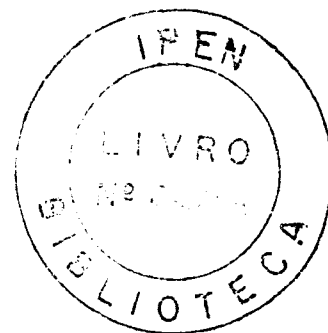


**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO BACTERIANA EM CONDUTO RADICULAR
INFECTADO E IRRADIADO COM LASER DE DIODO
ESTUDO *IN VITRO***

CLÁUDIA AMARAL RABELLO DE MELLO RADAELLI

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Mestre
Profissional na área de lasers
em Odontologia

SÃO PAULO
2002



Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO BACTERIANA EM CONDUTO RADICULAR
INFECTADO E IRRADIADO COM LÁSER DE DIODO
ESTUDO *IN VITRO***

CLAUDIA AMARAL RABELLO DE MELLO RADAELLI

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre Profissional na área de Lasers em
Odontologia**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Shella C. Gouw Soares (FOUSP)

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Denise Maria Zezell (IPEN)

SÃO PAULO

2002

DEDICATÓRIA**A DEUS**

por iluminar-me e proporcionar-me força e determinação para vencer todos os obstáculos que surgiram no caminho, permitindo-me vislumbrar novos horizontes.

Ao AMOR DA MINHA VIDA,

meu marido **Ricardo**. Sem seu amor, apoio, garra e paciência nas horas difíceis, seria impossível atingir mais esta conquista. Meu eterno amor e reconhecimento.

Aos meus pais MARCOS E SEMÍRAMIS,

muito obrigado pelo amor, carinho, dedicação e pelo maior presente vocês puderam me ofertar, o CONHECIMENTO. Espero ter conseguido compensar todo seu sacrifício e luta. Sem vocês meu sonho não seria realidade.

À minha querida Vó Lectícia,

a pessoa mais sábia e bondosa que conheci na vida. Exemplo de caráter e virtude.

Aos meus irmãos **Semíramis, Antônio Henrique,**
ao meu sogro **Aldo** e toda **minha família,** muito
obrigada pela **colaboração** e por **compreenderem**
minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

À minha querida Orientadora **Professora Dr^a Sheila C. Gouw-Soares**, pela amizade, orientação, apoio e paciência. Gostaria de demonstrar toda minha admiração e gratidão pela pessoa que é, dotada de brilho e inteligência ímpar, extremamente competente, exemplo de seriedade, caráter, profissionalismo, ética, e acima de tudo senhora de um enorme coração. Quero poder humildemente reafirmar meu apreço e reconhecimento por tudo. Muito obrigada.

À minha Co-Orientadora **Professora Dr^a Denise Maria Zezell**, exímia pesquisadora de acurada visão e inteligência. Agradeço por todo o conhecimento transmitido e pelo apuro nos conceitos relativos à sua especialidade que integram este trabalho.

À Colaboradora **Professora Dr^a Silvana Cai**, antes de tudo minha querida amiga de todas as horas, meu mais profundo reconhecimento e agradecimento pelo desprendimento em ofertar-me seu laboratório no ICB e suas dedicadas horas de incomparável conhecimento científico, auxiliando-me durante a parte experimental e em todo o período no qual este trabalho foi escrito.

À brilhante Colaboradora e dedicada **Dr^a Andréa Antunes**, amiga, fonte de sólidos conhecimentos e impressionante vocação inata para a pesquisa, incentivo forte nos momentos árdus. Pela dedicação das horas de seu precioso tempo, durante a realização deste trabalho, minha eterna amizade e o penhor de minha gratidão.

Aos **Professores Drs. Carlos Eduardo de Paula, Nilson Dias Vieira Jr. e Niklaus Ursus Wetter**, pesquisadores de extrema inteligência. Formadores de profissionais voltados à pesquisa em uma área maravilhosa: a do estudo do laser e suas aplicações.

A todos os **Professores do Mestrado Profissionalizante de Lasers em Odontologia**, muito obrigada pelos ensinamentos transmitidos de maneira que nos permitissem apreender e aplicar conhecimentos tão necessários e importantes para nosso crescimento.

A um grande e especial amigo, que foi o incentivador e conselheiro de todas as horas, **Professor Dr. Amaury Silveira**, de elevadíssimo conhecimento científico e competência profissional inquestionável. Responsável por estimular a curiosidade que me levou à ousadia de traçar esse caminho. Não tenho palavras para externar meu agradecimento: permita-me dedicar-lhe eterna amizade, gratidão e admiração.

Ao **Professor Dr. Gilson B. Sydney**, por ter me ensinado a arte da endodontia, quando eu ainda era estudante. Esta tese é fruto da evolução dos ensinamentos transmitidos em sua convivência durante a graduação, aperfeiçoamento e estágio na **Universidade Federal do Paraná – UFPR**.

À **Maria Aparecida Barbosa (Cidinha), Liliane de Souza (Lili), Sandra Regina A. Cruz** pela dedicação e pelo trabalho nos bastidores, o qual torna possível a realização de trabalhos brilhantes.

Ao **IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, à **FOUSP – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, ao **ICB – Instituto de Ciências Biomédicas**, por iniciar-me no mundo da pesquisa.

*"O único lugar onde encontramos o SUCESSO
precedendo o TRABALHO é no dicionário."*

RESUMO

AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO BACTERIANA EM CONDUTO RADICULAR INFECTADO E IRRADIADO COM LASER DE DÍODO

Cláudia Amaral Rabello de Mello Radaelli

RESUMO

Altas taxas de sucesso são obtidas na terapêutica endodôntica de polpa vitalizada. Nos casos de polpa não vital, a taxa de sucesso sofre um decréscimo devido às dificuldades em atingir a completa desinfecção do sistema de canais radiculares. Algumas bactérias, como os *Enterococcus faecalis*, são freqüentemente encontradas em casos de insucesso, devido à sua alta resistência aos tratamentos endodônticos tradicionais. Avaliou-se neste estudo a efetividade da redução bacteriana em canais contaminados, submetidos à irradiação laser de diodo em alta intensidade, associada ao emprego de um curativo contendo pasta de hidróxido de cálcio e paramonofenolcanforado. Oitenta e dois canais foram infectados *in vitro* com suspensão de *Enterococcus faecalis*, em concentração de 1×10^8 u.f.c./ml. Os espécimes foram irradiados com um laser de diodo em alta intensidade com comprimento de onda de 830nm, do modelo Opus 10. Dois parâmetros diferentes foram utilizados no modo contínuo: 3W e 2,5W, com uma fibra de 360 μ m de diâmetro em uma angulação de aproximadamente cinco graus com a superfície dentinária, durante cinco segundos em quatro aplicações, com intervalo de 20 segundos entre elas. Após a irradiação, os espécimes foram agitados no Vortex, em tubos contendo água peptonada e em seguida as diluições foram obtidas. Alíquotas das diluições foram semeadas em placas contendo o meio agar m-*Enterococcus* e incubadas para a contagem das unidades formadoras de colônias (u.f.c.). Os resultados demonstram uma significativa redução bacteriana nos grupos após a irradiação laser. Uma alta taxa de redução foi obtida imediatamente após a irradiação laser, cerca de 98,5%; 48

horas após a taxa de redução foi de 96,73% e finalmente, uma taxa em torno de 100% de redução foi obtida com a associação da irradiação laser ao curativo de demora com pasta de hidróxido de cálcio, propileno glicol e paramonofenolcanforado. Altos níveis de redução bacteriana foram alcançados utilizando os parâmetros de 3W no modo contínuo, com densidade de potência de 2,9473 KW/cm². A temperatura foi monitorada com o uso de um termopar K, posicionado no periápice dental, cuja região apresentava espessura dentinária média de aproximadamente de 1 mm. A variação máxima da temperatura foi de 7.45°C. Sob microscopia eletrônica de varredura, a superfície das amostras dos grupos controle apresentou áreas com *smear layer*, enquanto que as dos grupos irradiados com laser apresentaram aspecto liso, regular, limpo, com áreas com alterações morfológicas suaves, alternadas com algumas pequenas áreas de obliteração dos túbulos dentinários. Em alguns pontos houve fusão da massa dentinária (nos grupos com 3W). As amostras nas quais o hidróxido de cálcio foi associado, após a irradiação com o laser, apresentaram resíduos do mesmo e obliteração dos túbulos dentinários. O uso do laser de diodo em alta intensidade de 830nm, mostrou-se altamente eficiente, capaz de promover uma redução na população bacteriana constituída por *Enterococcus faecalis* em canais radiculares infectados.

ABSTRACT

ABSTRACT**ASSESSMENT OF THE BACTERIA REDUCTION IN THE INFECTED ROOT
CANAL IRRADIATED WITH DIODE LASER****Cláudia Amaral Rabello de Mello Radaelli**

High success rates are achieved in conventional endodontic treatment of vital pulp teeth. However, in cases of non-vital pulp, a decrease in the rate of success occurs due to difficulties in achieving a complete disinfection of the root canals system. Some bacteria, such as *Enterococcus faecalis*, are frequently found in cases of endodontic treatment failure due to their high resistance to the conventional endodontics treatment. The aim of this study was to evaluate the efficiency of a high power diode laser irradiation in bacterial reduction of contaminated canals associated with dressing compose by calcium hydroxide paste propylene glycol and camphorated paramonochlorophenol. Eighty-two root canals were infected *in vitro* with *Enterococcus faecalis* in a concentration of 1×10^8 CFU/ml. Specimens were high intensity irradiated with a diode laser model Opus 10, at a wavelength of 830nm. Two different parameters were employed in continuous mode: 3W and 2,5 W with a 360 μ m optical fiber at an angle of approximately 5 degrees respect to the dentine surface during 5 seconds, in 4 applications, with 20 seconds intervals among them. After these proceedings specimens were vortexed in peptone water and dilutions performed. Aliquots of the dilution were plated on m-*Enterococcus* agar, incubated, and the Colonies Forming Units (CFU) of all groups was counted. The results showed a significant reduction of bacteria on all groups after laser irradiation. A high reduction rate was achieved: 98.5% immediately after the laser irradiation; 48 hours after, the

reduction was of 96,73% and, finally, a 100% reduction was achieved through the combination of laser irradiation and a long lasting dressing of calcium hydroxide paste, propylene glycol and camphorated paramonochlorophenol. High rates of bacteria reduction were achieved using the parameter of 3W in continuous mode with the power of 2,9473 KW/cm². The temperature was monitored with a K-type thermocouple placed at the periapical point which width measured 1 mm, approximately. The maximum temperature variation was 7.45°C. Under electron microscope scanning, the control groups showed areas with *smear layer* covering the dentinal walls. The laser irradiated groups showed a smooth, uniform, clean appearance, with small areas of closed dentinal tubules without cracking alternately with areas of exposed open dentinal tubules. Some parts showed fusion of the dentinal mass (groups irradiated with 3W). In groups where calcium hydroxide was associated with laser irradiation remains were found over the irradiated surface and, in many parts, the dentinal tubules could not be observed. The use of high intensity diode laser at 830nm proved to be efficient and able to promote reduction in the *Enterococcus faecalis* population in the infected root canals.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Página

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1	INTRODUÇÃO 01
2	OBJETIVOS 04
3	REVISÃO DA LITERATURA 05
3.1	Histórico da endodontia 05
3.2	Papel das bactérias na patologia pulpar e periapical..... 09
3.3	Ação bactericida das substâncias químicas e medicações intracanal auxiliares utilizadas no preparo químico cirúrgico e como curativo de .demora 19
3.4	Profundidade de penetração das bactérias nos túbulos dentinários..... 31
3.5	Histórico do laser 34
3.6	Lasers em endodontia. 35
3.7	Interação do laser com o tecido X cuidados com aumento de temperatura.. 41
3.8	Redução microbiana com laser de diodo em endodontia 44
4	MATERIAL E MÉTODOS 47
4.1	Material..... 47

4.1.1	Características do laser de diodo de alta potência emitindo em alta intensidade Opus 10 – Opus Dent.....	47
4.2	Métodos.....	51
4.2.1	Estudo prévio do efeito térmico durante a irradiação intracanal com laser de diodo.....	51
4.2.1.a	Irradiação.....	52
4.2.2	Avaliação da redução bacteriana de canais infectados e irradiados com laser de diodo.....	55
4.2.2.1	Preparo do espécime.....	55
4.2.2.2	Preparo do inóculo bacteriano.....	56
4.2.2.3	Inoculação das amostras.....	57
4.2.2.4	Irradiação laser dos espécimes contaminados.	58
4.2.2.5	Colheita do material para cultura.....	62
4.2.2.6	Meio de cultura.....	64
4.2.2.7	Microscopia eletrônica de varredura.....	65
5	RESULTADOS	66
5.1	Do estudo prévio do efeito térmico durante a irradiação intracanal com laser de diodo.....	66
5.2	Avaliação microbiológica.....	70
5.2.1	Análise Descritiva.....	75
5.2.2	Análise Interferencial.....	83
5.2.3	Avaliação do aspecto morfológico dos espécimes em MEV.....	85
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÃO	101
8	ANEXO A: Aprovação do comitê de ética FOU SP/IPEN	102
9	ANEXO B: Principais características dos <i>Enterococcus faecalis</i>	103
10	ANEXO C: Características do laser de diodo	109
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações técnicas sobre o laser de diodo em alta intensidade Opus 10.....	50
Tabela 2 - Dados referentes à irradiação com monitoração de temperatura no terço apical com termopares.....	54
Tabela 3 - Médias dos valores obtidos durante o monitoramento do aumento da temperatura (ΔT).....	67
Tabela 4 - Grupo CN1 IM - parâmetro de 3W.....	71
Tabela 5 - Grupo CN1 48 H - parâmetro de 3W.....	72
Tabela 6 - Grupo C1 IM - parâmetro de 3W.....	72
Tabela 7 - Grupo C1 48 H - parâmetro de 3W.....	72
Tabela 8 - Grupo L1 IM - parâmetro de 3W.....	72
Tabela 9 - Grupo L1 48 H - parâmetro de 3W.....	73
Tabela 10 - Grupo L1 48 H/ Ca(OH) ₂ - parâmetro de 3W.....	73
Tabela 11 - Grupo CN2 IM - parâmetro de 2,5W.....	73
Tabela 12 - Grupo CN2 48 H - parâmetro de 2,5W.....	73
Tabela 13 - Grupo C2 IM - parâmetro de 2,5W.....	74
Tabela 14 - Grupo C2 48 H - parâmetro de 2,5W.....	74
Tabela 15 - Grupo L2 IM - parâmetro de 2,5W.....	74
Tabela 16 - Grupo L2 48 H - parâmetro de 2,5W.....	74
Tabela 17 - Grupo L2 48 H/ Ca(OH) ₂ - parâmetro de 2,5W.....	75
Tabela 18 - Valores dos corpos de prova e médias para a quantidade de u.f.c./ml....	75
Tabela 19 - Medidas descritivas para a quantidade de u.f.c./ml.....	76
Tabela 20 - Percentuais médios para a quantidade de bactérias em relação aos controles.....	78
Tabela 21 - Percentuais médios para a quantidade de bactérias em relação ao Grupo controle de ambos os parâmetros.....	79

Tabela 22 - Tabela da ANOVA para o percentual reduzido da quantidade de u.f.c./ml
(variável transformada).....84

Tabela 23 – Comparações múltiplas pelo método de Tukey para percentual reduzida
da quantidade (variável transformada). As diferenças significativas
estão demarcadas em azul.....84

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espectros de absorção dos principais cromóforos dos tecidos biológicos.....	49
Figura 3 – Laser de diodo em alta intensidade Opus 10.....	49
Figura 4 – Arranjo experimental para determinação do perfil térmico durante a irradiação no terço apical.....	52
Figura 4.1 – Esquema demonstrando o posicionamento do termopar.....	52
Figura 5 – Técnica de irradiação helicoidal ou de Gutcknecht.....	54
Figura 6 – Preparo, aferição da fibra e dos parâmetros no medidor de potência e energia.....	55
Figura 7 – Preparo do espécime.....	55
Figura 8.1 – Acondicionamento e identificação dos espécimes nos tubos eppendorf.....	56
Figura 8.2 – Acondicionamento e identificação dos espécimes nos tubos eppendorf.....	56
Figura 9 – Inóculo inicial.....	57
Figura 10.1– Espectrofotômetro: processo para obtenção da suspensão bacteriana.....	57
Figura 10.2– Espectrofotômetro: processo para obtenção da suspensão bacteriana.....	57
Figura 10.3 – Espectrofotômetro: processo para obtenção da suspensão bacteriana.....	57
Figura 11 – Inoculação do espécime.....	58
Figura 12 – Teste da turbidez.....	58
Figura 13 – Irradiação do corpo de prova.....	59
Figura 14 – Diluições seriadas.....	63
Figura 15 - Semeadura em triplicata nas placas de Petri.....	64
Figura 16 – Preparo do meio de cultura na câmara de fluxo laminar.....	64

Figura 17 – Micrografia eletrônica de varredura de espécime clivado, posicionado no stub.....	65
Figura 18A – Variação térmica referente à potência de 2,5W.....	68
Figura 18B – Variação térmica referente à potência de 2,54W.....	68
Figura 18C – Variação térmica referente à potência de 3,1W.....	69
Figura 18D – Variação térmica referente à potência de 3,6W.....	69
Figura 18E – Variação térmica referente à potência de 3,6W.....	70
Figura 19 – Colônias de <i>Enterococcus faecalis</i> em placa de Petri contendo o meio específico <i>m-Enterococcus</i> , na qual foi realizada a semeadura em triplicada a partir de diluições de um espécime pertencente ao Grupo Controle Positivo. Pode-se observar o crescimento bacteriano de alíquotas: sem diluição e nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}	71
Figura 20 – <i>Box-plot</i> para o logaritmo da quantidade de bactérias.....	77
Figura 21 – Médias para as quantidades de bactérias.....	77
Figura 22 – Médias para o percentual de quantidade de bactérias remanescentes pós irradiação em relação aos Grupos Controle Positivo.....	79
Figura 23 – Média das u.f.c./ml após contagem imediata para o Grupo 1(3W), comparando o Grupo Controle Positivo Imediato com o Laser Imediato.....	80
Figura 24 – Média das u.f.c./ml após contagem 48horas depois da irradiação para o Grupo 1 (3W), comparando o Controle Positivo 48h com o Laser 48h.....	80
Figura 25 – Valores obtidos das u.f.c/ml comparando o controle positivo 48h com os Grupos irradiados: Imediato, 48h e 48h Ca(OH) ₂ , utilizando o parâmetro de 3W.....	81
Figura 26 – Média das u.f.c/ml após contagem imediata para o Grupo 2 (2,5W), comparando o Grupo Controle Positivo Imediato com o Laser Imediato.....	81

Figura 27 - Média das u.f.c./ml após contagem 48 horas depois da irradiação para o Grupo 2 (2,5W), comparando o Controle Positivo 48 h com o Laser 48h.....	82
Figura 28 - Valores obtidos das u.f.c./ml comparando o controle positivo 48h com os Grupos Irrradiados: Imediato,48h e Ca(OH) ₂ 48h utilizando o parâmetro de 3W.....	82
Figura 29 - Micrografia eletrônica de uma das amostras pertencentes ao Grupo CN1 48h.....	85
Figura 30 - Micrografia eletrônica de uma das amostras pertencentes ao Grupo CN1 48h.....	85
Figura 31 - Micrografia eletrônica de amostra do grupo L1IM –referente ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos.....	85
Figura 32 - Micrografia eletrônica de amostra do grupo L1IM –referente ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos.....	85
Figura 33 - Micrografia eletrônica de amostra do grupo L1 48h – referente ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos.....	86
Figura 34 – Micrografia eletrônica de amostra do grupo L1 48h – referente ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos.....	86
Figura 35 - Micrografia eletrônica de amostra do grupo L1 48h Ca(OH) ₂ referente ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos.....	86
Figura 36 - Micrografia eletrônica de amostra do grupo L1 48h Ca(OH) ₂ referente ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos.....	86
Figura 37 - Micrografia eletrônica de amostra do grupo L2 48h Ca(OH) ₂ referente ao parâmetro de 2,5W, com diferentes aumentos.....	87
Figura 38 - Micrografia eletrônica de amostra do grupo L2 48h Ca(OH) ₂ referente ao parâmetro de 2,5W, com diferentes aumentos.....	87
Figura 39 – Anexo C – Representação esquemática do laser de diodo de GaAs.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alexandrita dobrada	360 nm – 430 nm
Ar ⁺	Argônio - 514,5 nm ou 488 nm
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
CT	Comprimento de trabalho
cw	continuous wave (onda contínua)
CO ₂	Dióxido de carbono - 1,06 µm
ED	Etilenodiamino
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
EDTA T	Ácido etileno diamino tetra acético e detergente Tergentol
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , e outros, e colaboradores
Er:YAG	Érbio: Ítrio-Alumínio-Granada - 2,94 µm
Er:Cr:YSGG	Érbio, Cromo: Ítrio, Escândio, Gálio, Granada – 2,78µm
Excimer	(ArF) 193 nm ou (Xe-Cl) - 308 µm
FOUSP	Faculdade de Odontologia de São Paulo
Ga-Al-As	Arseneto de Gálio Alumínio – Diodo - 620 nm a 900nm
He-Ne	Hélio-Neônio – 632 nm
Ho: YAG	Hólmio: Ítrio-Alumínio-Granada - 2,1 µm
Ho:YLF	Hólmio: Ítrio-Lítio-Flúor – 2,065 µm
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IKI	Iodine de potássio iodado
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IV	Infravermelho

LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation: amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LILT	Low Intensity Laser Teraphy, terapia com laser de baixa intensidade
log "kill"	logaritmo do número de bactérias mortas
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MO	microscopia ótica
NaCl a 0,9%	soro fisiológico
NaOCl	hipoclorito de sódio
NDP	paramonoclorofenol (2g)- associado ao fosfato de dexametasona (0,32g) veiculado em polietilenoglico + Rinosoro (solução salina estabilizada com cloreto de benzalcônio) qsp 100ml
Nd:YAG	Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada -1.064nm ou 1,064µm
Nd:YAP	Neodímio: Ítrio-Alumínio - Perovskita
NIR	infravermelho próximo
PMCC	paramonoclorofenol canforado
PRP	paramonoclorofenol (2g) veiculado em polietilenoglicol + Rinosoro (solução salina estabilizada com cloreto de benzalcônio) qsp 100ml
qsp	quantidade suficiente para
TEA	Transversally Excited Atmosphere
TSB	Tryptic Soy Broth – caldo de tripticase de soja
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius ou centígrados
cm	centímetro
cm ²	centímetros quadrados
DE	densidade de energia ou fluência
Φ	diâmetro
E	energia
F	freqüência ou taxa de repetição
Hz	hertz (Unidade de freqüência)
J	joules (Unidade de energia)
J/cm ²	joules por centímetro quadrado (Unidade de densidade de energia)
λ	lambda (Letra grega referente ao comprimento de onda)
μm	micrômetro
μl	microlitro
μl/ml	microlitro por mililitro
μs	microsegundo
mJ	milijoules
mJ/p	milijoule por pulso
ml	mililitro
mm	milímetro
mm/s	milímetro por segundo
mW	miliwatt
nº	número
nm	nanômetro
ns	nanosegundo
P	potência
pps	pulsos por segundo

s	segundo
t	tempo
u.f.c.	unidades formadoras de colônias
W	watt (unidade de potência)
W/cm ²	watt por centímetro quadrado (unidade de densidade potência)

Prefixos, símbolos e valores

Prefixo	Símbolo	Valor
tera	T	10^{12}
giga	G	10^9
mega	M	10^6
quilo	k	10^3
centi	C	10^{-2}
mili	M	10^{-3}
micro	μ	10^{-6}
nano	n	10^{-9}
ângstron	Å	10^{-10}
pico	p	10^{-12}
femto	f	10^{-15}

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A endodontia deve ser vista como uma seqüência na qual todas as etapas são importantes: da cirurgia de acesso à obturação do canal. A ruptura de uma delas pode comprometer o tratamento. Algumas fases se revestem de maior dificuldade, como a redução microbiana do sistema de canais radiculares, realizada por meio da utilização de instrumentos manuais, mecânicos, rotatórios, associados às substâncias químicas irrigantes e medicação intracanal, para promover a limpeza, à modelagem e à desinfecção do canal. Portanto, para alcançar o almejado sucesso no tratamento endodôntico todos os passos operatórios devem ser criteriosamente seguidos, permitindo a obtenção de uma obturação tridimensional e hermética do canal radicular. Na terapia endodôntica de polpa viva, os índices de tratamentos bem sucedidos são altos. No entanto, em polpa necrótica, nos dentes desvitalizados com lesões periapicais e em retratamentos, a taxa dos insucessos aumenta, muitas vezes em razão da presença de microorganismos que são os principais responsáveis pelo desenvolvimento de periapicopatias (Shovelton, 1964).

A permanência dos microorganismos no sistema de canais radiculares, pós-instrumentação pode ser atribuída à limitada capacidade que o tratamento tradicional apresenta em eliminá-los (Eduardo e Gouw-Soares, 2001a, Eduardo e Gouw-Soares, 2001b). Diversos autores relatam que o preparo químico-cirúrgico é capaz de reduzir a população microbiana em aproximadamente 50% (Behnen *et al.*, 2001), eliminando os microorganismos presentes na luz do canal e na superfície dentinária do conduto. No entanto, em profundidades da massa dentinária essa capacidade torna-se limitada (Berutti *et al.*, 1997; Gutknecht *et al.*, 2000a, Gutknecht *et al.*, 2000b), uma vez que as substâncias irrigadoras penetram aproximadamente de 80 a 220µm em profundidade (Gutierrez *et al.*, 1990).

Após o preparo e selamento do conduto, as bactérias, devido às suas propriedades de anaerobiose, podem voltar a reproduzir-se e invadir os túbulos dentinários em grande profundidade, como o *Streptococcus sanguis* que atinge 790 μ m (Perez *et al.*, 1993a, Perez *et al.*, 1993b), e o *Streptococcus mutans* que alcança áreas próximas ao cimento de 1150 μ m (Kouchi *et al.*, 1980). Alguns microorganismos podem difundir-se em até 500 μ m no interior da massa dentinária, em aproximadamente 72 horas. Haapasalo *et al.* (1987); Meryon *et al.* (1990) observaram a invasão de *Enterococcus faecalis* em dentina bovina, em até 1000 μ m, após três semanas de incubação, em seu modelo *in vitro*.

Outro fator que dificulta e por vezes impossibilita a adequada desinfecção dos canais radiculares é a complexidade anatômica do conduto, principalmente do terço apical, que permite a sobrevivência de espécies microbianas, comprometendo a reparação do tecido periapical. Algumas bactérias são extremamente resistentes às substâncias irrigadoras, à medicação intracanal, à medicação sistêmica, ao calor e são capazes de sobreviver no sistema de canais radiculares sem necessitar de interação com outras bactérias, até em pequenas densidades, podendo sobreviver mesmo após uma obturação radicular adequada, estabelecendo as infecções resistentes. Outra causa dos insucessos pode ser atribuída à presença do biofilme na superfície cementária apical, propiciando o estabelecimento de uma infecção refratária ao tratamento endodôntico tradicional (Siqueira Jr, 2001).

A eterna busca para uma adequada desinfecção dos canais contaminados ganhou nos lasers um aliado promissor, pois estes são capazes de vaporizar restos teciduais, *smear layer*, tecido de granulação, e promover a eliminação de grande parte dos microorganismos presentes no conduto e no interior da massa dentinária. Podem ainda, promover modificações estruturais e morfológicas da superfície dentinária alterando a permeabilidade por meio de obturação ou exposição dos túbulos dentinários (Gouw-Soares *et al.*, 2001a, Gouw-Soares *et al.*, 2001b, Gouw-Soares *et al.*, 2001c).

Vários estudos têm demonstrado a alta capacidade de redução bacteriana que os lasers de alta intensidade apresentam (Matsumoto, 1992; Gutknecht *et al.*, 1996a, Gutknecht *et al.*, 1996b; Gutknecht *et al.*, 1997; Moritz *et al.*, 1997a, Moritz *et al.*, 1997b; Gutknecht *et al.*, 2000a, Gutknecht *et al.*, 2000b;

Gouw-Soares, 1998; Zezell, 1999; Bachmann, 2000b; Gouw-Soares *et al.*, 2001b; Antônio, 2001; Eduardo e Gouw-Soares, 2001a, Eduardo e Gouw-Soares, 2001b; Eduardo *et al.* 2002; Folwaczny, 2002), mas o alto custo e tamanho avantajado desses equipamentos, por vezes, inviabiliza seu uso na clínica diária. O laser de diodo é considerado como um dos menos onerosos, por ser um equipamento portátil e de fácil transporte, tornando-se altamente atrativo.

O presente trabalho tem a finalidade de avaliar a capacidade de redução microbiana em canal radicular infectado utilizando o laser de diodo. Estabelecer parâmetros seguros para seu uso, minimizando e controlando os efeitos indesejáveis atribuídos às interações térmicas com os tecidos. E avaliar as alterações morfológicas produzidas na dentina intra-radicular.

OBJETIVOS

Avaliar a redução bacteriana em canais contaminados com *Enterococcus faecalis* por meio da irradiação intra-canal com o laser de diodo, utilizando dois parâmetros de potência diferentes, operando no modo contínuo, através de fibra ótica de 360µm. E verificar por meio de microscopia eletrônica de varredura a alteração morfológica da superfície dentinária do conduto irradiado com o laser de diodo.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histórico da endodontia

A endodontia empírica surgiu a partir do primeiro século. Desse século até 1910, foi conhecida como a Época do Empirismo. No século X, colocava-se ópio nas cavidades cariosas para combater a dor. No século XI, Albucasis *apud* Leonardo (1991), recomendava o uso do cautério e a endodontia era praticada empiricamente apenas buscando aliviar a dor. A endodontia era considerada como um castigo divino, cercada de diversas crendices (Leonardo, 1991).

O primeiro autor que descreveu a presença de bactérias no interior dos canais radiculares foi Antony Von Leewenhock, em 1697. Ao utilizar lentes de aumento, construindo o primeiro microscópio, observou microorganismos nos canais radiculares e descreveu pela primeira vez canalículos dentinários, (*apud* Leonardo, 1991).

Miller, em 1890, comprovou a presença de bactérias em tecido pulpar necrótico humano e a sua importância na etiologia das doenças pulpares e periapicais. Obteve culturas puras a partir de infecções mistas, detectando formas bacterianas em nível de M.O. Observou que dentes com câmara pulpar aberta possuíam uma flora microbiana diferente daqueles que apresentavam canais fechados. Afirmou que muitas das bactérias presentes nos canais radiculares são difíceis de serem cultivados isoladamente. Após esses achados iniciou-se a **Era Germicida**, na qual procurava-se um medicamento milagroso que fosse capaz de destruir todos os microorganismos de dentes despoldados e infectados. Em 1891, Walkhoff propôs o emprego do paramonoclorofenol, iniciando o período das infundáveis sessões de troca de curativos de demora, utilizando medicamentos que atuavam, por vezes, como irritantes teciduais. Em 1895 Rönteger desenvolveu o RX, e Walkhoff empregou-o pela primeira vez. Porém, apenas em 1899 foi empregado clinicamente por Kells, lançando os rudimentos da odontometria. Em 1901, Price descreveu num trabalho com imagens, uma série de tratamentos endodônticos e obturações defeituosas, recomendando o

emprego da radiografia para tratamento de dentes despulpados (*apud* Leonardo, 1991).

A partir desses dados Hunter em 1910, iniciou a pior fase da história da endodontia, dando início à **teoria da infecção focal**, que perdurou até 1928, gerando o surgimento de três grupos distintos: os radicais, os conservadores e os pesquisadores. Os radicais acreditavam piamente na teoria da infecção focal; os conservadores prosseguiram realizando tratamento endodôntico, procurando aprimorar a técnica e os pesquisadores utilizavam provas radiográficas, bacteriológicas e histológicas, na tentativa de combater as idéias dos radicais. O **ressurgimento do tratamento endodôntico** ocorreu entre 1928 e 1936. Em 1921 o paramonoclorofenol canforado foi introduzido como medicação intracanal, a cânfora é usada como veículo, e o composto contém uma alta concentração de paramonoclorofenol de aproximadamente 35%. De 1936 a 1940 houve a **consolidação da endodontia** (*apud* Leonardo, 1991).

Fish (1939) perfurou e introduziu fibras de algodão contaminadas com microorganismos presentes nos canais radiculares em maxilares de cobaias. Utilizou, como espécimes em maior parte os *Streptococcus* e *Stafilococcus* reproduzindo focos de infecção artificial. Após diferentes períodos estabelecidos, os animais foram sacrificados e cortes histológicos dos tecidos foram realizados para identificar o tipo de microorganismo, as alterações teciduais e as alterações ósseas. Observou quatro zonas: a) zona de infecção: presença de leucócitos polimorfonucleares circundando a área central de bactérias representando a infecção; b) zona de contaminação: as bactérias não ficam evidenciadas, mas ficam suas toxinas que provocam destruição celular, havendo predominância de leucócitos e alguns restos celulares; c) zona de irritação: na qual há presença de fibroblastos e osteoblastos; d) zona de estimulação: presença de fibroblastos e osteoblastos que, ao serem estimulados por toxinas altamente diluídas, iniciam a formação de tecido ósseo compacto e irregular, formando uma barreira de defesa orgânica. Esses achados foram comparados aos dos dentes despulpados e infectados, permitindo uma analogia com o foco de infecção.

O emprego do hidróxido de cálcio no canal radicular foi demonstrado pela primeira vez no Brasil por Castagnola em 1958. A partir dessa data foi usado como substância irrigadora por Truffi. Em 1960, Canoas apresentou sua experiência clínica com o emprego do hidróxido de cálcio na Conferência

“Conservação da Polpa Dentária”, durante a II Semana Internacional de Endodontia em Poços de Caldas, Minas Gerais (*apud* Leonardo, 1991).

Em 1962, Ostby após procurar um agente com ação quelante mais biológica do que os ácidos utilizados para essa finalidade, instituiu o uso do EDTA com concentração de 15% e pH neutro (7,3), o qual foi previamente testado em sua clínica durante aproximadamente 6 anos antes da publicação de sua experiência. Inicialmente o efeito do EDTA foi testado em dentes recém extraídos, por imersão e por irrigação, durante períodos de tempo variáveis. O autor avaliou em nível de microscopia, cortes por desgaste, observando áreas de extensa desmineralização nos espécimes submersos. Nos espécimes irrigados as áreas afetadas foram menores, demonstrando a capacidade autolimitante do EDTA. Na seqüência, o autor avaliou o efeito *in vivo* do EDTA em diferentes tempos, em dentes com posterior exodontia indicada. Como resultado, os espécimes apresentaram áreas de desmineralização, e o tecido pulpar remanescente que havia permanecido em contato com a solução não apresentava sinais de necrose. O EDTA não é um agente bactericida, mas pode ter efeito bacteriostático, devido a destruição dos íons metálicos necessários para o metabolismo bacteriano.

Na década de 60, a maioria das bactérias cultivadas a partir de canais radiculares era aeróbia ou anaeróbia facultativa, como o *Streptococcus α -hemoliticus*. Um grande avanço ocorreu a partir de 1970, com o desenvolvimento de técnicas de cultivo anaeróbio, permitindo o isolamento e cultivo dessas espécies. A partir de então, foi possível evidenciar estes agentes microbianos presentes na flora de canais desvitalizados e contaminados, demonstrando a predominância das bactérias anaeróbias no sistema de canais radiculares infectados. Essas infecções ocorrem onde há tecido necrótico, decorrente de um comprometimento do aporte sangüíneo, seguido de infecção por microorganismos aeróbios e facultativos que diminuem o potencial de oxidação e redução do tecido (Baumgartner *et al.*, 1991; Sundqvist, 1992a, Sundqvist, 1992b; Sydney, 1996a; Peciuliene, 2000).

Shovelton, em 1964, observou a distribuição dos microorganismos em tecidos de dentes não vitais, utilizando 97 dentes clinicamente mortificados. A cárie foi o principal fator etiológico que provocou a morte pulpar. Alguns espécimes estavam extensamente restaurados, e em outros o fator etiológico desencadeante da mortificação pulpar foi decorrente de trauma. Após o registro

dos dados clínicos e radiográficos, os dentes foram extraídos e estocados em solução de formalina neutra tamponada a 10%, e em seguida descalcificados e preparados para análise histológica. Após a descalcificação, secções foram preparadas de três maneiras:

- a) 56 dentes realizaram-se cortes transversais seriados, obtidos da região cervical da raiz, do terço médio e da região apical conjuntamente com qualquer tecido periapical remanescente. Uma série de secções foi obtida de cada região;
- b) secções transversais da região apical de 15 dentes foram obtidas;
- c) 26 secções longitudinais foram preparadas a partir da região do canal radicular;
- d) dentes livres de cárie com polpa normal foram usados como controle.

Secções alternadas de cada dente foram coradas, utilizando um método modificado a partir do conforme a técnica de Gram com hematoxilina e eosina com uma modificação do método de coloração de Gram preconizado por Sidaway, em 1958. Nesse método, o cristal violeta de Hucker Conn é usado para corar de preto ou roxo escuro organismos Gram positivos. Após a diferenciação, foi usada fucsina aquosa básica para corar microorganismos Gram negativos e ácido pícrico como corante marcador da dentina. Esse método é especialmente indicado para demonstrar a presença de bactérias em secções de dentina descalcificada. A invasão bacteriana da dentina foi registrada por dois métodos:

- a) grau de invasão dos túbulos dentinários pelas bactérias:

- ✧ quando havia envolvimento de um a 20 túbulos de cada secção, a invasão foi classificada como suave;
- ✧ quando 21 a 50 túbulos encontravam-se invadidos, a classificação adotada foi a de moderada;
- ✧ nos casos em que mais do que 50 estavam envolvidos, adotou-se a classificação de invasão intensa;

- b) profundidade de penetração da bactéria na dentina adjacente ao canal, e a distribuição dos túbulos invadidos ao redor do conduto.

O número de túbulos contendo organismos foi altamente variável de dente para dente. A invasão foi classificada como suave em 33 dentes, moderada em 20 dentes e intensa em oito dentes. Em 18 espécimes observou-se a presença de microorganismos nos canais radiculares, mas não havia invasão da dentina, e

nos 18 dentes remanescentes não se constatou a presença de microorganismos no conduto ou na dentina. Observou algumas diferenças entre a proporção de invasão bacteriana nos dentes com diferentes histórias clínicas. Dentes com abscesso agudo sempre continham organismos no canal radicular, mas a invasão da dentina foi menor do que nos outros grupos. Dentes com granuloma ou com destruição óssea periapical visível mostraram uma percentagem levemente menor de canais contendo microorganismos do que a média da série, porém, o grau de invasão dentinária foi maior. O grau de invasão bacteriana mostrou-se maior ao nível de terços cervical e médio e em menor número próximo ao forame apical. Observou-se que há diferenças quanto à profundidade de penetração e a quantidade de invasão bacteriana: dentes com lesões agudas apresentam menor invasão do que dentes com lesões crônicas. Esses achados foram extremamente relevantes para a endodontia, originando a técnica escalonada e reforçando a preocupação com a desinfecção, principalmente em dentes com processos infecciosos crônicos.

3.2 Papel das bactérias na patologia pulpar e periapical

Möller *et al.* (1981), analisaram o efeito que o tecido pulpar necrótico contaminado com bactérias indígenas exerce sobre o tecido periapical de dentes de macacos. Nesse estudo foram utilizados nove macacos, nos quais 78 dentes selecionados para o estudo, tiveram sua polpa necrosada assepticamente. No conduto de 26 dentes, a polpa foi deixada no interior do canal radicular e o conduto mantido livre de bactérias por selamento durante seis a sete meses. Em um grupo de 52 dentes houve a infecção pela flora indígena; nesse grupo, os dentes permaneceram expostos ao meio bucal durante cinco a sete dias, sendo selados durante seis a sete meses. Os resultados foram registrados clinicamente, radiograficamente, com testes microbiológicos e histológicos, realizados no início do experimento e seis a sete meses depois. As amostras iniciais não contaminadas permaneceram estéreis, indicando que o risco de contaminação, incluindo a via hematogênica dos canais radiculares, é muito pequeno, demonstrando também que tecido pulpar necrótico não infectado não induz reações inflamatórias nos tecidos periapicais. Dentes com tecido pulpar infectado demonstraram reações inflamatórias clínicas e radiográficas. Encontraram com mais frequência, a presença de bactérias do tipo estreptococos anaeróbios

facultativos, bastonetes coliformes e bactérias anaeróbias obrigatórias. Todos os dentes infectados, ao serem examinados histologicamente, demonstraram fortes reações inflamatórias na região periapical. Os autores comprovaram com esse estudo que o tecido pulpar necrótico asséptico não produz alterações periapicais e que elas são induzidas por tecido pulpar contaminado por microorganismos.

Fabricius *et al.* (1982a) observaram a influência da combinação das bactérias orais nos tecidos periapicais de macacos. Nesse estudo observaram a habilidade de 11 cepas bacterianas puras e em várias combinações de induzir reações periapicais. As bactérias orais indígenas foram isoladas originalmente em um experimento anterior, no qual os autores produziram lesões periapicais em macacos; os espécimes bacterianos utilizados foram obtidos de canais infectados com lesão periapical comprovada, com acompanhamento radiográfico após 670 dias. Neste experimento foram utilizados 75 dentes de macacos. As variedades bacterianas foram completamente isoladas e inoculadas isoladamente em 12 canais radiculares com proporções idênticas; os outros 63 canais foram inoculados com outras combinações. Os dentes foram mecanicamente desvitalizados, contaminados com suspensão bacteriana e selados durante seis meses. Após seis meses, as paredes dos canais e a região apical foram debridados com uma lima Hedström nº 2 ou 3 para obter a mistura para a suspensão; todo o fluido da suspensão foi sugado com pontas de papel, transferidas para um meio de transporte, o VMG II, semeadas e analisadas na seqüência. No final do período experimental, observou-se que nas infecções mistas os *Bacteroides oralis* foram predominantes na maioria dos canais radiculares com infecção mista. Em contraste, os *Bacteroides* não foram isolados novamente em qualquer um dos canais radiculares onde a semeadura da cultura pura foi realizada. Os *Enterococcus*, entretanto, sobreviveram como cultura pura em todos os canais. E as infecções mistas demonstraram alta capacidade de induzir a formação de lesão apical, como revelado radiograficamente. Os estreptococos anaeróbios facultativos induziram apenas reações periapicais mais fracas do que as dos *Bacteroides oralis*. Outro achado revelador obtido por Fabricius foi que, ao inocular culturas mistas com proporções iguais de bactérias, após seis meses, a cultura tinha a mesma proporção da original, obtida a partir de outro estudo prévio, comprovando o fato de que certas bactérias apresentam uma maior capacidade de sobreviver e multiplicar-se nos canais radiculares do que

outras. Os autores salientaram que a habilidade de sobreviver no canal radicular não é congruente com a habilidade de induzir a formação de lesões apicais.

Fabricius *et al.* (1982b) realizaram um estudo sobre as bactérias orais indígenas predominantes isoladas em canais radiculares infectados, após diversos períodos de observação. Utilizaram 24 dentes de três macacos, os quais foram desvitalizados mecanicamente e expostos à flora bucal por aproximadamente uma semana e depois selados. Foram realizadas amostras microbiológicas em 16 dentes após sete dias de fechamento. Os dentes de três macacos foram observados em períodos de 90, 180 e 1060 dias. Ao final de cada período de observação, novas amostras foram colhidas. As amostras finais incluíram espécimes do canal principal, da dentina e da região apical. Todas as análises microbiológicas foram realizadas quantitativamente. As amostras finais dos canais radiculares da região apical mostraram uma predominância de bactérias anaeróbias restritas não esporulativas neste experimento; 85 a 98% das bactérias encontradas foram bactérias anaeróbias. As espécies mais freqüentemente encontradas foram *Bacteróides* e bacilos anaeróbios Gram positivos não esporulados. Obtiveram uma baixa proporção de bactérias anaeróbias facultativas e uma maior proporção de bactérias estritas anaeróbias, as quais aumentam em proporção direta com o tempo. Amostras colhidas após 1060 dias mostravam a predominância de bactérias anaeróbias estritas em cerca de 50%, e as anaeróbias facultativas por vezes não chegavam a 2%. Diferenças marcantes foram notadas entre as diferentes regiões do canal radicular analisadas: na região apical, as bactérias anaeróbias estritas cresceram mais rapidamente que as facultativas, tendo uma grande importância no desenvolvimento das lesões periapicais. Outro achado enfatizado pelos autores foi a presença de *Bacteroides melaninogenicus* com certa freqüência nos espécimes que tiveram sintomatologia clínica.

Dahlén *et al.* (1982) estudaram a atividade dos microorganismos *Streptococcus faecalis* ss. *Liquenfaciens* (Strep- MC4), *Actinomyces bovis* (Act-MC6) e *Bacteroides oralis* (Bact-MC3) em canais experimentais contaminados, de quatro macacos imunizados e cinco macacos não imunizados. A imunização foi realizada utilizando antígenos de variedade homóloga e o nível de anticorpos foi verificado com exames. Células viáveis das três bactérias acima mencionadas, foram inoculadas em quantidades iguais isoladas, com duas espécimes

combinadas e com três espécimes combinadas, em 56 canais radiculares de espécimes imunizados e 60 canais de espécimes não imunizados. Após seis meses, amostras dos canais radiculares foram submetidas à análise bacteriológica qualitativa e quantitativa e a área apical foi examinada radiograficamente e histologicamente. As análises radiográficas e histológicas não revelaram diferenças significativas entre os dois grupos de animais. Observaram que os espécimes com infecção mista apresentaram reações mais severas do que as produzidas por uma variedade única, em ambos os grupos de animais. Porém, o *Enterococcus faecalis* ao ser inoculado como única espécie, foi capaz de produzir lesões em tecido duro, confirmando estudos prévios de Möller *et al.* (1981), Fabricius *et al.* (1982a), Fabricius *et al.* (1982b). Estes estudos, afirmavam que a habilidade de certas bactérias de sobreviver em canais radiculares, não era congruente com a capacidade de afetar os tecidos periapicais, e que sua combinação é capaz de potencializar a reação inflamatória. Observaram que as bactérias inoculadas em combinações mantiveram as mesmas proporções, em ambos os grupos de animais, com uma leve predominância dos *Enterococcus faecalis*.

Baumgartner *et al.* (1991), analisaram em câmara de anaerobiose os 5mm apicais de canais radiculares infectados de dentes com polpas expostas por cáries e, com presença de lesões apicais. Os dentes de 10 pacientes, que tinham dor como queixa principal, foram extraídos. A lesão periapical foi separada do periápice dental com o uso de uma lâmina 15, que foi imediatamente acondicionada em um meio de cultura e refrigerada a 4°C. Os dentes foram colocados em câmaras de anaerobiose, com atmosfera de 37°C, com 85% de nitrogênio, 10% de hidrogênio e 5% de dióxido de carbono. Culturas duplicadas foram analisadas em aerobiose também. As bactérias que foram predominantemente isoladas foram: *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* pigmentados, *Preptostreptococcus*, *Bacteroides* não pigmentados, *Veilonella*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mutans*. A maioria das bactérias isoladas era anaeróbia estrita, cerca de 68%, demonstrando a presença predominante de bactérias anaeróbias no terço apical de dentes com canais radiculares infectados com lesão, os quais foram expostos por processo carioso. Porém, em 100% dos dentes havia a presença de bactérias anaeróbias estritas e em dois canais havia apenas esse tipo de microrganismo. A prevalência

dos microorganismos estritos ocorre devido ao ambiente de baixo potencial de redução e oxidação promovido pelo tecido necrótico pulpar e pelo tecido periradicular. Concluíram que os canais radiculares, portadores de lesões crônicas, possuem uma flora microbiana predominantemente anaeróbia e Gram negativa. Estudos experimentais longitudinais em animais demonstram que a proporção de microorganismos anaeróbios estritos aumenta com o decorrer do tempo e que os facultativos decrescem com o tempo. Demonstraram também que a região apical dos canais radiculares contém um maior número de microorganismos anaeróbios quando comparada à região coronária. Os tipos de microorganismos encontrados em polpas necrosadas infectadas dependem fundamentalmente do meio de cultura e da técnica utilizada na coleta das amostras, das condições de incubação, do uso de microscopia e do corante utilizado. Os primeiros trabalhos utilizavam técnicas predominantemente aeróbias. Com o desenvolvimento de novas técnicas, os pesquisadores começaram a observar o papel dos microorganismos anaeróbios, admitindo que as infecções endodônticas são polimicrobianas e que as espécies bacterianas apresentam diferentes fatores de virulência.

Sundqvist (1992a) relatou a existência de relações comensais ou antagonicas entre microorganismos nos canais radiculares de dentes com periodontite apical. Amostras obtidas de 65 dentes humanos infectados foram analisadas, de acordo com a frequência de ocorrência e proporção total da flora isolada. As espécies mais frequentemente isoladas foram: *Fusobacterium nucleatum* (48%), *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium lactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella (Campylobacter) recta*. Observou que o oxigênio e seus produtos constituem um importante fator ecológico. À medida que há um decréscimo das bactérias facultativas e um aumento concomitante de bactérias anaeróbias, há o consumo do oxigênio e o desenvolvimento de um baixo potencial de redução e oxidação, favorecendo o crescimento das mesmas, que constituíram cerca de 90% dos espécimes isolados. A disponibilidade de nutrientes também é importante no estabelecimento da flora microbiana. Os nutrientes requeridos por organismos de crescimento rápido estão presentes no fluido tissular e podem estar disponíveis quando as células do tecido conectivo são desintegradas. A média do número de espécies encontrada em cada canal ficou em torno de seis

tipos diferentes. Observaram uma correlação entre o número de espécies isoladas no canal e o tamanho da lesão. As bactérias podem também utilizar os produtos de outras bactérias. As associações microbianas têm um papel importante, regulando a composição da flora com associações positivas e negativas entre as espécies. Houve uma forte associação positiva entre algumas espécies como *P. intermedia* e *P. micros*, *P. anaerobius* e *Eubacterium*. Associações negativas foram encontradas entre os grupos das seguintes bactérias: *Bacteroides* produtores de pigmentos escuros e *P. endodontalis*, as quais promovem uma inibição cruzada que impede o crescimento da *P. intermedia*.

Os microorganismos são muito versáteis e alguns podem sintetizar produtos como toxinas, cápsulas e enzimas extracelulares, capazes de modificar o equilíbrio do processo infeccioso em favor de outro grupo de microorganismos. Interações bacterianas positivas de suporte mútuo ou mesmo competitivas auxiliam a determinar a natureza da microbiota. Associações positivas foram observadas entre *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*; entre *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *Wollinella (Campylobacter) recta* e *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius* e eubacterias em canais radiculares. Em geral, espécimes de estreptococos como *Propionibacterium propionica*, *Capnocytophaga ochracea* e *Veillonella parvula* mostraram associação negativa com outras bactérias. Teoricamente todas as bactérias presentes na cavidade apresentam capacidade de invadir o canal radicular, levando a polpa a um colapso, provocando sua necrose e o subsequente estabelecimento de uma lesão periapical. Porém, apenas um número reduzido de bactérias é capaz de realizar esse feito. Isso ocorre devido a um processo de seleção no qual certas bactérias sobrevivem e outras não. A flora dos canais contaminados possui predominância de bactérias estritamente anaeróbias, algumas espécies de anaeróbios facultativos e raramente aeróbios. As condições ecológicas (nutrientes, tensão de oxigênio e relações inter-bacterianas) do canal radicular são favoráveis ao crescimento de bactérias anaeróbias, capazes de fermentar aminoácidos e peptídeos, entretanto, bactérias que obtêm energia principalmente da fermentação de carboidratos são mais restritas, podendo ser reduzidas pela falta desses nutrientes (Sundqvist, 1992b).

Cohen *et al.* (1994) afirmam que a maioria das doenças pulpares e periradiculares são induzidas por envolvimento direto ou indireto de bactérias orais e que quanto maior a lesão, maior o número de espécies bacterianas presentes e sua variedade de combinações; porém, poucas são as espécies de bactérias aeróbias. O sinergismo bacteriano tem um papel preponderante na manutenção da infecção. O papel dos microorganismos na patogênese da doença periapical é preponderante, pois ao sobreviverem no sistema de canais radiculares perpetuam o processo infeccioso periapical, afetando o prognóstico a longo prazo. A eliminação dos agentes microbianos do sistema de canais radiculares é um dos objetivos primordiais do preparo dos condutos, que remove os microorganismos presentes na luz do canal radicular e aqueles localizados à pequena profundidade nos túbulos dentinários. A ação dos instrumentos e das substâncias químicas promove um desequilíbrio da microbiota do canal radicular, reduzindo a população bacteriana, removendo parte dos nutrientes e interferindo nas interações bacterianas. Os microorganismos remanescentes em profundidade nos túbulos dentinários, nos canais laterais, secundários, acessórios e deltas, podem multiplicar-se significativamente entre as sessões, favorecidos pela anaerobiose restaurada após o selamento da cavidade de acesso e pela troca de fluido tecidual no canal radicular proveniente do periápice.

Sydney (1996b) determinou a microflora de dentes com polpa necrótica e periapicopatias, sem comunicação com a cavidade oral. Após terem sido preparados os dentes receberam ou não medicação intracanal (hidróxido de cálcio) em diferentes tempos. Foram utilizados 20 dentes humanos ântero-superiores, que foram divididos em dois grupos: Grupo 1 – identificação da população microbiana imediatamente após o acesso, os canais foram instrumentados nova colheita foi realizada e em seguida os canais foram selados sem o uso de medicação intracanal, durante o período de uma e seis semanas, quando novas coletas microbianas foram realizadas; Grupo 2 – identificação da população microbiana imediatamente após o acesso e preparo dos canais, em seguida o canal recebeu um curativo intracanal com pasta de hidróxido de cálcio com soro fisiológico como veículo, que permaneceu no conduto durante o período de uma e seis semanas. Ao término de cada período a pasta era removida e os canais eram selados vazios durante sete dias, quando novas coletas microbianas eram realizadas. Para cada dente foram realizadas três coletas de amostras,

totalizando um número de 60. Como resultado, o autor demonstrou que o hidróxido de cálcio reduziu em 77,8% a população microbiana após sete dias de curativo, e que após seis semanas em apenas um caso encontrou a presença de uma espécie bacteriana, o *Enterococcus faecalis*, demonstrando uma maior efetividade do uso durante seis semanas da pasta de hidróxido de cálcio.

Sundqvist *et al.* (1998a) realizaram a determinação da flora microbiana em 54 dentes com indicação de retratamento endodônticos, assintomáticos, com evidência de lesão periapical. O tratamento anterior havia sido realizado há aproximadamente quatro ou cinco anos. Após a desobturação, amostras foram coletadas na primeira consulta, a cultura e a identificação dos espécimes foi realizada; na seqüência realizou-se o preparo, e não se utilizou medicação intracanal. Após sete dias, novas amostras foram coletadas e os canais re-preparados e irrigados com hipoclorito de sódio a 0,5%, preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e selados novamente. Em uma terceira consulta, removeu-se a medicação e nova amostra foi coletada. Procedeu-se então à obturação do conduto. O controle pós-operatório clínico e radiográfico foi realizado anualmente durante cinco anos. Foram encontradas bactérias em 24 dentes dos 54 analisados. Na análise microbiológica realizada na segunda consulta, em 20 dentes houve a presença de microorganismos. Em um dos casos, as bactérias foram isoladas apenas na primeira consulta; nos outros três, foram coletadas bactérias, na segunda consulta, que não haviam sido isoladas após a desobturação. Em 19 casos, apenas uma bactéria foi isolada; em outros quatro, duas espécies e no outro, a infecção era polimicrobiana. Em nove casos, nos quais havia a presença dos *Enterococcus faecalis*, não foi isolado nenhum outro microorganismo. Aproximadamente 93% dos pacientes retornaram para o controle; o índice de sucesso foi de 74%, porém, nos dentes onde foi constatada a presença de *Enterococcus faecalis* a taxa de índice de sucesso foi menor, aproximadamente 66%. Na consulta de obturação, em seis dentes houve a presença de microorganismos nas amostras coletadas. Desses, quatro não apresentaram cura, em três havia a presença do *Enterococcus faecalis* e no quarto havia a presença do *Actinomyces israelii*. Os autores concluíram: que o tamanho da lesão parece influenciar nos resultados, as lesões maiores obtiveram um índice de sucesso menor; que a flora de dentes, nos quais o tratamento endodôntico resultou em falha, é extremamente diferente dos dentes não

tratados; a presença de microorganismos na sessão de obturação e o tamanho da lesão são fatores negativos para o prognóstico.

Peciulienė *et al.* (2000) avaliaram a presença de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares de dentes previamente submetidos a tratamento endodôntico na população lituana, os quais apresentavam lesões periapicais necessitando de retratamento. Vinte e cinco dentes assintomáticos foram analisados nesse estudo. Amostras microbiológicas foram colhidas dos canais antes e depois do preparo e irrigação com hipoclorito de sódio e EDTA. Microorganismos foram isolados em 20 dos 25 dentes analisados, sendo que o *Enterococcus faecalis* estava presente em 14 dos 20 dentes que tinham cultura positiva, usualmente em cultura pura ou como o componente majoritário da flora microbiana. As segundas amostras foram obtidas após o preparo e revelaram crescimento em sete dos 20 dentes. Em cinco dos sete casos, foram encontrados *Enterococcus faecalis* como cultura pura. Esses resultados indicam que, apesar do tratamento químico prévio, as condições presentes em canais incompletamente tratados, são fatores importantes para a presença dos *Enterococcus faecalis* nesses dentes. Os canais desobturados encontravam-se preenchidos com diversos materiais de obturação: rezorcina formalina, cimento de fosfato de zinco, cones de prata, cones de guta percha e cimento de óxido de zinco e eugenol; o *Enterococcus faecalis* pode ser encontrado em canais obturados com esses materiais. Os materiais de obturação perdem gradualmente sua capacidade antimicrobiana no canal radicular, permitindo a sobrevivência e até mesmo o crescimento bacteriano. Essas bactérias são ecologicamente fortes, podendo sobreviver em canais incompletamente obturados onde os nutrientes são limitados, quando comparados com a periodontite apical primária.

Noda *et al* (2000) em um estudo *in vitro* colheram o exsudato de 15 dentes portadores de lesões refratárias, visando mapear a população microbiana e testar a sua resistência a determinados antibióticos utilizados via sistêmica durante o tratamento endodôntico desse tipo de afecção. Os espécimes isolados mais comumente foram o *Enterococcus faecalis* e o α -*Streptococcus*. Os resultados dos testes de suscetibilidade aos antibióticos revelaram que os *Enterococcus faecalis* são altamente resistentes à cefalosporina e seus produtos e à penicilina e seus produtos.

Love (2001) tentou determinar um mecanismo que fosse capaz de explicar como o *Enterococcus faecalis* podia sobreviver e crescer dentro de túbulos dentinários e reinfetar um canal radicular obturado. O autor utilizou células de *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*. A habilidade dessas três espécies de invadir a dentina e ligar-se a colágeno tipo um, na presença de soro humano, foi avaliada pela invasão dentinária. As células das três espécies foram viáveis e capazes de invadir a dentina e ligarem-se ao colágeno. Essas duas propriedades foram inibidas para as espécies do *Streptococcus gordonii* e do *Streptococcus mutans* na presença de soro humano. Porém o *Enterococcus faecalis* foi apenas reduzido na presença do soro, mas não foi inibido e a sua capacidade de ligar-se ao colágeno foi aumentada. Concluíram que o fator de virulência do *Enterococcus faecalis*, em insucessos de dentes endodonticamente tratados, pode estar relacionado com a capacidade dos mesmos em invadir os túbulos dentinários e de aderirem ao colágeno, mesmo em presença de soro humano.

Siqueira Jr. (2001) estudou a etiologia das falhas do tratamento endodôntico e o porquê tratamentos bem conduzidos podem falhar. Observou que acidentes operatórios como quebra de instrumentos, perfurações, sobre-extensões, formação de degraus podem causar o insucesso nos tratamentos endodônticos, principalmente quando estes ocorrem em dentes acometidos por infecção radicular. Existem alguns casos, nos quais houve a execução da mais alta qualidade e mesmo assim houve o estabelecimento de falha no tratamento. As evidências científicas indicam que alguns fatores podem estar associados com presença microbiana intra e extra-radicular, e com fatores intrínsecos e extrínsecos não microbianos. Dentre os fatores extrínsecos não microbianos podemos citar: cistos não infectados, permanência de celulose proveniente dos cones de papel, fios de algodão. O autor afirma que os tratamentos endodônticos falham usualmente quando a terapia é conduzida de maneira inadequada. Existe um alto risco de reinfecção em dentes nos quais a obturação radicular não foi bem conduzida, e naqueles nos quais o selamento coronário não foi realizado corretamente. Alguns autores indicam o retratamento em casos em que houve exposição coronal da obturação do canal radicular à saliva bucal, por um período curto de tempo de 30 dias ou mais. Entretanto, mesmo seguindo criteriosamente todos os passos do tratamento endodôntico, conforme os mais altos padrões,

falhas podem ocorrer e na maioria dos casos, podem ser atribuídas a infecções persistentes ou secundárias ou ainda às infecções extra-radiculares, ou seja, poucos são os casos que falham devido a fatores não microbianos intrínsecos e extrínsecos. Portanto, a principal causa da patologia pulpar e/ou periapical é a presença de microorganismos, os quais provêm, na maioria das vezes, da cárie dental. Existem outras portas de entrada para os microorganismos, tais como trincas e fraturas dentais, microinfiltração de restaurações, deltas apicais, irregularidades, istmos e túbulos dentinários, canais laterais associados à doença periodontal e outras. É provável que em muitos casos, o suprimento de nutrientes para as bactérias localizado nas ramificações e deltas, permaneça inalterado à terapia endodôntica.

3.3 Ação bactericida das substâncias químicas e medicações intracanal auxiliares utilizadas no preparo químico cirúrgico e como curativo de demora

Kawahara *et al.* (1975) em um estudo *in vitro*, avaliaram a eficácia de concentração de paramonoclorofenol na redução da população dos microorganismos dentro dos canais radiculares de dentes extraídos. Os seguintes microorganismos foram utilizados como espécimes teste: *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus epidermidis* e esporos de *Bacillus subtilis*. Os espécimes foram preparados, esterilizados e inoculados com suspensão contendo os microorganismos acima citados. Os espécimes foram selados, incubados a 37°C, durante 48 ou 72 horas. Partículas dentais foram removidas, suspensas e submetidas a diluições seriadas e cultivo, sendo incubadas durante 48 ou 72 horas e na seqüência, realizaram a contagem das ufc. Conforme a concentração foi aumentando, o número de microorganismos diminuiu; 10µl de solução a 2%, após 72 horas foram suficientes para eliminar o *Enterococcus faecalis*. Este microorganismo foi o mais resistente, e sua eliminação requer 20 vezes mais medicamento do que o *S. Mitis* e quatro vezes mais do que o *S. Epidermidis*. Os esporos testados não foram eliminados no experimento. Os autores concluíram que vêm se utilizando concentrações mais altas do que são necessárias para obter-se o efeito antimicrobiano ideal na terapia endodôntica.

Martins *et al.* (1979) avaliaram a redução microbiana proporcionada pela instrumentação e irrigação com solução salina e o efeito anti-séptico de

algumas medicações intracanal. Sessenta dentes unirradiculares foram usados, coletas de amostras iniciais, após o preparo, após a remoção de curativo de demora após 48 e 72 horas foram realizadas. As culturas foram incubadas por sete dias, e processadas. Entre a primeira e a segunda coleta, houve diferença com diminuição da população microbiana. O uso da medicação intracanal provocou uma diminuição na população microbiana. O paramonoclorofenol quando utilizado sem associação demonstrou perder sua efetividade após 72 horas. Resultados significativamente melhores foram obtidos ao associar a pasta de hidróxido de cálcio com paramonoclorofenol a 1%.

Byström *et al.* (1985) avaliaram o efeito bactericida do hidróxido de cálcio, do fenol canforado e do paramonoclorofenol canforado quando utilizados como medicação intracanal. Sessenta e cinco dentes monorradiculados com polpa morta, câmara pulpar intacta, e evidência de lesão periapical, foram preparados utilizando a irrigação com hipoclorito de sódio a 0,5% ou a 5%, seguida de curativo com as substâncias acima descritas. Amostras microbiológicas foram coletadas antes do preparo, após o uso da medicação e em uma terceira consulta. Bactérias foram isoladas em todas as amostras colhidas antes do preparo. Em três casos houve exacerbação aguda com formação de abscesso, após o uso do hidróxido de cálcio, e em dois casos houve exacerbação sem a formação de abscesso, após o uso do paramonoclorofenol canforado. A sensibilidade das bactérias à pasta de hidróxido de cálcio variou bastante, a maioria foi eliminada; o mesmo não ocorreu com as outras medicações. Os *Enterococcus faecalis* mostraram-se difíceis de serem eliminados com todas as medicações. O hidróxido de cálcio apresentou um bom efeito bactericida, sendo essencial o uso de medicação intracanal entre as consultas. Após o período de um mês, não se observou a presença de bactérias nos dentes tratados com hidróxido de cálcio.

Haapasalo e Ørstavik (1987) avaliaram a capacidade de desinfecção do paramonoclorofenol canforado e de um composto de hidróxido de cálcio (Calasept) frente à dentina infectada de espécimes bovinos contaminados com *Enterococcus faecalis*. O paramonoclorofenol canforado desinfetou rápida e completamente os túbulos dentinários, enquanto o paramonoclorofenol canforado na forma gasosa desinfetou os túbulos bem mais lentamente. A pasta de hidróxido de cálcio (Calasept) não foi capaz de eliminar totalmente os

Enterococcus faecalis, mesmo em espessuras superficiais de 100µm de dentina contaminada.

Sjögren *et al.* (1991) observaram o efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio como curativo intracanal a curto prazo, em um estudo *in vivo*, no qual aplicaram o medicamento durante períodos diferentes de tempo: 10 minutos ou sete dias, em dentes portadores de periapicopatias. Observaram, em estudos prévios, que o preparo químico cirúrgico reduz apenas 50% do conteúdo bacteriano. Diversos estudos anteriores indicavam o uso do Ca(OH)_2 durante um mês, a fim de reduzir o conteúdo microbiano, porém, os resultados dessa pesquisa demonstraram que o curativo de sete dias é capaz de reduzir as bactérias remanescentes após o preparo químico cirúrgico, e que a aplicação de 10 minutos é ineficaz.

Aktener *et al.* (1993) avaliaram a capacidade de remoção do magma dentinário com várias combinações de EDTA e etilenodiamino (ED). O magma dentinário consiste em uma camada amorfa e irregular, contendo material orgânico e inorgânico, formada sempre que é realizado corte da superfície dentinária. O magma constitui uma camada física para bactérias e desinfetantes. Além disso, microorganismos podem permanecer no magma, perpetuando-se e podendo multiplicar-se. Quando há penetração bacteriana nos túbulos dentinários, o magma pode prejudicar a ação das substâncias irrigadoras e da medicação intracanal. O magma poderá atuar como uma barreira intermediária interferindo na adesão do material obturador. Trinta e cinco incisivos superiores foram utilizados. A solução de EDTA a 17%, foi preparada com 17g de sal dissódico de EDTA, com 9,25 ml de 5N de solução de hidróxido de sódio, e água destilada até completar 100ml de solução. A solução de ED a 5% foi preparada pela mistura de 5,12 ml de ED a 98% e água destilada até completar 100ml. Várias combinações de irrigação foram utilizadas, a solução salina foi utilizada nos espécimes do grupo controle. Na seqüência as amostras foram avaliadas em nível de MEV, todas as soluções mostraram-se capazes de remover a camada de magma dentinário.

Sydney *et al.* (1996a) em um estudo *in vivo* avaliaram a influência do preparo do canal radicular nas bactérias anaeróbias, em dentes portadores de periodontite apical assintomática. Trinta dentes superiores, com lesão periapical assintomática, polpa intacta e sem presença de bolsa, tiveram sua câmara pulpar

aberta. Para o exame microbiológico inicial utilizou-se uma lima Hedströen nº 15 determinando o comprimento de trabalho, em seguida, coletou-se o material necessário. O preparo dos canais foi realizado utilizando o seguinte protocolo: no grupo controle utilizou-se soro fisiológico como irrigante e nos grupos tratados, quatro instrumentos foram usados, a partir do primeiro instrumento que tocasse as paredes no comprimento de trabalho. Testes microbiológicos foram realizados no uso do terceiro e do quarto instrumento. O preparo associado ao uso de hipoclorito de sódio a 1% não foi capaz de eliminar as bactérias anaeróbias, apenas de reduzi-las, houve prevalência de bactérias anaeróbias Gram positivas após o preparo químico-cirúrgico.

Siqueira Jr. (1997) discorre sobre algumas substâncias utilizadas durante a terapia endodôntica, dentre elas o paramonoclorofenol canforado, um dos compostos fenólicos mais utilizados em endodontia. Apresenta bom espectro de ação antibacteriana, é estável, incolor, não mancha os tecidos dentários, é altamente penetrante. Dependendo da concentração, pode penetrar até a junção cimento dentina. Sua atividade bactericida ocorre devido ao rompimento da membrana citoplasmática bacteriana, na desnaturação protéica, degradação das membranas, inativação enzimática como a das oxidases e desidrogenases bacterianas. Ocorre ainda a liberação de cloro, que tem poder antibacteriano. Sua associação à cânfora como veículo visa diminuir sua toxicidade. O autor afirma ainda que, quando associado ao hidróxido de cálcio foi efetivo, promovendo extensos halos de inibição.

Leonardo *et al.* (1998), relataram alguns fármacos utilizados na terapia endodôntica, dentre eles o paramonoclorofenol canforado, um dos anti-sépticos mais utilizados na endodontia, na forma pura ou combinado a pastas de hidróxido de cálcio. Apresenta alta penetrabilidade devido à sua baixa tensão superficial, e teoricamente tem ação à distância. Devido à baixa tensão superficial, ocorre uma maior difusão do medicamento através da membrana das bactérias, aumentando conseqüentemente seu poder bactericida e a alta penetrabilidade permite sua difusão em reentrâncias e túbulos dentinários. O paramonoclorofenol canforado realiza a coagulação protéica, devendo ser usado após o preparo completo do canal. Como desvantagens apresenta odor e sabor fortes. Segundo o autor, seu uso é indicado quando associado ao hidróxido de cálcio.

Nos casos de insucesso na terapia endodôntica, sempre que possível deverá ser indicado o retratamento endodôntico, utilizando-se substâncias químicas desinfectantes, com o intuito de eliminar ou reduzir a flora microbiana presente no sistema de canais radiculares. A literatura relata que dependendo dos fatores envolvidos, tais como a presença de lesão periapical e a sua extensão, o índice de sucesso não é superior a 74% nos retratamentos (Sundqvist *et al.*, 1998a).

Sundqvist *et al.* (1998b) estudaram dentes com periapicopatias, e concluíram que a base do tratamento dependerá da identificação e compreensão dos fatores que levam ao estabelecimento da doença. Na periodontite apical os microorganismos constituem-se em um dos principais fatores etiológicos. Inicialmente o número de células de microorganismos é de 10^2 a 10^8 . A simples instrumentação com solução salina é suficiente para reduzir a população microbiana. No entanto, mesmo com um número reduzido de microorganismos e sem a utilização de medicação intracanal, os fluidos dos tecidos periapicais consistem em nutrientes, permitem a recolonização do sistema de canais radiculares, mantendo a lesão periapical. Portanto, uma boa conduta para um tratamento endodôntico seria o uso de uma substância irrigadora com propriedades desinfectantes, como o hipoclorito de sódio, associado ao uso do EDTA, visando remover o magma dentinário, seguido do uso de uma medicação intracanal com hidróxido de cálcio durante sete dias.

Lage-Marques e Antoniazzi (2000) estudaram vários fármacos utilizados como medicação intracanal, destacando-se dentre eles os seguintes:

- a) NDP (paramonoclorofenol (2g) associado ao fosfato de dexametasona (0,32g) veiculado em polietilenoglicol + Rinosoro (solução salina estabilizada com cloreto de benzalcônio) qsp 100mL) e PRP - paramonoclorofenol (2g) veiculado em polietilenoglicol + Rinosoro (solução salina estabilizada com cloreto de benzalcônio) qsp 100mL – antimicrobiano associado a um corticoesteróide em veículo viscoso hidrossolúvel, indicados em casos de polpa viva e polpa mortificada após o preparo químico cirúrgico;
- b) clorexidine: agente de amplo espectro, podendo ser veiculado em polietileno ou Natrosol. Apresenta alta substantividade, sendo

indicado em situações onde os métodos tradicionais não permitem o controle de sinais e sintomas;

- c) hidróxido de cálcio: amplamente estudado e indicado onde se deseja ação antimicrobiana e indução de mineralização.

Os autores afirmam que a medicação intracanal deve ser utilizada após o rigoroso esvaziamento, realizado com substâncias químicas auxiliares, que devem auxiliar no aumento da permeabilidade dentinária, propiciando a ação da medicação através do sistema de canais radiculares. O selamento da cavidade deve ser eficaz, impossibilitando a percolação dos fluidos bucais. O tratamento em sessão única estará condicionado à habilidade do operador em casos de polpa viva. Porém, em casos de polpa mortificada com presença de contaminação, é premente a atuação terapêutica mais profunda, tornando o uso da medicação imprescindível.

Dahlén *et al.* (2000) observaram a incidência de *Enterococcus* em 29 canais infectados, mesmo após o tratamento utilizando curativo de hidróxido de cálcio. A suscetibilidade de 29 amostras isoladas de enterococos foi determinada. Foram encontradas 26 amostras contaminadas com *Enterococcus faecalis*, três contaminadas com *Enterococcus faecium*. Testes de suscetibilidade *in vitro* revelaram que os enterococos isolados eram resistentes à benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina, mas eram sensíveis à eritromicina e vancomicina. Devido à baixa sensibilidade aos agentes antimicrobianos, os enterococos podem ser resistentes ao tratamento endodôntico padrão e apresentarem uma contribuição significativa na falha dos tratamentos.

A intervenção endodôntica promove a limitação do substrato, além de promover o contato com produtos que inibem o metabolismo e o crescimento bacteriano, interferindo dramaticamente nas interações bacterianas. A anaerobiose é quebrada quando o canal é aberto e preparado, eliminando grande parte das bactérias e do substrato, interferindo nas interações microbianas. Entretanto, após o selamento do canal, a anaerobiose é recomposta e o influxo do fluido tecidual para dentro do canal pode gerar a recolonização bacteriana. As bactérias anaeróbias, que sobreviveram ao tratamento biomecânico, podem multiplicar-se em alto número no canal radicular entre as sessões, se um curativo intracanal não for usado. Então, o completo desenvolvimento da infecção com

domínio de bactérias anaeróbias e o estabelecimento das interações é suscetível ao tratamento. O significado dessa infecção para o tratamento clínico é que o canal deveria ser completamente limpo na primeira sessão, quando as bactérias são particularmente vulneráveis à erradicação, por serem altamente sensíveis a distúrbios em sua delicada ecologia (Peciulienė, 2000).

Peciulienė *et al.* (2001) em um estudo *in vivo*, analisaram a presença de leveduras, bastonetes Gram negativos e espécies de *Enterococcus* em canais tratados com periodontites apicais crônicas e o efeito de irrigação com iodine de potássio iodado (IKI). Quarenta dentes obturados, livres de sintomas, foram utilizados nesse estudo. Os pacientes foram divididos em dois grupos. No grupo A os canais foram preenchidos com hidróxido de cálcio durante 10 a 14 dias após a limpeza e modelagem, seguidos da obturação permanente. Amostras microbiológicas foram colhidas dos canais antes e depois do preparo químico mecânico e após a irrigação com iodine. Micróbios foram isolados em 33 dos 40 dentes nas amostras iniciais. Leveduras foram encontradas em seis dentes; em três deles, elas estavam associadas com *Enterococcus faecalis*, bacilos enterococos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Proteus mirabilis*; em 21 dos 33 dentes os *Enterococcus faecalis* foram isolados como cultura pura, em 11 dos espécimes analisados. O crescimento foi detectado em 10 dentes da segunda coleta; dentre esses, seis estavam contaminados com *Enterococcus faecalis*, dos quais cinco eram culturas puras. Todas as terceiras amostras foram negativas, exceto uma. Dois casos de agudização foram registrados, onde ambos os dentes tinham uma infecção mista. Os autores concluíram que há uma alta prevalência de bactérias entéricas e leveduras nos canais obturados com presença de lesões periapicais, e que a irrigação com IKI aumentou o efeito antimicrobiano do tratamento.

Behnen *et al.* (2001) observaram a atividade antimicrobiana de diversas pastas de hidróxido de cálcio no canal radicular em dentina radicular bovina infectada com *Enterococcus faecalis*. Espécimes cilíndricos foram obtidos a partir dos dentes, sendo em seguida divididos em cinco grupos, e na seqüência, contaminados e submetidos a tratamento com pastas de hidróxido de cálcio. Utilizou-se no Grupo 1: pasta densa de Ca(OH)_2 USP (1 g/ml H_2O); no Grupo 2: pasta fina de Ca(OH)_2 USP (1 g/ml H_2O); no Grupo 3: pasta Pulpdent TempCanal; no Grupo 4: água estéril como controle positivo; no Grupo 5: espécimes

dentinários estéreis não contaminados constituindo o controle negativo. Testes quantitativos de análises microbiológicas em diversas profundidades foram realizados após 24 horas. Todos os grupos demonstraram uma significativa redução no número de *Enterococcus faecalis*. Os Grupos 2 e 3 apresentaram uma alta taxa de redução bacteriana (73 - 86%) para todas as profundidades, quando comparados com o Grupo 1 a redução foi de (13 - 26%). Esses resultados comprovam que o Ca(OH)_2 pode reduzir a população de *Enterococcus faecalis* em 24 horas e que pastas mais finas são mais efetivas para eliminá-los dos túbulos dentinários do que as espessas.

Buck *et al.* (2001) avaliaram a efetividade de três substâncias irrigadoras em várias profundidades, nos túbulos dentinários humanos em um estudo *in vitro*. Dado que as bactérias de canais infectados podem invadir os túbulos dentinários, a desinfecção da dentina torna-se um aspecto muito importante da terapia endodôntica. Vinte dentes recém extraídos foram preparados, esterilizados, contaminados com caldo de cultura de *Enterococcus faecalis*, incubados permitindo a penetração no interior dos túbulos dentinários. Os espécimes foram divididos em grupos, quatro grupos contendo três amostras, expostas durante um minuto a diversos irrigantes. Grupo 1 - solução de hipoclorito de sódio a 0,5%; Grupo 2 - EDTA a 0,2% (Tubulicid); Grupo 3 - solução de clorexidina (Peridex); Grupo 4 - água estéril como controle. Realizou-se uma análise das bactérias viáveis, utilizando-se de brocas de diferentes diâmetros para remover fragmentos de dentina do cimento em direção ao canal. Cultivos da região periapical, mediana e coronal foram feitos. O hipoclorito de sódio foi superior. O Tubulicid e o Peridex foram mais efetivos que a água. Observou-se que quanto maior a profundidade, mais bactérias permanecem viáveis.

Estrela *et al.* (2001a) avaliaram dois métodos de determinar a efetividade microbiana do hidróxido de cálcio associado à solução salina, o hidróxido de cálcio associado ao polietileno glicol e hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado. Quatro espécimes de microorganismos foram testados: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29121), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), e uma levedura *Candida albicans* (ICB/USP - 562). Uma mistura desses microorganismos foi utilizada, as variedades foram inoculadas em BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas durante 24 horas a 37°C. Dois métodos foram usados

para avaliar o efeito antimicrobiano: o teste de exposição e o de difusão de Agar. Cinco cavidades foram feitas em cada uma das duas placas de Agar (total de 10) e completamente preenchidas com uma das pastas de hidróxido de cálcio. As placas foram pré-incubadas durante uma hora a temperatura ambiente, e então incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. A zona de inibição ao redor de cada cavidade foi registrada em milímetros, e os resultados foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$). Todos os curativos intracanal induziram zonas de inibição (em torno 5,0 – 10,0 mm). O método de exposição direta é independente de outras variáveis e é um procedimento praticamente laboratorial. Um efeito completo antimicrobiano foi observado, após 48 horas, sobre os microorganismos, não importando qual era o veículo da pasta de hidróxido de cálcio. Os autores afirmam que a ação e indução do reparo tecidual pela medicação intracanal com hidróxido de cálcio tem demonstrado ser a melhor opção. Duas importantes propriedades do hidróxido de cálcio consistem inibição das enzimas bacterianas, como a fosfatase alcalina, causando um efeito mineralizante. O alto pH inibe as atividades enzimáticas: metabolismo, crescimento e divisão celular. A influência do pH altera a integridade da membrana citoplasmática por ruptura dos componentes orgânicos (proteínas, fosfolipídeos) e transporte de nutrientes. Diferentes veículos têm sido adicionados ao hidróxido de cálcio na tentativa de melhorar sua atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, dissociação iônica e difusão. Um fator de controvérsia quando se escolhe um veículo é a comparação do efeito antimicrobiano da associação do hidróxido de cálcio com veículos hidrossolúveis (água destilada, solução salina) e veículos oleosos (paramonoclorofenol canforado). A proposta do estudo foi avaliar os efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio quando combinado com um veículo hidrossolúvel (solução salina), veículo viscoso (polietileno glicol), e um veículo oleoso (paramonoclorofenol canforado). Ficou demonstrado, nesse estudo, que todos os veículos apresentaram atividade antimicrobiana semelhante.

Estrela *et al.* (2001b) avaliaram a influência dos veículos na eficiência antimicrobiana do hidróxido de cálcio. No intuito de melhorar a efetividade do hidróxido de cálcio, diferentes substâncias químicas, com diferentes poderes antimicrobianos têm sido usadas como veículos, tais como paramonoclorofenol-canforado e clorexidine. A proposta desse estudo foi avaliar a influência dos veículos na atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio. Um total de 588

pontas de papel absorvente estéreis foram imersas em diversas suspensões microbianas durante três minutos. As pontas foram colocadas em placas de Petri e cobertas com pastas de medicação intracanal contendo: pasta de hidróxido de cálcio e solução salina; pasta de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado; hidróxido de cálcio e solução de clorexidina; pasta de hidróxido de cálcio e solução de lauril sulfato de sódio a 3%; pasta de hidróxido de cálcio e Otosporin. Após um minuto, 48, 72 horas e sete dias, 147 pontas de papel absorvente foram removidas do contato com o curativo intracanal e transportadas individualmente submersas em 5ml de Lethen Broth, e incubadas a 37°C, durante 48 horas. O crescimento microbiano foi avaliado pela turbidez do meio de cultura. Os tubos contendo BHI com turbidez foram selecionados e inoculados; com a técnica espalhados na placa e incubados durante 48 horas. O teste de Gram do tubo em que houve crescimento no BHI e das colônias foi realizado. O efeito antimicrobiano ocorreu após 48 horas, sob as culturas de *S. Mutans*, *E. faecalis*, *S. Aureus*, *P. aeruginosas*, *B. Subtilis*, *C. Albicans* e na cultura mista, independente do curativo. Os vários veículos associados às pastas de hidróxido de cálcio não apresentaram influência na inativação microbiana. O hidróxido de cálcio produz inativação enzimática reversível e irreversível. A inativação reversível pode ser encontrada quando o pH não atinge níveis suficientemente elevados ou há o retorno do nível de atividade biológica da membrana citoplasmática. A inativação irreversível pode ser observada em pH extremo, após um período longo de tempo (cerca de três dias), com perda da atividade biológica da membrana citoplasmática. A ação do hidróxido de cálcio é diretamente influenciada pela liberação dos íons hidroxila e pela inativação das enzimas da membrana citoplasmática dos microorganismos, a qual altera quimicamente os componentes orgânicos e o transporte de nutrientes, causando efeitos tóxicos nas células. A efetividade dos veículos deriva das características químicas (dissociação e difusão). Os veículos hidrossolúveis (água destilada, e solução salina), induzem um maior aumento na velocidade da dissociação iônica que os veículos viscosos (polietileno glicol), e os oleosos, como o paramonoclorofenol canforado.

Pérez *et al.* (2001) avaliaram a variação do pH dentinário conforme o veículo utilizado associado ao hidróxido de cálcio no canal e na câmara pulpar. Dentes extraídos foram preparados e três cavidades foram confeccionadas em

nível de terço cervical, médio e apical. Um total de 125 dentes foi dividido em cinco grupos: Grupo 1 - pasta de hidróxido de cálcio e soro aplicado na câmara pulpar; Grupo 2 - pasta de hidróxido de cálcio e soro aplicado no conduto radicular; Grupo 3 - Hycal - uma nova forma de pasta de hidróxido de cálcio colocada na câmara pulpar; Grupo 4 - o conduto radicular foi preenchido com pontas de guta-percha e pasta de hidróxido de cálcio; Grupo 5 - Grupo controle - canal preenchido com água destilada sem outra medicação. As cavidades de acesso e o ápice foram selados. Os valores mais altos de pH foram obtidos com veículos aquosos após oito horas, um, dois e três dias, na pasta colocada na câmara pulpar. Após sete dias, o pH aumentou no grupo da pasta Hycal, e não apresentou diferença significativa. Aos 14 dias o Hycal teve os valores de pH mais altos. Entretanto, aos 21 dias não se notou diferença entre os três grupos. O pH cervical foi similar ao do terço médio e maior que o apical.

Han *et al.* (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de pastas de hidróxido de cálcio frente aos *Enterococcus faecalis in vitro*. Sessenta dentes humanos unirradiculares foram infectados com *Enterococcus faecalis* durante três semanas após a remoção do *smear layer*. Os dentes foram divididos em grupos com e sem *smear layer* e foram redivididos em quatro grupos e preenchidos com pastas de hidróxido de cálcio: Grupo 1: pasta contendo veículo aquoso aplicado em canal com *smear layer*; Grupo 2: pasta contendo veículo oleoso aplicado em canal com *smear layer*; Grupo 3: pasta contendo veículo aquoso aplicado em canal sem *smear layer*; Grupo 4: pasta contendo veículo oleoso aplicado em canal sem *smear layer*. A medicação permaneceu durante sete dias. Após a remoção do curativo, raspas da dentina foram coletadas e incubadas, a quantidade de bactéria presente foi registrada. Todas as pastas foram efetivas em eliminar as bactérias dos túbulos dentinários, exceto no grupo com pasta de hidróxido de cálcio com veículo oleoso em canais com *smear layer*. Os autores salientam que o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio é devido ao alto pH de 11,5, que contribui para dificultar a ocorrência de reinfecção ou reabsorção inflamatória. As bactérias presentes nos túbulos dentinários podem representar um papel importante no desenvolvimento da reabsorção radicular externa em dentes traumatizados. Os íons hidroxila difundem-se rapidamente pela dentina radicular quando o *smear layer* é removido. A presença do *smear layer* previne a difusão dos íons hidroxila nos túbulos dentinários.

Silva *et al.* (2002) estudaram a evolução das lesões periapicais e o comportamento dos tecidos periapicais de dentes de cães submetidos à contaminação dos canais com endotoxina bacteriana, associada ou não com hidróxido de cálcio. A proposta do estudo foi avaliar histologicamente o efeito da endotoxina pura ou da endotoxina mais o hidróxido de cálcio na região apical e nos tecidos periapicais. Removeram a polpa de 60 pré-molares, sendo esses dentes divididos em quatro grupos. No Grupo 1 os canais foram preenchidos com endotoxina bacteriana; no Grupo 2 os canais foram preenchidos com endotoxina bacteriana e hidróxido de cálcio; no Grupo 3 os canais foram preenchidos com solução salina e no Grupo 4 realizou-se a formação de lesão periapical induzida devido ao não tratamento. Após 30 dias, os animais foram sacrificados e os dentes foram processados histologicamente. O infiltrado inflamatório, a espessura do ligamento periodontal e a presença de áreas de reabsorção foram similares para os Grupos 1 e 4. Os Grupos 2 e 3 foram similares entre si. Os autores concluíram que a endotoxina bacteriana foi capaz de causar a formação de lesão periapical e que o hidróxido de cálcio desintoxicou os lipopolissacarídeos *in vivo*.

Sukawat *et al.* (2002) compararam a eficácia de três formulações diferentes do hidróxido de cálcio usando espécimes de dentina humana que foram infectados com *Enterococcus faecalis*. Após a exposição de três formas de hidróxido de cálcio (hidróxido de cálcio misturado à água destilada, hidróxido de cálcio associado com clorexidine a 0,2%, hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol canforado) por sete dias, o pó de dentina dos espécimes infectados foi obtido e a concentração bacteriana foi analisada por espectrofotometria. Os resultados demonstram que a pasta de hidróxido de cálcio associada ao paramonoclorofenol canforado conseguiu eliminar toda a população de *Enterococcus faecalis* dentro dos túbulos dentinários. O resultado foi melhor do que o obtido com hidróxido de cálcio com água destilada ou com clorexidine a 0,2% ($p < 0,05$). A pasta de hidróxido de cálcio misturada com água destilada e a pasta de hidróxido de cálcio misturada com clorexidine a 0,2% foram inefetivos contra essa bactéria. A medicação intracanal mais popular é o hidróxido de cálcio, que apresenta pH 12. Os íons hidroxila, presentes no hidróxido de cálcio, podem destruir a membrana celular bacteriana. O hidróxido pode também dissolver debris teciduais e aumentar a resistência à reabsorção da superfície radicular. Os

ions hidroxilas (OH⁻) levaram cerca de sete dias para penetrar nos túbulos dentinários e atingir a superfície externa radicular.

3.4 Profundidade de penetração das bactérias nos túbulos dentinários

Kouchi *et al.* (1980) observaram por imunofluorescência, a capacidade de penetração nos túbulos dentinários dos *Streptococcus mutans* em canais radiculares abertos. A profundidade de invasão das paredes dos canais variava entre 439 – 524µm a um máximo de 1050 - 1150µm, dependendo da subespécie. Encontraram em outros estudos preliminares, microorganismos diferentes, capazes de penetrar mais profundamente do que os *Streptococcus mutans*.

Haapasalo e Orstavik (1987) desenvolveram um modelo a partir de dentina radicular bovina para reproduzir a infecção *in vitro* com *Enterococcus faecalis*. Utilizaram essa espécie bacteriana por ser um organismo facultativo altamente resistente, muito encontrado em lesões refratárias. Observaram a profundidade de penetração das bactérias nos túbulos dentinários e o efeito de descontaminação do hidróxido de cálcio e do paramonoclorofenol canforado em forma líquida e gasosa. Após três semanas de incubação, houve uma intensa infecção; as bactérias penetraram em um dia 400µm e, após três semanas, até 1000µm de profundidade na massa dentinária. O paramonoclorofenol canforado na forma líquida promoveu uma rápida redução bacteriana, porém só foi efetivo nas primeiras quatro horas. Para se obter a completa desinfecção dos espécimes foi necessário um dia. O paramonoclorofenol canforado na forma gasosa foi mais lento na desinfecção dos espécimes. Não houve eliminação dos *Enterococcus faecalis* nos espécimes tratados com hidróxido de cálcio, na dentina circopulpar (100µm), mesmo após 10 dias de incubação.

Meryon *et al.* (1990) estudaram a citotoxicidade e habilidade de penetração de três bactérias em dentina com e sem *smear layer*. Utilizaram bactérias orais comuns, como o *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus* (anaeróbias facultativas), *Corynebacterium* spp (aeróbia), visando observar sua capacidade de penetração e citotoxicidade em cultura de células subjacentes. Os organismos testes cresceram em cilindros de secção de dentina de 100µm e 500 µm durante 72 horas. Os cortes de dentina ficaram em contato com o meio de cultura tecidual revestido por uma camada de fibroblastos. A citotoxicidade e a capacidade de penetração nas secções de 100µm a 500µm foi mais rápida com o

Streptococcus sanguis, seguida pelos *Actinomyces viscosus* e pelos *Corynebacterium* spp. Em alguns espécimes os *Corynebacterium* spp não foram encontrados após 72 horas. As bactérias foram capazes de penetrar nos espécimes com e sem *smear layer*, permitindo concluir que os microorganismos podem dissolver o magma dentinário e crescer dentro dos túbulos. Os autores observaram que a citotoxicidade dessas bactérias parecia estar largamente dependente do número de bactérias presentes, explicando o aumento do efeito destrutivo sobre os tecidos com o tempo, devido à penetração e proliferação dos organismos.

Gutiérrez *et al.* (1990) avaliaram a efetividade dos agentes irrigantes sobre as bactérias que invadiram os túbulos dentinários. Três grupos de 10 incisivos superiores que haviam sido expostos ao meio bucal, foram irrigados com 9ml de água, solução fisiológica e irrigação alternada de hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio respectivamente. Observaram, em nível de microscopia eletrônica de varredura, a presença de cárie residual, remanescente de tecido necrótico, cavitação intertubular e cristais cúbicos de cloreto de sódio, os quais foram freqüentemente encontrados depositados no canal principal, em canais laterais e dentro dos túbulos dentinários. Este estudo abordou a importância do hipoclorito de sódio como solvente da placa dental e dos remanescentes de tecido necrótico, no tratamento endodôntico de dentes infectados que foram expostos ao meio bucal, visto que cristais cúbicos de cloreto de sódio foram encontrados dentro dos túbulos dentinários a uma distância de 80 a 220 μ m do canal principal.

Perez *et al.* (1993a) estudaram *in vitro* a capacidade de invasão e penetração de uma espécie de *Streptococcus sanguis*, usando dentina radicular de boi. Os autores afirmam que a presença persistente de bactérias no sistema de canais radiculares freqüentemente leva a falhas no tratamento endodôntico, pois os microorganismos podem, de fato, recolonizar os espaços que não são acessíveis à instrumentação, às substâncias irrigadoras, às medicações intracanal. Neste trabalho avaliaram a capacidade de penetração dessas bactérias nos túbulos dentinários radiculares *in vitro*, inoculando dentina bovina com uma variedade de *Streptococcus sanguis*, NCTC 7863. As amostras foram colhidas aos 10, 20 e 28 dias, e a penetração bacteriana nos túbulos foi avaliada com um microscópio eletrônico de varredura e com um microscópio ótico. Os resultados demonstraram que a profundidade de penetração dentro dos túbulos

foi de 792µm. Não observaram penetração bacteriana ao nível de cimento, mesmo após 28 dias. Acreditam não haver colonização bacteriana no cimento devido ao fato dos túbulos serem mais ocluídos nessa região. A maturidade da dentina e o tempo de incubação pareceram ser os fatores que mais influenciaram a capacidade de penetração das bactérias nos túbulos dentinários, principalmente pelo tamanho dos mesmos. Os *Streptococcus sanguis* foram capazes de colonizar a dentina no prazo de uma semana. Afirmaram também que outra espécie ideal para ser utilizada nesse tipo de experimento é o *Enterococcus faecalis*, que é uma das espécies mais difíceis de eliminar, sendo freqüentemente escolhida para testar a eficácia de soluções anti-sépticas. Os autores afirmam que existem três possibilidades para explicar o que ocorre com os microorganismos existentes nos túbulos dentinários após o tratamento endodôntico: pode permanecer inativos, morrer ou se multiplicar utilizando os debris orgânicos remanescentes no sistema de canais radiculares como substrato. As bactérias podem infiltrar-se no sistema de canais radiculares entre a parede dentinária e a obturação em apenas três dias, quando a superfície oclusal não é selada e podem atingir a região apical após 24 horas desse prazo.

Perez *et al.* (1993b) realizaram um estudo *in vitro* a respeito da penetração de três variedades de bactérias na dentina radicular: o *Streptococcus sanguis* que é um cocos Gram positivo anaeróbio facultativo, os *Actinomyces naeslundii* que é um bacilo Gram positivo anaeróbio facultativo e a *Prevotella intermedia* que é um bacilo Gram negativo anaeróbio estrito. Todas as três espécies foram cultivadas sob condições de anaerobiose. Utilizaram 26 dentes incisivos bovinos divididos em três grupos. Em cada grupo, nove incisivos foram seccionados, obtendo-se 36 blocos a partir de cada espécime, os quais foram incubados com uma suspensão bacteriana testada. Doze espécimes foram observados em nível de microscopia ótica e eletrônica de varredura após 10, 20 e 28 dias, medindo a profundidade de penetração bacteriana. Os *Streptococcus sanguis* penetraram 790µm, não sendo observada a migração das bactérias *Actinomyces naeslundii* e *Prevotella intermedia*; elas apenas concentraram-se sob a parede dos canais radiculares. A diferença da capacidade migratória das bactérias parece estar relacionada com fatores morfológicos, arranjos celulares e capacidade de agregação inter-bacteriana.

Gutknecht *et al.* (1996b) afirmam que o preparo químico cirúrgico associado à irrigação com hipoclorito de sódio reduz a flora microbiana em apenas 50%.

Folwaczny *et al.* (2002) afirmam que a permanência da camada de *smear layer* sobre as paredes dos canais radiculares obstrui a entrada dos canalículos dentinários, protegendo as bactérias do efeito antimicrobiano das soluções anti-sépticas. Entretanto, estudos têm demonstrado que no terço apical de dentes tratados convencionalmente, há permanência de tecido necrótico não removido completamente.

3.5 Histórico do laser

A emissão estimulada foi proposta em 1920 por Einstein *apud* Renson (1989). Porém, só houve o domínio da interação radiação-matéria após a segunda Guerra Mundial, quando se utilizou o radar.

Em 1955, Gordon *et al.* desenvolveram o MASER (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation* ou Amplificação de Microondas por Emissão Estimulada de Radiação). Em 1958, Schawlow & Townes estenderam os princípios da emissão estimulada da cadeia de microondas para as regiões dos raios infravermelhos e da luz visível do espectro eletromagnético (*apud* Lage-Marques, 1997).

O desenvolvimento do primeiro LASER, acrônimo de "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação), ocorreu em 1960 por Theodore H. Maiman, nos EUA. Foi utilizado um laser de rubi emitindo radiação laser com comprimento de onda de 694nm, cuja ação laser ocorria através do bombeamento óptico, método utilizado até hoje nos lasers de estado sólido (*apud* Lage-Marques, 1997).

Stern e Sognaes, em 1964, foram os primeiros estudiosos a pesquisar os efeitos da irradiação com o laser de rubi em tecidos dentais duros. Observaram, ao irradiar esmalte hígido, a ocorrência de formação de crateras, de carbonização, de fusão e de alterações cristalográficas. Quando a dentina foi exposta ao feixe laser houve carbonização. O laser de rubi não apresentou resultados promissores quando usado para irradiar tecidos dentais duros, porque esse comprimento de onda não é bem absorvido por estes tecidos (Gouw-Soares, 2001a).

Somente a partir da década de 70, com o surgimento do laser de argônio em 1972; e com o desenvolvimento das fibras óticas como meio de transmissão em 1975, houve o aperfeiçoamento desses equipamentos tornando-os mais acessíveis e confiáveis. Adrian em 1977 (*apud* Gouw-Soares, 1998) avaliou o efeito da aplicação do laser de Nd:YAG na polpa dental de macacos *rhesus*. Em 1978, surgiu o laser de Nd:YAG transmitido por fibra ótica (Maillet, 1987), possibilitando assim o seu uso não apenas em tecidos moles, mas também para realizar redução microbiana e promover o selamento de túbulos dentinários com potências relativamente baixas (Tanji *et al.*, 1997; Lage-Marques, 1997, Gouw-Soares *et al.*, 2001b).

Em 1971, Mester *et al.* descreveram pela primeira vez o uso de lasers em baixa intensidade nas aplicações médicas em cicatrização de feridas, estimulando o processo de regeneração do tecido humano e dessa maneira, introduzindo uma nova modalidade de terapia considerada como não invasiva, indolor e sem causar danos térmicos aos tecidos, que restabelecia a habilidade funcional devido às suas propriedades bioestimulativas, bioregeneradoras, anti-inflamatórias e analgésicas. A densidade de energia utilizada variou de 1–10J/cm², a bioestimulação é atribuída às interações fotoquímicas decorrentes de densidades de potência que variam de 0,01 a 50 W/cm², e longos tempos de exposição em torno de segundos, com modo de emissão contínuo (Zezell *et al.*, 2001).

3.6 Lasers em endodontia

Os estudos iniciais em endodontia resumiram-se ao uso empírico dos lasers disponíveis e ao exame das modificações teciduais provocadas por diferentes técnicas. A maioria das pesquisas avaliava o efeito da irradiação laser dentro dos canais radiculares, muitas vezes apenas como terapia suplementar.

Um dos primeiros estudos com lasers em endodontia foi realizado por Weichman *et al.*, em 1971. Os autores tentaram selar o forame apical do canal radicular externamente, usando os lasers de CO₂ e o de Nd:YAG, porém não obtiveram o resultado esperado. Weichman *et al.* em 1972, observaram mudanças químicas e físicas na dentina irradiada ao usar os mesmos comprimentos de onda (λ) associados com diferentes materiais, tentando selar internamente a constrição apical.

Diversos estudos *in vitro* foram realizados com o objetivo de observar a capacidade de promover o preparo do conduto radicular, utilizando diversos sistemas lasers tais como o excimer cloreto de xenônio – (Frentzen, 1992), o laser de Ho:YAG – (Cohen *et al.*, 1996) e o de Nd:YAG (Goodis, 1992). O resultado desses estudos foi desfavorável em diversos pontos. Houve um alto índice de fratura de fibras dentro dos canais radiculares, que não puderam ser removidas. Elevados níveis de energia foram necessários para tornar possível a remoção de estrutura dental com o uso de pontas de fibra ótica, resultando em danos térmicos severos aos tecidos vivos da região periradicular.

Técnicas de irradiação intra-radicular foram desenvolvidas, dentre elas a técnica preconizada por Matsumoto, em 1992, conhecida como técnica estacionária, introduzindo a fibra dentro do canal radicular a 1mm do ápice e em seguida no sentido ápice do dente para a região coronária, irradiando as paredes durante três segundos, a uma velocidade de aproximadamente 2mm/s, repetindo a operação quatro vezes, com intervalos de 20 segundos entre as aplicações. Essa técnica visa eliminar os microorganismos localizados na região de periápice (*apud Goya, 2001*).

A técnica preconizada por Gutknecht *et al.* (1996a), Gutknecht *et al.* (1996b) consiste em movimentos helicoidais iniciando-se do ápice em direção à coroa, com uma velocidade de aproximadamente 2mm/s, resultando em cerca de 6s para um canal de aproximadamente 12mm. Essa técnica procura irradiar toda a parede dentinária do canal radicular, considerando que todo o conduto apresenta contaminação microbiana.

Stabholz *et al.* (1998) afirmam que existem três regiões principais para utilização dos lasers em endodontia: o periápice, o sistema de canais radiculares e a dentina extra-radicular.

Gutknecht *et al.* (1996a) salientam que a terapia laser em alta intensidade apresenta diversos fatores positivos que merecem ser considerados: efeito antimicrobiano intracanal e dos tecidos circunjacentes, não ser citotóxico para o hospedeiro e de promover uma biomodulação tecidual melhorando a cicatrização do tecido irradiado. Realizaram um estudo *in vitro* utilizando o laser de Nd:YAG em 40 dentes preparados conforme a técnica clássica. Utilizaram uma fibra de 300µm para dentes anteriores e 200µm para dentes posteriores. O *Enterococcus faecalis* foi utilizado como organismo; teste por se tratar de uma

bactéria facultativa Gram positiva mais resistente que os bacilos freqüentemente encontrados na flora endodôntica. Foram utilizados 40 dentes, sendo 20 posteriores e 20 anteriores. Os anteriores foram preparados até o instrumento 60 e os posteriores até o instrumento 40. Cada canal foi inoculado com 10µl de suspensão de *Enterococcus faecalis* e incubado durante 24 horas a 37°C. Os canais foram irradiados com movimentos circulares lentos do ápice em direção à coroa, utilizando os seguintes parâmetros: 15Hz, 100mJ, 1,5W, durante quatro aplicações de 10 segundos de duração, com 20 segundos de intervalo entre elas. A energia de saída real foi de aproximadamente 60mJ. Os dentes do grupo controle não foram tratados com laser. Os autores obtiveram o selamento dos túbulos e canalículos e um índice de redução bacteriana mínimo de 97,12% e máximo de 99,97%, indicando que índices próximos podem ser obtidos *in vivo*.

Gutknecht *et al.* (1996b) realizaram um acompanhamento clínico e radiográfico durante um longo período, de 863 canais de 517 dentes tratados endodonticamente e irradiados com laser de Nd:YAG. Cerca de 68% dos pacientes haviam sido submetidos a meses de tratamento convencional sem sucesso, tratando-se de lesões refratárias. Tomadas radiográficas foram realizadas antes e durante a terapia endodôntica, depois de três, seis e 12 meses, e anualmente durante cinco anos. Utilizaram o laser de Nd:YAG modelo ADT d-lase 300, pulsado, com uma fibra de 200µm, com 1,5W de potência média, 15Hz de freqüência, visando remover a camada de *smear layer*, descontaminar o sistema de canais radiculares e obliterar os túbulos dentinários. Após o canal ter sido preparado até pelo menos uma lima 30, a fibra foi posicionada no comprimento de trabalho sem o laser estar ativado. Em seguida, o laser foi acionado e a fibra foi movimentada do ápice em direção à coroa em movimentos circulares. O procedimento foi repetido por mais três ou quatro vezes, não excedendo o tempo de 45 segundos. Para os casos de lesão mais extensa, o procedimento foi repetido mais duas ou três vezes com uma semana de intervalo entre as sessões. Os dentes foram selados sem a colocação de curativo intracanal. Os autores obtiveram uma taxa de sucesso de aproximadamente 82% dos casos.

Matsumoto (2000) afirma que os lasers podem ser utilizados para diversas aplicações na endodontia. Dentre elas, o diagnóstico de vitalidade pulpar com o uso do laser fluxometria Doppler com lasers de HeNe (632,8nm) e

semicondutores de diodo (780 a 820nm), baseado nas mudanças do fluxo sanguíneo das células vermelhas da polpa dental. Há um certo grau de dificuldade em determinar a vitalidade em dentes posteriores, onde a espessura de dentina e esmalte é maior. Isso não ocorre nos dentes anteriores. Esse método se constitui em um teste de vitalidade indolor, muito vantajoso para o uso em dentes com o ápice dental incompletamente formado, para dentes traumatizados e para pacientes com baixo limiar de dor. O laser de Nd:YAG pulsado também pode ser utilizado para realizar teste de vitalidade pulpar. Em polpas normais o laser de Nd:YAG pode ser usado com o parâmetro de 2W, 20 pulsos por segundo a uma distância de aproximadamente 10mm da superfície do dente. O estímulo doloroso dura cerca de 20 a 30 segundos e desaparece poucos segundos após cessar o estímulo. Afirma que os lasers de HeNe, de diodo semiconductor usados em baixa intensidade e o laser de Nd:YAG pulsado, podem ser utilizados para reduzir a hipersensibilidade dentinária. O laser de Nd:YAG pulsado pode ser usado para estimular pontos de acupuntura, com os parâmetros de 2W, 20pps durante um a dois minutos a 10cm do ponto de acupuntura. O mesmo pode ser recoberto com corante preto, porém o tempo de exposição será de apenas 10 segundos. Nos casos de sensibilidade suave ou média, a redução da dor é de aproximadamente 90 a 100%. Nos casos de dor severa, a redução não é menor do que 60%. O laser de CO₂ também pode ser usado nas mesmas modalidades que o de Nd:YAG, porém a efetividade será menor. Já os lasers de Nd:YAG, argônio, diodos semicondutores e Er:YAG podem ser utilizados no tratamento de capeamentos, mas a polpa deverá estar livre de contaminação bacteriana, e um curativo com hidróxido de cálcio. A taxa de sucesso é de aproximadamente 89%. O autor afirma que o laser de Er:YAG com os parâmetros de 8Hz e 2W pode ser usado para preparar canais radiculares quando associados às técnicas convencionais. Porém, cuidados são necessários para remover os debris da porção apical. O autor afirma que é impossível desinfetar completamente os canais radiculares sem desinfetar o tecido periapical adjacente. E que no futuro, a desinfecção com o laser será realizada combinando o uso do laser com certas drogas. O uso de solução de prata e amônio associada ao laser auxilia no processo de desinfecção do canal radicular, com os lasers de Nd:YAG, CO₂, diodo em alta intensidade e argônio. Um segmento de algodão

deve ser posicionado no 1/3 apical, evitando o escoamento da solução para a região periapical.

Antônio (2001) avaliou *in vitro* a capacidade de redução da população de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares infectados e irradiados com laser de Er:YAG. Foram utilizados 64 caninos superiores, que tiveram suas coroas extirpadas e o comprimento de trabalho padronizado em 15mm, o conduto foi preparado até a lima 40, utilizando como substância irrigadora o NaOCl a 0,5%, seguido de uma irrigação final com EDTA 17% e finalmente enxaguados com água ativada por ultra-som, sendo em seguida esterilizados em autoclave. Os espécimes foram inoculados com 10 μ l de suspensão bacteriana a 1,5X10⁸ ufc/ml de *Enterococcus faecalis* ATCC 2912 e incubados a 37°C, por 72 horas. A irradiação intracanal foi realizada com dois parâmetros de energia diferentes: 60mJ e 15Hz e 100mJ e 10Hz. A contagem das unidades formadoras de colônia foi realizada imediatamente e 48 horas após a irradiação. Como resultado, a autora encontrou importante redução bacteriana em ambos os parâmetros, no entanto, com o parâmetro de 60mJ e 15Hz a redução imediata foi de 99,95% e de 48 horas foi de 74,62%; e para o parâmetro de 100mJ e 10Hz a redução foi de 99,95% e 80,49% respectivamente. Embora resultados melhores tenham ocorrido com 100mJ de energia, a diferença entre os dois parâmetros não foi estatisticamente significativa. Dos 28 espécimes irradiados, em apenas dois não houve crescimento bacteriano. A contagem realizada 48 horas após a irradiação mostrou que os *Enterococcus* foram capazes de sobreviver e crescer, mesmo em pequeno número.

Eduardo e Gouw-Soares (2001a) descreveu as diversas aplicações do laser em endodontia, em baixa intensidade (LILT) e relatam que a terapia laser aumenta significativamente a taxa de sucesso dos procedimentos clínicos. A terapia laser em baixa intensidade tem a capacidade de produzir efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e biomoduladores acelerando o processo de reparação e propiciando ao paciente uma condição pós-operatória melhor. A irradiação laser em baixa intensidade pode reduzir a dor pós-operatória provocada pelo procedimento clínico, melhorando e acelerando o processo de cicatrização e oferecendo maior conforto ao paciente. Essa modalidade de tratamento pode ser útil quando utilizada após a obturação endodôntica e após a pulpotomia, irradiando o feixe diretamente na mucosa, na direção do

remanescente pulpar, ou na região da mucosa adjacente ao longo da polpa radicular remanescente ou ainda, na região apical submetida à cirurgia periapical (Gouw-Soares, 2001b).

Eduardo e Gouw-Soares (2001a) no mesmo trabalho, descreveram as diversas aplicações para o laser em endodontia em alta intensidade (HILT). Dentre elas, salientaram o uso da irradiação laser em alta intensidade sobre o tecido mole de modo desfocado, a fim de produzir um efeito similar à terapia laser em baixa intensidade. Como exemplo citam o uso do laser de Nd:YAG em alta intensidade, com parâmetros de 1,5W; 15Hz, 100mJ no modo desfocado, com uma fibra ótica irradiando a uma distância de 10 a 15mm do tecido alvo, podendo ser usado após pulpotomia, pulpectomia, procedimentos de obturação endodôntica e cirurgias periapicais. Afirmam em seu trabalho, que o tratamento com lasers em alta intensidade, têm densidades de potência típicas variando em torno de 10 a 106W/cm², baseando-se na produção de efeitos térmicos que poderão ser induzidos pelo uso de radiação contínua ou pulsada. De acordo com o comprimento de onda, a irradiação laser pode ser usada em tecido dental duro: no conduto radicular ou na superfície de corte após a apicetomia, promovendo mudanças estruturais da superfície, removendo a camada de *smear*, com o *melting* e a recristalização da dentina ou ainda expondo os túbulos dentinários. Estudos prévios realizados na área de endodontia, usando lasers de diferentes comprimentos de onda em alta intensidade, demonstram a eficiência do efeito térmico no processo de ablação de tecido dental duro em apicetomia, da capacidade de redução bacteriana no sítio cirúrgico e em canais contaminados. Isso tem sido considerado como uma grande vantagem sobre os procedimentos tradicionais de desinfecção do sistema de canais radiculares (Gouw-Soares 2001a, Gouw-Soares 2001b). Portanto, o uso dos lasers em alta intensidade como o Nd:YAG, Er:YAG, Ho:YAG, TEA, CO₂ no comprimento de onda 9,6µm, diodo e dos lasers em baixa intensidade, podem ser considerados como potenciais ferramentas coadjuvantes às terapias endodônticas (Eduardo e Gouw-Soares 2001a, Eduardo e Gouw-Soares 2001b; Gouw-Soares 2001a, Gouw-Soares 2001b).

Os autores relatam que o desenvolvimento do sistema de entrega do feixe laser através de fibras óticas com aberturas laterais ou que apresente uma ponta de formato esférico, permitirá um aumento na efetividade do feixe laser que

incidará em um ângulo perpendicular às paredes dentinárias do canal radicular (Gutknecht, 1996b; Eduardo e Gouw-Soares, 2001). Outra indicação do uso dos lasers em alta intensidade é o tratamento de reabsorção interna radicular. Os mesmos autores afirmam que os lasers situados na região do infra-vermelho próximo ao comprimento de onda de 1.064 μ m (Nd:YAG) são altamente absorvidos pela melanina e hemoglobina. Por essa razão, seu efeito térmico tem a capacidade de vaporizar tecidos moles pigmentados, permitindo dessa maneira, a remoção do tecido de granulação presente nas áreas de reabsorção interna dos canais radiculares. Em adição, a desinfecção pode ser alcançada simultaneamente em canais contaminados, pelo efeito térmico da irradiação laser em alta intensidade.

Eduardo e Gouw-Soares (2001a), Eduardo e Gouw-Soares (2001b), Gouw-Soares *et al.* (2001a), Gouw-Soares *et al.* (2001b) relatam que estudos *in vitro* de apicectomias usando irradiação laser têm sido conduzidos, a fim de obter uma superfície de corte dentinário mais regular e menos permeável, por meio da fusão e recristalização da superfície dentinária, vedando os túbulos dentinários. Além da capacidade de corte apical que alguns comprimentos de onda apresentam, por meio do processo de ablação, o laser também é capaz de produzir efeito de biomodulação, estimulando a atividade celular, favorecendo o processo de reparação tecidual e promove redução microbiana no sítio cirúrgico.

3.7 Interação do laser com o tecido X cuidados com aumento térmico

Miserendino *et al.* (1995) descreveram que a composição dos sistemas biológicos é constituída a partir de uma complexa e variada rede de elementos celulares e fluidos teciduais, cada um com diferentes características de absorção ótica, sendo constituídos primariamente por água. Denominamos de cromóforos os componentes teciduais que exibem um alto coeficiente de absorção por um determinado comprimento de onda ou espectro de energia luminosa. Essa capacidade que os cromóforos apresentam de absorver energia de um específico comprimento de onda, permite que ocorram interações únicas entre o laser e os vários elementos teciduais. Em comprimentos de onda como o do Nd:YAG e do diodo, a água é praticamente transparente, ocorrendo uma maior penetração tecidual. Kutsch (1993) concluiu que a profundidade de penetração da energia do

laser em um determinado tecido depende dos coeficientes de absorção e espalhamento do comprimento de onda.

Miserendino *et al.* (1995) observaram que as interações do laser com os tecidos apresentam uma íntima dependência com: comprimento de onda, densidade de potência do feixe laser, características temporais do feixe energético, modo de entrega contínuo ou pulsado (quando pulsado se faz necessário observar a taxa de pulso e a sua duração). Alguns outros fatores podem influenciar, tais como: o método de transferência de energia, os meios de entrega utilizados (se no modo contato ou não contato e se o feixe é usado focado ou desfocado). Outros fatores importantes a serem considerados referem-se às propriedades dos tecidos alvo, como: capacidade de absorção, reflexão, transmissão e efeitos de espalhamento. Diversos tipos de respostas resultam da exposição do tecido ao feixe laser, dependendo da densidade de potência empregada, por exemplo, geralmente emissões de luz laser em relativa baixa intensidade e longa duração serão menos destrutivas e induzirão efeitos em nível molecular e/ou celular, produzindo efeitos fotoquímicos. Quando usamos fluências mais altas (densidade de energia) e tempos de exposição menores, teremos interações fototérmicas. É nesse tipo de interação que se situa a maior parte das aplicações cirúrgicas usadas na odontologia.

Nas interações fototérmicas, a energia da radiação luminosa absorvida pelas substâncias teciduais e por moléculas, será transformada em outra forma de energia, o calor que produzirá efeitos sobre o tecido exposto. A quantidade da energia laser absorvida pelo tecido depende de um número de fatores que incluem o comprimento de onda e os parâmetros utilizados, que serão determinados pelo tamanho do *spot size*, densidade de potência, duração do pulso e frequência, tempo de exposição, as propriedades óticas e a composição do tecido alvo (Zezell *et al.*, 1995; Zezell *et al.*, 1999).

As interações térmicas são altamente dependentes do comprimento de onda, porque a quantidade de calor gerada no tecido é determinada pela extensão da absorção do feixe laser. Portanto, o uso seguro de um sistema laser deverá ser baseado no conhecimento da interação biológica dos tecidos alvos com o comprimento de onda a ser utilizado, evitando dessa maneira o estabelecimento de indesejáveis danos térmicos (Eduardo e Gouw-Soares, 2001a, Eduardo e Gouw-Soares 2001b).

O aquecimento da superfície externa radicular acima de 10°C durante mais de um minuto deve ser evitado, pois este é o nível limiar de sobrevivência do ligamento periodontal e do tecido ósseo, (Eriksson e Albrektsson, 1983), o que pode provocar a anquilose do cemento ao osso alveolar e reabsorção radicular externa (Carruth *et al.*, 1986; Bachmann *et al.*, 2000b; Gouw-Soares *et al.*, 2001a, Gouw-Soares *et al.*, 2001b, Gouw-Soares *et al.*, 2001c; Eduardo e Gouw-Soares, 2001a, Eduardo e Gouw-Soares, 2001b).

Manni em 2000, afirma que o laser de diodo é um dos lasers que apresenta maior comprimento de absorção ou penetração nos tecidos biológicos, devido à sua pequena absorção pela água, hidroxiapatita e demais cromóforos que compõem o tecido. O espectro de absorção dos diferentes tecidos, em função do comprimento de onda, revela variações notáveis no percentual de energia absorvida.

Os lasers de diodo são mal absorvidos pela estrutura dental, permitindo a execução segura de cirurgias em tecido mole situado próximo ao esmalte. Contudo, seu uso em tecido ósseo é contra-indicado e cuidados são necessários em cirurgias realizadas em proximidade ao tecido ósseo como, por exemplo, nas frenectomias. Os implantes também absorvem prontamente a energia laser. Contatar a ponta da fibra com o implante pode resultar em depressões no implante e no seu fracasso. O diodo é um excelente laser cirúrgico para tecidos moles, podendo ser usado para corte, coagulação e curetagem de mucosa e gengiva e para debridamento sulcular. Porém cuidados devem ser tomados no modo de emissão contínua, devido ao rápido aumento térmico do tecido alvo. Todos os comprimentos de onda do diodo são altamente absorvidos por tecido pigmentado nos tons de marrom e preto. Porém a hemostasia não é tão rápida quanto à obtida com o laser de Argônio, pois a absorção em tecidos onde há predominância do pigmento vermelho é menor com o laser de diodo do que no laser de Argônio (Klim *et al.*, 2000).

Wymann *et al.* (1992), Klim *et al.* (2000) afirmam que o laser de diodo apresenta interações teciduais semelhantes a do Nd:YAG, porém com um poder de penetração superior especialmente aqueles próximos ao comprimento de onda de 800nm. Um equipamento com essas características, pode ser capaz de descontaminar a massa dentinária do sistema de canais radiculares em

profundidade, proporcionando um alto índice de descontaminação microbiana (Gutknecht *et al.*, 2000a, Gutknecht *et al.*, 2000b).

Folwaczny *et al.* (2002) em um estudo *in vitro* avaliaram os efeitos antimicrobianos da irradiação com o laser de Nd:YAG, sem o uso de iniciadores frente a dois diferentes tipos de bactérias: *Escherichia coli* (bastonetes Gram negativos) e *Staphylococcus aureus* (cocos Gram positivos) com monitoramento térmico dos parâmetros utilizados. Concluíram que a redução bacteriana com o uso do laser de Nd:YAG depende da energia de radiação e da espécie bacteriana, mas que também pode causar aumentos térmicos consideráveis, visto que maiores tempos de exposição foram necessários para reduzir os *S. Aureus* do que para a *E. Coli*, indicando diferenças quanto à suscetibilidade da exposição ao calor entre ambas as espécies. A resistência do *S. Aureus* contra a desidratação parece ser maior quando comparada com a *E. Coli*, indicando diferenças de resistência ao aumento térmico entre as duas espécies. Os autores afirmam ainda que devemos levar em conta o potencial particular da capacidade de penetração das bactérias nos túbulos dentinários, dificultando sua remoção do sistema de canais radiculares. Outro fator a ser considerado é quanto aos diferentes tipos de pigmentação das paredes celulares das bactérias, tornando-as menos ou mais suscetíveis ao efeito da irradiação de um determinado comprimento de onda. Apesar dos outros fatores acima mencionados a *E. coli* foi mais resistente, porque o *Staphylococcus aureus* produz um pigmento amarelo dourado similar ao caroteno, o que tornou mais suscetível a irradiação laser do Nd:YAG. A *E. coli* não produz nenhum tipo de pigmento, tornando-a mais resistente do que aquele aos efeitos antimicrobianos desse comprimento de onda.

3.8 Redução microbiana com laser de diodo em endodontia

Diversos estudos associando sistemas lasers ao tratamento convencional provaram que ele são efetivos para limpar e descontaminar a luz do canal e os túbulos dentinários, os quais não são totalmente acessíveis ao tratamento convencional, podendo tornar-se um refúgio para os microorganismos (Matsumoto, 1992; Gutknecht *et al.*, 1996a, Gutknecht *et al.*, 1996b, Gutknecht *et al.*, 1997; Moritz *et al.*, 1997a, Moritz *et al.*, 1997b).

Moritz *et al.* (1997a) realizaram o primeiro estudo *in vitro* utilizando um laser diodo de 810nm, com as seguintes características: potência variável de

0,5W a 15W, taxa de pulso de 2 a 32ms, podendo ser operado no modo contínuo (cw) ou interrompido, frequência variável de 1,5 a 250Hz, com um laser guia de HeNe de 1mW e 533nm. Neste estudo examinou-se a redução bacteriana nos canais radiculares com o uso do laser de diodo de 810nm. Os canais radiculares de 44 dentes extraídos foram endodonticamente preparados, esterilizados e inoculados com *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*. Quando o dente foi irradiado com 4W, com tempo de exposição de cinco segundos em cinco aplicações, não se observou o crescimento bacteriano. Exames de espectroscopia na faixa do infravermelho revelaram que a irradiação de 4W, em movimentos circulares, resultou em um aumento máximo da temperatura de 6°C nas superfícies radiculares. Testes de penetração de corantes e exames no microscópio eletrônico de varredura revelaram o completo fechamento dos túbulos dentinários das paredes irradiadas dos canais radiculares. Os autores afirmam ainda que o grau de redução microbiana é equivalente ao obtido com o laser de Nd:YAG.

Moritz *et al.* (1997b) realizaram um estudo *in vivo* utilizando o laser de diodo associado ao tratamento endodôntico de 40 pacientes com canais unirradiculares infectados; os canais foram preparados até a lima 40, seguidos da irradiação do laser de diodo de 810nm em quatro consultas, conduzida por fibra ótica de 400µm, no modo pulsado, com 2W, 50Hz, em cinco aplicações de cinco segundos com pequeno intervalo entre elas. Para confirmar os resultados, testes microbiológicos antes e depois do tratamento foram realizados, e os resultados comparados com aqueles obtidos com o tratamento antibacteriano convencional. Como resultado obtiveram elevados graus de redução microbiana.

Gutknecht *et al.* (2000a), Gutknecht *et al.* (2000b), investigaram em um estudo *in vitro* o efeito bactericida em profundidade do laser de diodo. Utilizaram secções longitudinais de dentina radicular bovina de 100µm, 300µm e 500µm que foram esterilizadas, inoculadas em um lado com uma suspensão de *Enterococcus faecalis* e irradiadas no lado oposto. A irradiação foi realizada com o laser de diodo de 810nm, em modo contínuo, com uma fibra de 400µm, em uma angulação de 5° com a superfície, por um período de 30 segundos. A potência utilizada no display do aparelho foi de 3W. Realizaram a diluição, semeadura em placas de Agar sagüis e contagem bacteriana. Obtiveram uma redução bacteriana

de aproximadamente 97% em cortes de 100 μ m e de 74% em cortes longitudinais de 500 μ m.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Características do laser de diodo de alta potência emitindo em alta intensidade Opus 10 – Opus Dent

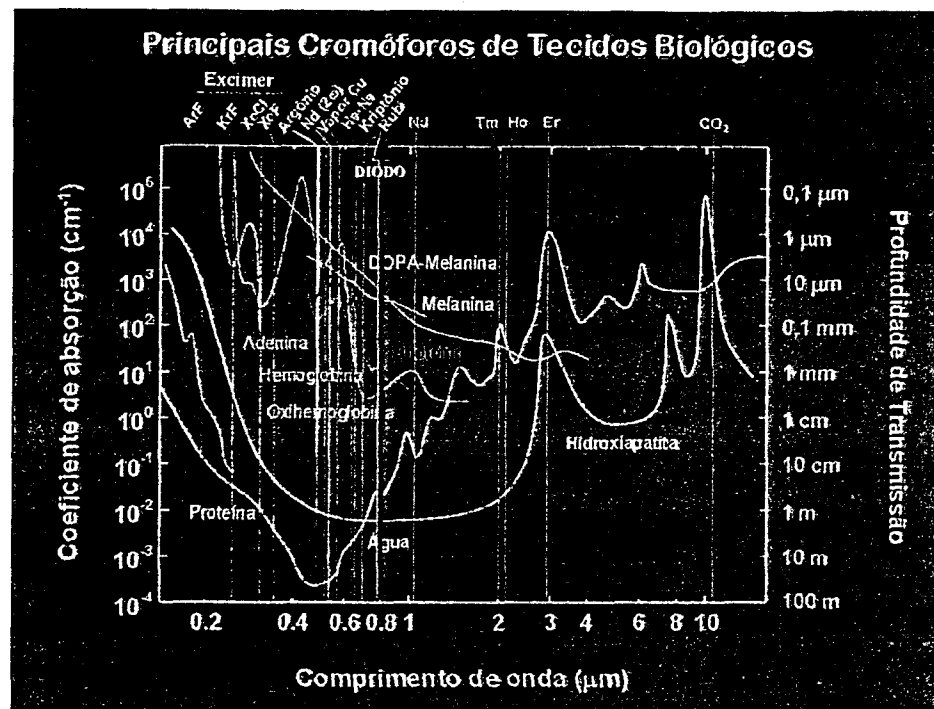
O aparelho utilizado nesta pesquisa, apresenta as seguintes características: conector de intertrava remoto, chave de controle, sistema de controle totalmente computadorizado, microprocessador, painel sensível ao toque, indicador de laser disponível, indicador visível e audível durante a emissão laser, localização dos controles, medidor de nível de radiação laser, proteção contra características de saída incorreta do feixe, indicador de alvo (luz laser guia), reinício manual, dimensões de 24cm X 38cm X 11cm, peso: 7,5Kg. Classificação quanto à proteção a choque elétrico: equipamento classe 1. (FIG. 2), (TAB. 1)

Dentro das informações ofertadas pelo fabricante encontra-se um manual de operação, constando instruções suficientes para a sua montagem, manutenção e utilização segura. Consta nele a declaração em unidade apropriada sobre a divergência do feixe, duração de pulso, potência máxima emitida, reprodução legível de todos os rótulos e avisos de perigo e sua localização correta, indicação de todas as localizações de aberturas para laser, relação de controles, ajustes e procedimentos de operação e manutenção; informações quanto ao manuseio da fibra óptica quando necessária; recomendações quanto ao exame da qualidade do feixe mira; informações sobre o perigo da utilização quanto a líquidos e gases inflamáveis; indicações quanto à eliminação de gases e fumaças produzidas pelo uso do laser; indicações da necessidade do uso de uma proteção ocular apropriada.

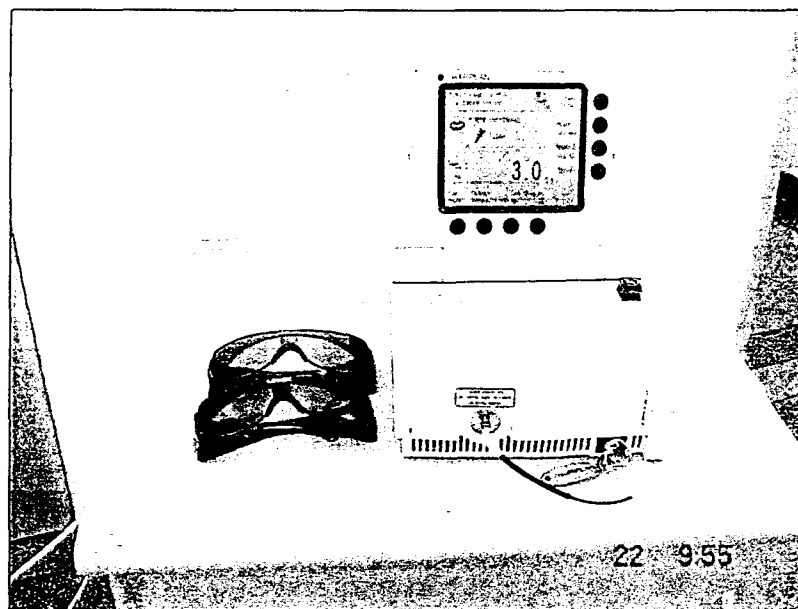
O profissional deve observar os seguintes itens ao utilizar esse laser de diodo em alta intensidade: uso de conector de intertrava remota na porta, visando o desligamento do aparelho caso ocorra entrada de pessoas não protegidas devidamente na sala de atendimento durante o uso do laser; uso da chave de

controle prevenido e evitando o acesso de pessoas não autorizadas ao equipamento; utilização de placas de advertência fixadas na entrada da sala onde o equipamento laser será utilizado. As janelas deverão possuir cortinas, o uso de espelhos e lentes deve ser evitado, impedindo assim reflexões especulares. O Cirurgião Dentista deverá evitar a ocorrência da contaminação atmosférica que é decorrente da vaporização de materiais nocivos durante a utilização do laser, utilizando-se de sucores de alta potência. O alinhamento dos componentes ópticos no caminho do feixe de classe 4 deve ser verificado inicialmente e periodicamente (Nunez, 2002).

O feixe laser é emitido apenas através de fibras ópticas e diverge em um ângulo amplo, devido a esse fator. A densidade de potência torna-se baixa a poucos centímetros da ponta da fibra. Entretanto, todos os cuidados necessários relativos à radiação devem ser tomados. Precauções contra exposição acidental ao feixe laser e à sua reflexão devem ser tomadas com o uso de óculos de proteção para paciente, auxiliar e profissional. Não se deve olhar para o feixe do laser e sua incidência em superfícies reflexivas precisa ser evitada. O laser não deve ser usado em presença de anestésicos inflamáveis, óxido nitroso e oxigênio inalável. O comprimento de onda desse laser é de 830nm (\pm 5nm), situando-se na faixa do infravermelho próximo. Invisível aos olhos humanos, pode causar queimaduras de terceiro grau e danos aos olhos. Esse comprimento de onda pode ser usado em desinfecção de canais radiculares, procedimentos de curetagens, clareamentos dentais, e pequenas cirurgias orais.



"FIGURA 1- Espectros de absorção dos principais cromóforos dos tecidos biológicos (Maldonado, 2000)".



"FIGURA 2 – Laser de diodo de alta potência emitindo em alta intensidade da Opus 10- Opus Dent**".

* O laser de diodo Opus 10 (Opus Dent, Israel), foi gentilmente cedido ao LELO – FOU SP pela Opus Dent em parceria para o desenvolvimento de pesquisas

"TABELA 1" – Informações técnicas sobre o laser de diodo em alta intensidade Opus 10".

ESPECIFICAÇÕES DO LASER DE DIODO OPUS 10

Tipo do Laser	cw, laser de diodo de GaAlAs
Comprimento de Onda	830 ± 25 nm
Potência	0,5 – 10 W
Modos de Exposição Tecidual	Contínuo, único e repetição
Limite de Tempo Utilizável	1 – 1000 sec
Limite de Energia	10J/pps
Feixe Guia	3 mW, diodo vermelho
Fibras Óticas	300 e 360 µm de diâmetro ou largura
Conector da Fibra	SMA 905
Requisitos Elétricos	Fase única, 50 – 60 Hz, 200 VA, 90 – 260 Vac. Seleção automática de voltagem. O sistema pode ser plugado em alguma saída principal sem precisar de qualquer ajuste de voltagem
Dimensões	24 cm X 38 cm X 11 cm
Peso	7 Kg

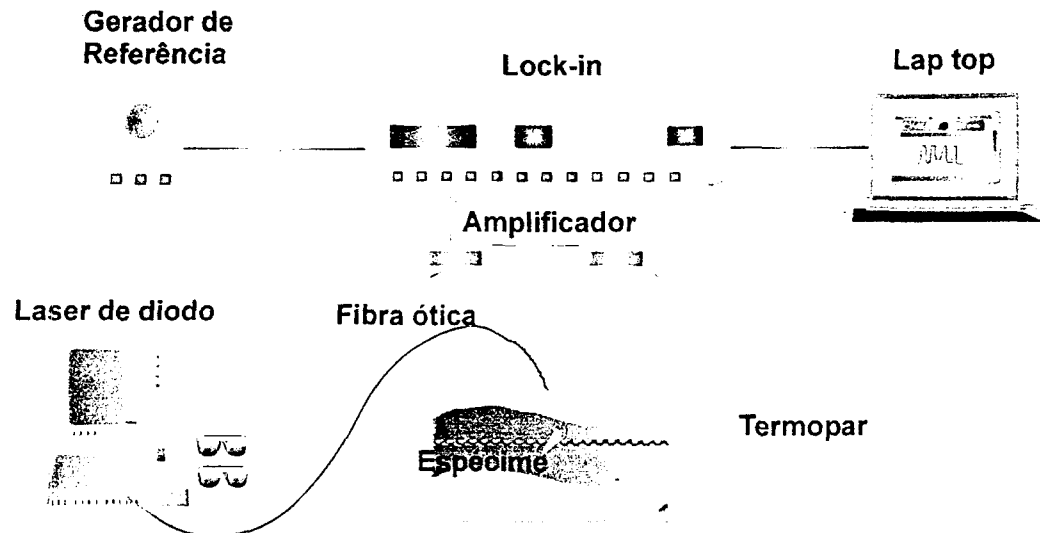
4.2 Métodos

4.2.1 Estudo prévio do efeito térmico durante a irradiação intracanal com laser de diodo

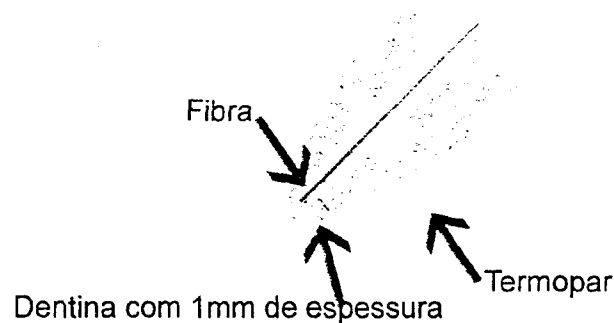
Para a escolha dos parâmetros de potência utilizados no experimento foi realizado um estudo prévio avaliando o aumento de temperatura na superfície externa radicular durante a irradiação com o laser de diodo, uma vez que autores (Eriksson e Albrektsson, 1983) demonstram que aumentos térmicos superiores a 10°C podem provocar danos térmicos irreversíveis ao ligamento periodontal, reabsorção externa radicular e anquilose.

Para tanto, foram usados 10 dentes humanos incisivos superiores monoradiculados, extraídos com ápice completamente formado, provenientes de doação de pacientes atendidos em Clínica Particular. Os dentes foram mantidos hidratados em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. O preparo foi realizado até o instrumento 40, sendo usadas na seqüência as brocas Gates-Glidden 1 e 2 nos terços médio e cervical. Os condutos foram secos com cone de papel absorvente 40, os corpos de prova identificados e seu comprimento de trabalho registrado.

Utilizou-se um termopar do tipo K, constituído por uma liga de cranel-alumel, com 135µm de diâmetro (Omega Engineering, Inc., Stanford, CA). O dispositivo foi fixado ao cimento na região de 1/3 apical, a 1mm do ápice anatômico no comprimento de trabalho, com uso de cola super-bonder, para maior contato entre o cimento e a extremidade do termopar. Um sistema composto por um lock-in (5RS10 Stanford Research System) e por um software apropriado realizando a integração da temperatura originária da variação na corrente do termopar foram utilizados para registrar a temperatura (FIG. 3 e 4) (Cohen *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1998; Bachmann, 2000a, Bachmann, 2000b; Gouw-Soares *et al.*, 2001c).



"FIGURA 3 - Arranjo experimental para determinação do perfil térmico durante a irradiação no terço apical".



"FIGURA 4 – Esquema demonstrando o posicionamento do termopar".

4.2.1.a Irradiação

A técnica de irradiação intra-radicular utilizada neste trabalho foi a preconizada por Gutknecht *et al.* em 1996, denominada de técnica helicoidal (FIG. 5). Utilizou-se o laser de diodo em alta intensidade OPUS 10 (FIG. 2) no modo de emissão contínuo, com uma fibra de 360 μ m de diâmetro, que foi clivada antes da irradiação de cada corpo de prova. A potência emitida na extremidade da fibra foi sempre aferida por meio de um medidor de potência e energia da *Newport*. (FIG. 6)

Os seguintes parâmetros foram utilizados:

Grupo 1:

- a. O espécime irradiado com potência de 0,38W, densidade de potência de $0,373\text{KW}/\text{cm}^2$, durante quatro irradiações de 10 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.
- b. O espécime irradiado com potência de 0,37W, densidade de potência de $0,364\text{KW}/\text{cm}^2$, durante quatro irradiações de 10 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.

Grupo 2:

- a. O espécime irradiado com potência de 1,95W, densidade de potência de $1,916\text{W}/\text{cm}^2$, durante quatro irradiações de 10 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.
- b. O espécime irradiado com potência de 2,03W, densidade de potência de $1,994\text{KW}/\text{cm}^2$, durante quatro irradiações de 10 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.

Grupo 3

- a. O espécime irradiado com potência 2,5W, densidade de potência de $2,456\text{KW}/\text{cm}^2$ durante quatro irradiações de 10 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.
- b. O espécime irradiado com potência de 2,54W, densidade de potência de $2,495\text{W}/\text{cm}^2$ durante quatro irradiações de 10 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.

Grupo 4

- a. O espécime irradiado com potência de 2,9W, densidade de potência de $2,849\text{KW}/\text{cm}^2$, durante quatro irradiações de nove segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.
- b. O espécime irradiado com potência de 3,1W, densidade de potência de $3,046\text{W}/\text{cm}^2$, durante quatro irradiações de 10 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.

Grupo 5

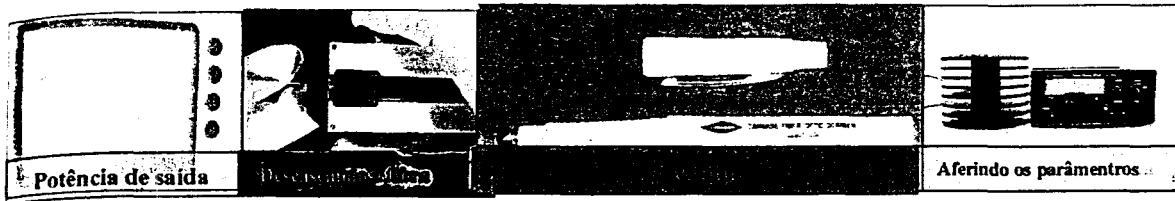
- a. O espécime irradiado com potência de 3,6W, densidade de potência de 3,537W/cm², durante quatro irradiações de 11 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas:
- b. O espécime irradiado com potência de 3,6W, densidade de potência de 3,537W/cm², durante quatro irradiações de 11 segundos cada, com intervalo de 20 segundos entre cada uma delas.

"TABELA 2 - Dados referentes à irradiação com monitoração de temperatura no terço apical com termopares".

Grupo	Potência (W)	Comprimento de trabalho (mm)	Δ tempo	Espessura do remanescente dentinário (mm)	Intensidade (KW)
1	0,38W	21 mm	10 s.	1 mm	0,373KW/ cm ²
	0,37W	20,5 mm	10 s	1 mm	0,364KW/ cm ²
2	2,03W	19 mm	10 s	1 mm	1,994KW/cm ² .
	1,95W	21,0 mm	10 s	0,5 mm	1916 KW/ cm ²
3	2,5W	19 mm	10 s	1 mm	2,456KW/cm ²
	2,54W	19 mm	10 s	2 mm	2,495KW/cm ²
4	2,9W	18 mm	09 s	2 mm	2,849KW/cm ²
	3,1W	19,5 m	10 s	1 mm	3,046KW/cm ²
5	3,6W	22,5 mm	11 s	1 mm	3,537KW/ cm ²
	3,6W	22 mm	11 s	0,5 mm	3,537KW/ cm ²



"FIGURA 5 – Técnica de irradiação helicoidal ou de Gutcknecht".

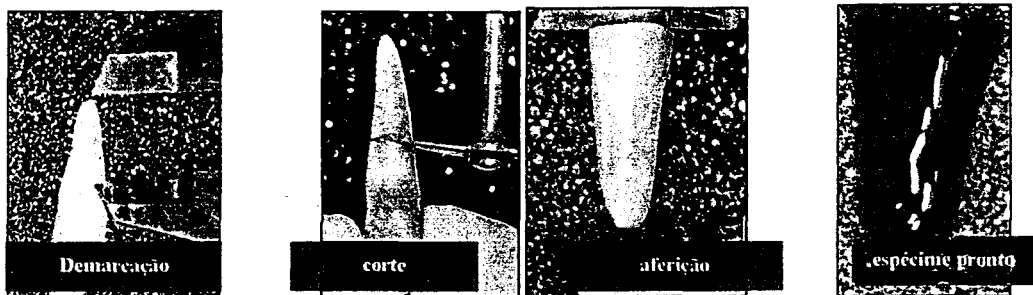


“FIGURA 6 – Preparo, aferição da fibra e dos parâmetros no medidor de potência e energia”.

4.2.2 Avaliação da redução bacteriana de canais infectados e irradiados com laser de diodo

4.2.2.1 Preparo do espécime

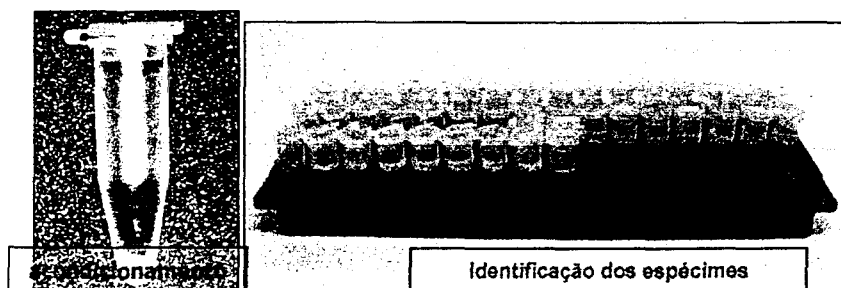
Foram utilizados 82 dentes humanos incisivos superiores monoradiculados, recém extraídos com ápice completamente formado, provenientes de doação de pacientes atendidos em consultório particular*. Os dentes foram mantidos hidratados em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%. As coroas foram separadas das raízes com o uso de disco diamantado para porcelana, montado em peça de mão reta. Para padronizar as amostras radiculares, os espécimes tiveram sua porção cervical desgastada até que as raízes ficassem com 11mm. Utilizou-se um paquímetro de semi-precisão para conferir e padronizar o tamanho das amostras. (FIG. 7) A superfície radicular foi raspada e alisada com curetas periodontais tipo Gracey 5/6, a fim de remover resíduos de ligamento periodontal e tártaros. Na seqüência realizou-se uma profilaxia com pedra pomes e taça de borracha.



“FIGURA 7 – Preparo do espécime”.

*Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e pelo Instituto Pesquisas Energéticas e Nucleares.

A odontometria das amostras foi fixada em 10mm, 1mm aquém do vértice anatômico; os condutos foram alargados até a lima 40, com o uso concomitante de brocas Gates-Glidden números 1 e 2, utilizadas nos terços médio e cervical. Como substância irrigadora utilizou-se o hipoclorito de sódio a 1%, seguido do EDTA a 17% durante quatro minutos (Haapasalo *et al.*, 1987; Perez *et al.*, 1993), a fim de remover o "smear layer" e expor os túbulos dentinários, desta maneira facilitando a penetração bacteriana. Em seguida, os condutos foram lavados com água ativada por ultra-som, (Perez *et al.*, 1993) com auxílio de uma ponta periodontal para realizar a remoção das substâncias químicas residuais do interior do canal, (Antônio, 2001). O ápice radicular foi selado na região externa com cola super bonder (Lage-Marques, 1997). A superfície externa radicular foi impermeabilizada com duas camadas de esmalte de unha (Haapasalo *et al.*, 1987). Na seqüência, os espécimes foram individualmente acondicionados em tubos tipo Eppendorf (tubos de polipropileno), identificados (FIG. 8) e depois esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121°C, (Antônio, 2001). (FIG. 8.1)

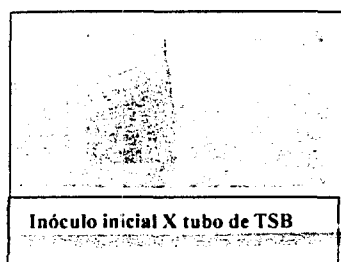


"FIGURAS 8 e 8.1 - Acondicionamento e identificação dos espécimes nos tubos eppendorf".

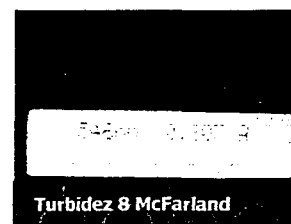
4.2.2.2 Preparo do inóculo bacteriano

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *Enterococcus faecalis*. A seqüência microbiológica do estudo foi processada no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, (ICB). Obteve-se a cepa de *Enterococcus faecalis* ATCCC 29212 (Haapasalo *et al.*, 1987) a partir do estoque do microrganismo em glicerol a 40%, mantido à temperatura de -20°C. Esta temperatura impede o crescimento bacteriano e o glicerol impede o congelamento do líquido, mantendo a bactéria viável. O preparo do inóculo inicial foi

obtido adicionando-se 80µl do estoque da suspensão original em 3ml de TSB. A cultura foi mantida a 37°C, até que o crescimento bacteriano da suspensão atingisse uma turbidez igual à escala 8 de McFarland ou atingisse a densidade óptica de 0,8, aferida em espectrofotômetro a 546nm de absorvância, que equivale a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidade formadora de colônia por ml (u.f.c./ml). Essa concentração bacteriana da suspensão foi a utilizada para inocular os canais radiculares. (FIG. 9, 10, 10.1, 10.2)



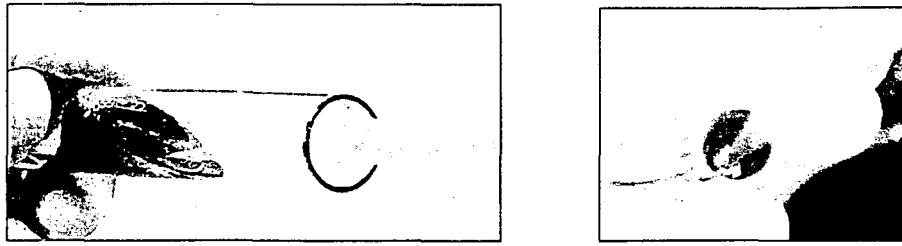
"FIGURA 9 – Inóculo inicial".



"FIGURAS 10, 10.1, 10.2 - Espectrofotômetro: processo para obtenção da suspensão bacteriana".

4.2.2.3 Inoculação das amostras

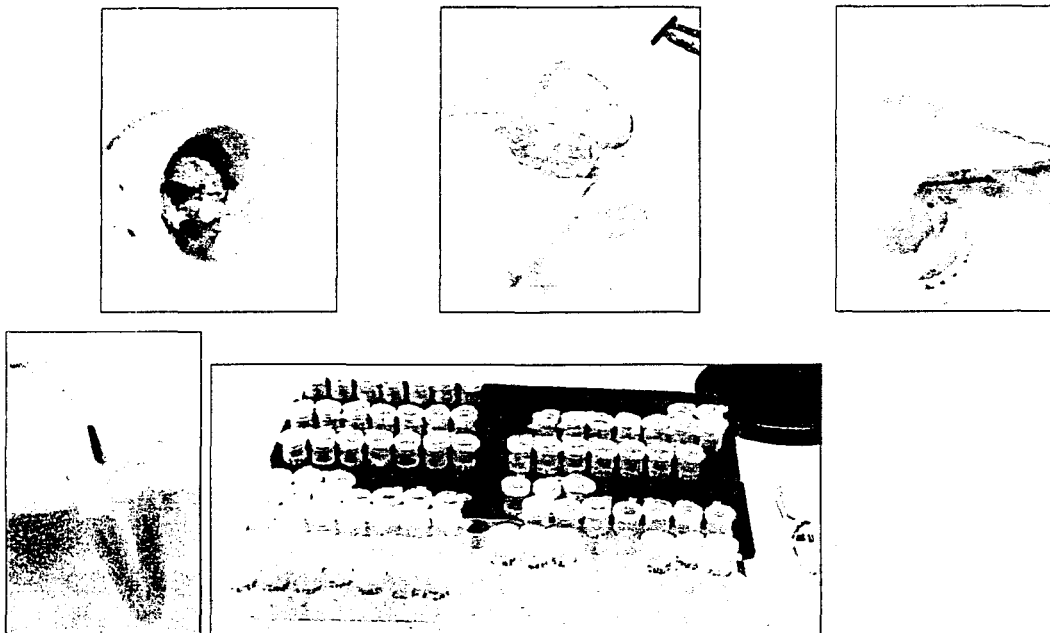
Após a esterilização das amostras, os canais foram secos com cones de papel previamente esterilizados; em seguida, inoculados com 10µl de suspensão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml, com o uso de micropipeta de precisão. As amostras inoculadas foram mantidas em estufa a 37°C por 72 horas, possibilitando a penetração das bactérias no interior dos túbulos dentinários. A cada 24 horas foi colocado 10µl de TSB com auxílio de uma micropipeta nas amostras, simulando as condições encontradas *in vivo*. (FIG. 11)



"FIGURA 11- Inoculação do espécime".

4.2.2.4 Irradiação laser dos espécimes contaminados

Antes da irradiação, o canal foi seco com cone de papel 40, durante 30 segundos, removendo o conteúdo da luz do canal. Na seqüência, depositou-se no canal outro cone umedecido em solução fisiológica, durante 30 segundos e transferido para um tubo de ensaio contendo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, USA), o qual foi mantido em estufa para realizar a comprovação da presença de bactérias no sistema de canais radiculares pelo teste da turbidez. (FIG. 12)



"FIGURA 12 – Teste da turbidez".

A irradiação das amostras foi realizada no Laboratório Experimental de Lasers em Odontologia (LELO) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, utilizando o Laser de Diodo de alta potência Opus 10 da OpusDent, (FIG.2) com comprimento de onda 830nm, com uma fibra de 360 μ m de diâmetro.

As amostras foram transportadas até o laboratório, no interior de tubos Eppendorf, em caixas fechadas, abertas somente no momento da irradiação, observando-se os cuidados de assepsia necessários para prevenir a ocorrência de contaminação cruzada.

Os parâmetros foram definidos baseando-se em dados obtidos nos trabalhos de Gutknecht *et al.* (2000a), Gutknecht *et al.* (2000b) associados aos resultados obtidos na primeira parte deste trabalho onde a temperatura resultante no terço apical indicou os parâmetros potencialmente seguros para trabalhos *in vivo*. (TAB. 2)

A fibra foi introduzida até 1mm aquém do ápice e a irradiação realizada a partir de movimentos helicoidais de apical para cervical, com uma velocidade de 2mm/s (Gutknecht *et al.*, 1996b), com duração de cinco segundos, com quatro repetições e intervalos de 20 segundos, entre elas, utilizando apenas os parâmetros de 3W e 2,5W de potência no modo de emissão contínuo. (FIG. 13)



"FIGURA 13 – Irradiação do corpo de prova".

Os corpos de prova foram divididos em dois grupos de acordo com o parâmetro de energia e subdivididos em mais sete grupos:

Grupo 1: parâmetro de 3W

- ◊ Grupo L1 imediato (grupo experimental) - sete corpos de prova tiveram seus canais infectados, e em seguida incubados a 37°C durante 72 horas, com introdução de 10µl de nutrientes TSB no canal a cada 24 horas, simulando assim as condições *in vivo*. Ao final desse prazo, realizou-se a irradiação com 3W de potência e imediatamente após a diluição, procedeu-se à semeadura e incubação das placas para a contagem das bactérias remanescentes pós-tratamento.

- ⇨ Grupo L1 - 48 h (grupo experimental) - sete corpos de prova tiveram seus canais infectados, e em seguida incubados a 37°C durante 72 horas, com introdução de 10µl de nutriente (TSB) no canal a cada 24 horas, simulando assim as condições *in vivo*. Ao final desse prazo realizou-se a irradiação com 3W de potência. Na seqüência, as amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, colocando-se 10µl de nutriente (TSB) no canal a cada 24 horas. Após esse prazo, procedeu-se à diluição, a semeadura, incubação das placas e na seqüência, a contagem das bactérias remanescentes pós-tratamento.
- ⇨ Grupo L1 - 48 h (grupo experimental - hidróxido de cálcio) - sete corpos de prova tiveram seus canais infectados, sendo em seguida incubados a 37°C durante 72 horas, com introdução de 10µl de nutriente (TSB) no canal a cada 24 horas, simulando assim as condições *in vivo*. Ao final desse prazo, realizou-se a irradiação com 3W de potência. Na seqüência, as amostras receberam curativo de pasta de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado, sendo incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Após este prazo, irrigou-se o canal com soro fisiológico e uma lima 10 foi usada para agitar e remover o conteúdo do canal. Em seguida, 10µl de nutriente (TSB) foi introduzido no canal e o corpo de prova foi incubado por mais 24 horas. Decorrido este período, um cone de papel 40 foi colocado na luz do conduto durante 30 segundos, absorvendo o conteúdo, sendo então descartado. Posteriormente, outro cone 40, previamente umedecido com soro foi posicionado, permanecendo durante 30 segundos no canal a fim de realizar o teste da turbidez. Procedeu-se à diluição, a semeadura, a incubação das placas durante 48 horas e depois a contagem das bactérias remanescentes pós-tratamento.
- ⇨ Grupo C1 - imediato (grupo controle positivo) - sete corpos de prova infectados e não irradiados foram submetidos à contagem bacteriana juntamente com o grupo L1 Imediato.
- ⇨ Grupo C1 - 48 horas - (grupo controle positivo) - sete corpos de prova infectados e não irradiados foram mantidos em estufa e à contagem bacteriana foi realizada juntamente com o grupo L1 - 48h.

- ◇ Grupo CN1 - imediato (grupo controle negativo): três corpos de prova não infectados e não irradiados foram submetidos à contagem bacteriana juntamente com os canais analisados imediatamente após a aplicação do laser.
- ◇ Grupo CN1 - 48 horas (grupo controle negativo): três corpos de prova não contaminados e não irradiados, nos quais a contagem bacteriana foi realizada concomitantemente com o grupo dos espécimes analisados 48 horas após a aplicação do laser.

Grupo 2: parâmetro de 2,5W

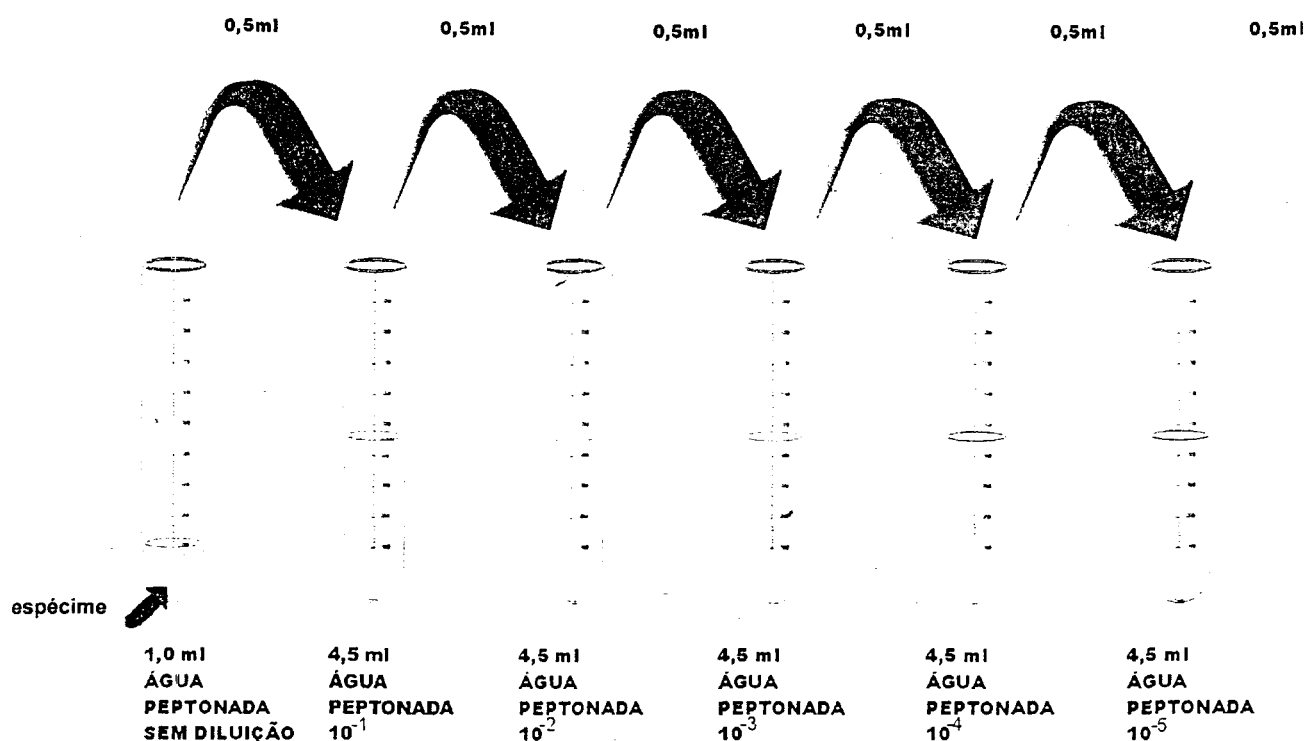
- ◇ Grupo L2 imediato (grupo experimental) - sete corpos de prova tiveram seus canais infectados, e em seguida incubados a 37°C durante 72 horas, com introdução de 10µl de nutriente (TSB) no canal a cada 24 horas, simulando as condições *in vivo*. Ao final deste prazo, foi realizada a irradiação com 2,5W de potência e imediatamente após realizou-se a diluição, a semeadura e incubação das placas para a contagem das bactérias remanescentes pós-tratamento.
- ◇ Grupo L2 - 48 h (grupo experimental) - sete corpos de prova tiveram seus canais contaminados, e em seguida incubados a 37°C durante 72 horas, com introdução de 10µl de nutriente (TSB) no canal a cada 24 horas, simulando as condições *in vivo*. Ao final desse prazo, realizou-se a irradiação com 2,5W de potência. Depois, as amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, colocando-se 10µl de nutriente (TSB) no canal a cada 24 horas. Após esse prazo foi feita a diluição, a semeadura, incubação das placas e na seqüência a contagem das bactérias remanescentes pós-tratamento.
- ◇ Grupo L2 - 48 h (grupo experimental - hidróxido de cálcio) - sete corpos de prova que tiveram seus canais infectados, sendo em seguida incubados a 37°C durante 72 horas, com introdução de 10µl de nutriente (TSB) no canal a cada 24 horas, simulando as condições *in vivo*. Ao final desse prazo realizou-se a irradiação com 2,5W de potência. Na seqüência as amostras receberam curativo com uma pasta de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado e foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Decorrido o período, o canal foi irrigado com soro fisiológico. Utilizou-se uma lima 10 para agitar e remover o conteúdo do canal e

em seguida 10µl de nutriente (TSB) foi introduzido no canal. O corpo de prova foi incubado por mais 24 horas. Decorrido este prazo, introduziu-se um cone de papel 40 na luz do conduto, durante 30 segundos, para absorver o conteúdo, sendo então descartado. Em seguida, outro cone 40, previamente umedecido com soro foi posicionado, permanecendo durante 30 segundos no canal, a fim de realizar-se o teste da turbidez. Procedeu-se então a diluição, a semeadura, a incubação das placas durante 48 horas e, na seqüência, a contagem das bactérias remanescentes pós-tratamento.

- ⇨ Grupo C2 - imediato (grupo controle positivo) - sete corpos de prova infectados e não irradiados foram submetidos à contagem bacteriana juntamente com o grupo L2 Imediato.
- ⇨ Grupo C2 - 48 horas - (grupo controle positivo) – sete corpos de prova infectados e não irradiados foram mantidos em estufa e à contagem bacteriana foi realizada juntamente com o grupo L2 - 48h.
- ⇨ Grupo CN2 - imediato (grupo controle negativo) - três corpos de prova não infectados e não irradiados foram submetidos à contagem bacteriana, juntamente com os canais analisados imediatamente após a aplicação do laser.
- ⇨ Grupo CN2 - 48 horas (grupo controle negativo) - três corpos de prova não contaminados e não irradiados, tiveram à contagem bacteriana realizada com os canais analisados 48 horas após a aplicação do laser.

4.2.2.5 Preparo para a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc)

Em seguida as amostras foram colocadas em tubos de eppendorf contendo 1ml de água peptonada com pH 7,2, os quais foram submetidos à agitação durante 1 minuto em agitador mecânico *Vortex*, para remoção de bactérias remanescentes da massa dentinária. Diluições decimais foram realizadas (FIG. 14), 25µl de cada diluição foi removido para realizar a semeadura em triplicata em placa de Petri, contendo o meio *m-Enterococcus*. (FIG. 15)



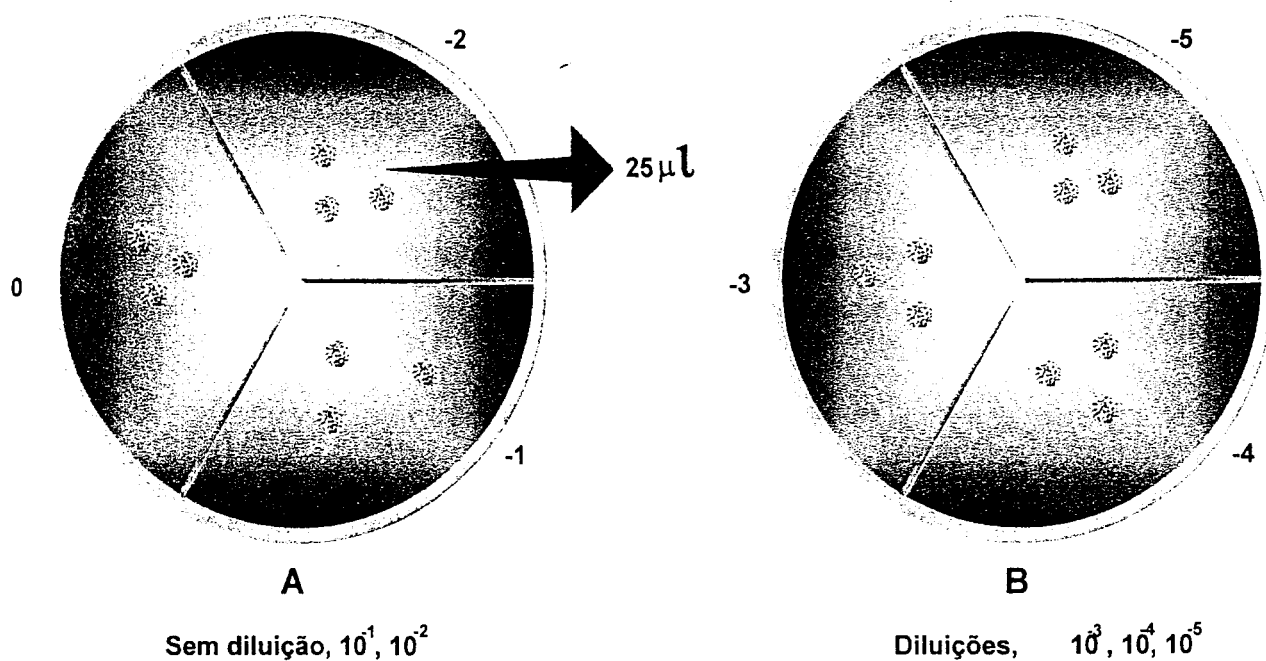
“FIGURA 14 - Diluições seriadas”.

Esse meio de cultura foi utilizado por permitir apenas o crescimento de espécies de *Enterococcus*, evitando o crescimento de outras bactérias que possam ter contaminado o experimento durante os passos operatórios. Passadas 24 horas a 37°C, as colônias da superfície do meio de cultura foram analisadas em microscópio estereoscópico, para contagem das unidades formadoras de colônia por ml (u.f.c./ml). As colônias foram contadas e anotadas em tabelas de crescimento microbiológico para posterior análise dos dados.

Placas de Petri com semeadura em triplicata

- A: Sem diluição, 10^1 , 10^2
 B: Diluições, 10^3 , 10^4 , 10^5

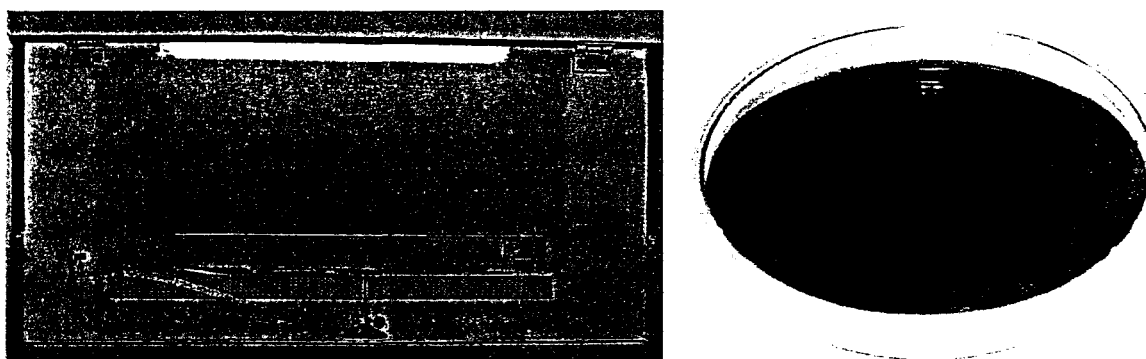
DILUIÇÃO SERIADA



“FIGURA 15 – Semeadura em triplicata nas placas de Petri.”

4.2.2.6 Meio de cultura

O meio de cultura *m-Enterococcus Agar* (Difco, USA) foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante. Optou-se pela utilização deste meio por ser seletivo para espécies de *Enterococcus* e pelo fato de que os corpos de prova foram manipulados fora da câmara de fluxo laminar. (FIG. 16)



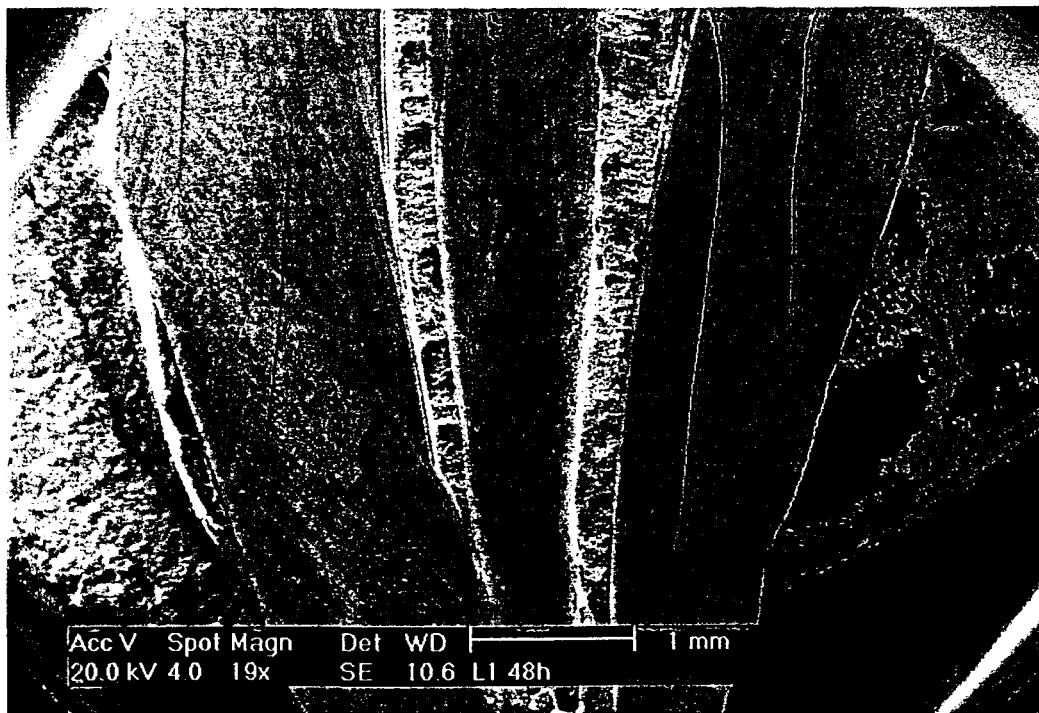
“FIGURA 16 – Preparo do meio de cultura na câmara de fluxo laminar.”

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

Após a irradiação, cinco espécimes foram utilizados para avaliação em MEV. Esses foram mantidos nas mesmas condições de hidratação e conservação. Realizou-se o preparo de uma superfície de corte cervical, por mesial e distal, com auxílio de um disco de aço para porcelana. Esse sulco não invadiu o canal radicular. Em seguida, realizou-se a clivagem do espécime no seu longo eixo, obtendo-se dois fragmentos. Apenas uma amostra foi utilizada para análise microscópica.

As amostras submetidas para análise em MEV, foram previamente desidratadas durante 10 minutos, em soluções crescentes de álcool isopropílico a 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 95%, totalizando um tempo de 60 minutos para cada espécime.

Durante esse período, utilizou-se uma ponta de ultra-som para auxiliar na desidratação. Após a desidratação, os espécimes foram colados em *stubs* com auxílio de cola de prata e em seguida metalizados. (FIG. 17) O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o modelo LX 300 da marca Philips.



“FIGURA 17 – Micrografia eletrônica de varredura de espécime clivado pertencente ao grupo L1 48H, posicionado no *stub*”.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do estudo prévio do efeito térmico durante a irradiação intracanal com laser de diodo:

A irradiação dos corpos de prova resultou no seguinte perfil de temperatura: (TAB. 3 e 4)

Grupo 1:

- a. O espécime irradiado com a potência 0,38W, com a densidade de potência de $0,3,73\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de $1,5^\circ\text{C}$.
- b. O espécime irradiado com a potência de 0,37W, com a densidade de potência de $0,364\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de $1,5^\circ\text{C}$.

Grupo 2:

- a. O espécime irradiado com a potência de 1,95W, com a densidade de potência de $1,916\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de $4,5^\circ\text{C}$.
- b. O espécime irradiado com a potência de 2,03W, com a densidade de potência de $1,994\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de 2°C .

Grupo 3:

- a. O espécime irradiado com a potência de 2,5W, com a densidade de potência de $2,456\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de 8°C . (FIG. 18A)
- b. O espécime irradiado com a potência de 2,54W, com a densidade de potência de $2,495\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de $6,9^\circ\text{C}$. (FIG. 18B)

Grupo 4:

- a. O espécime irradiado com a potência de 3,1W, com a densidade de potência de $3,046\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de $6,1^\circ\text{C}$. (FIG. 18C)
- b. O espécime irradiado com a potência de 2,9W, com a densidade de potência de $2,849\text{KW}/\text{cm}^2$, apresentou aumento de temperatura de $4,5^\circ\text{C}$.

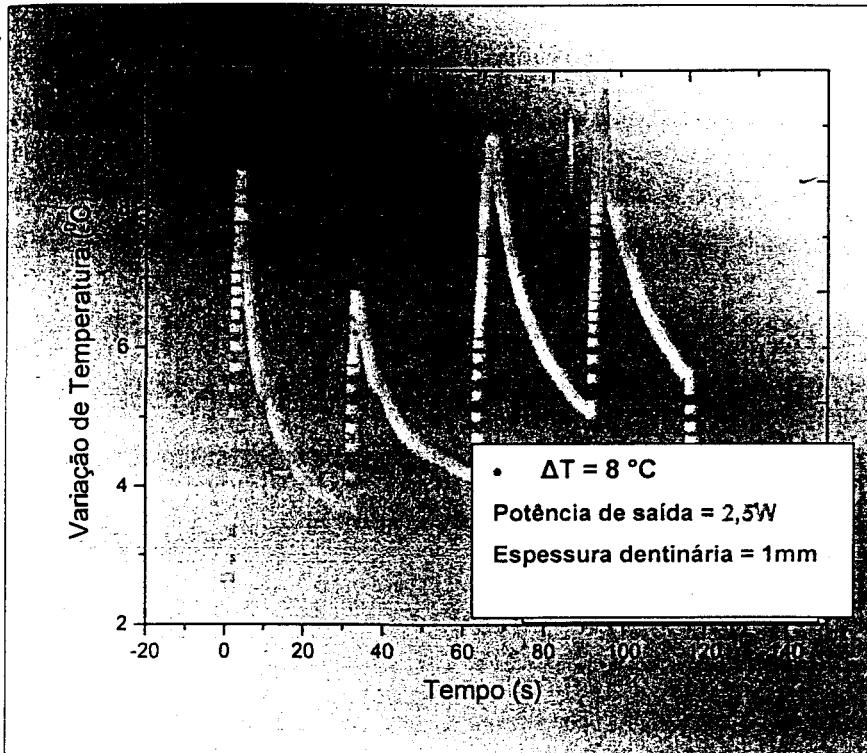
Grupo 5 – Parâmetro no qual houve carbonização dos espécimes.

- a. O espécime irradiado com a potência de 3,6W, com a densidade de potência de 3,537KW/cm², apresentou aumento de temperatura de 12,2°C. (FIG. 18D)
- b. O espécime irradiado com a potência de 3,6W, e com a densidade de potência de 3,537KW/cm², apresentou aumento de temperatura de 14,2°C. (FIG. 18E)

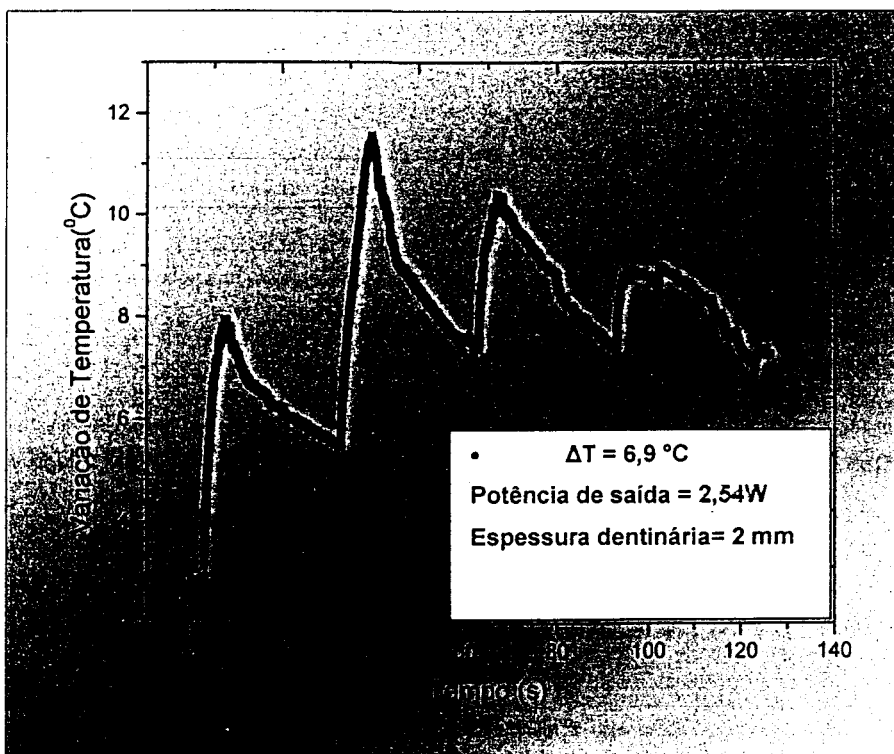
"TABELA 3 – Média dos valores obtidos durante o monitoramento do aumento da temperatura (ΔT)".

Grupo	Potência (W)	Δ tempo (s)	Espessura do remanescente dentinário (mm)	ΔT (°C)
1	0,375	10	1	1,5
2	1,99	10	0,75	3,25
3	2,52	10	1,5	7,45
4	3	10	1,5	5,3
5	3,6	11	0,75	13,2

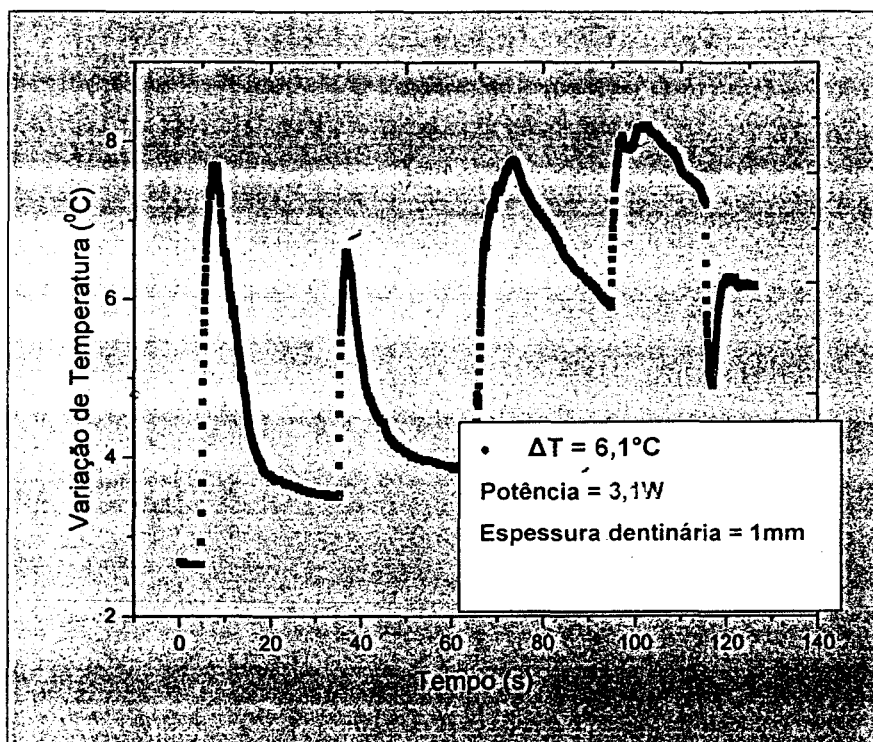
Após o estudo prévio do monitoramento do aumento da temperatura, os parâmetros de 2,5W e 3W foram selecionados, pois os mesmos não promovem um aumento térmico acima de 10°C durante um minuto (limiar de elevação térmica suportado pelos tecidos periodontais, sem que ocorra o estabelecimento de danos) (Eriksson & Albrektsson, 1983). (FIG. 18A, 18B E 18C), (TAB. 3).



"FIGURA 18A - Variação térmica referente à potência de 2,5W".



"FIGURA 18B - Variação térmica referente à potência de 2,54W".



“FIGURA 18C - Variação térmica referente à potência de 3,1W”.

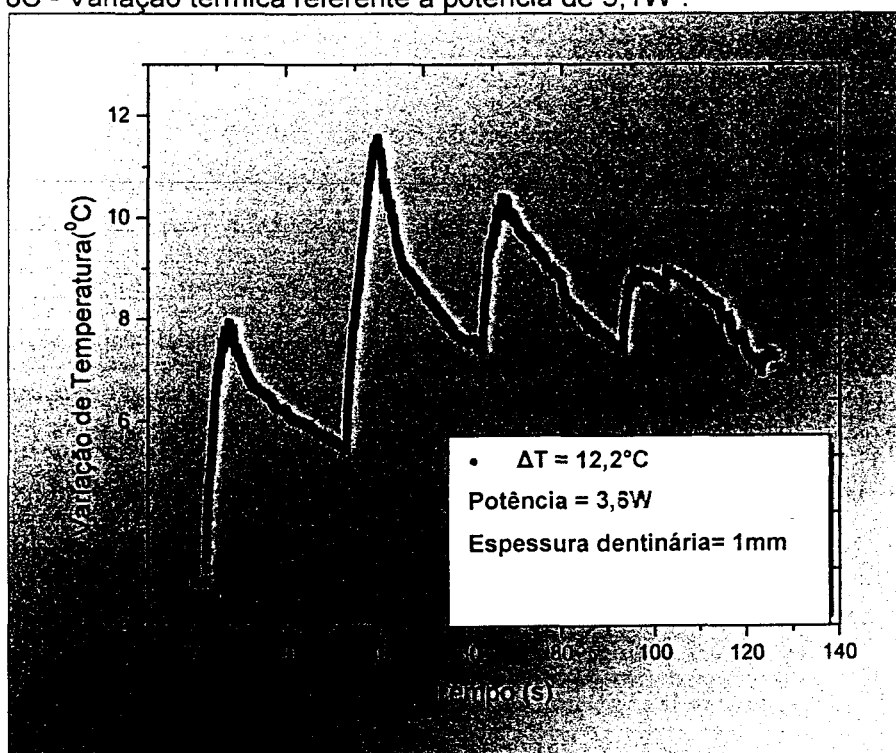
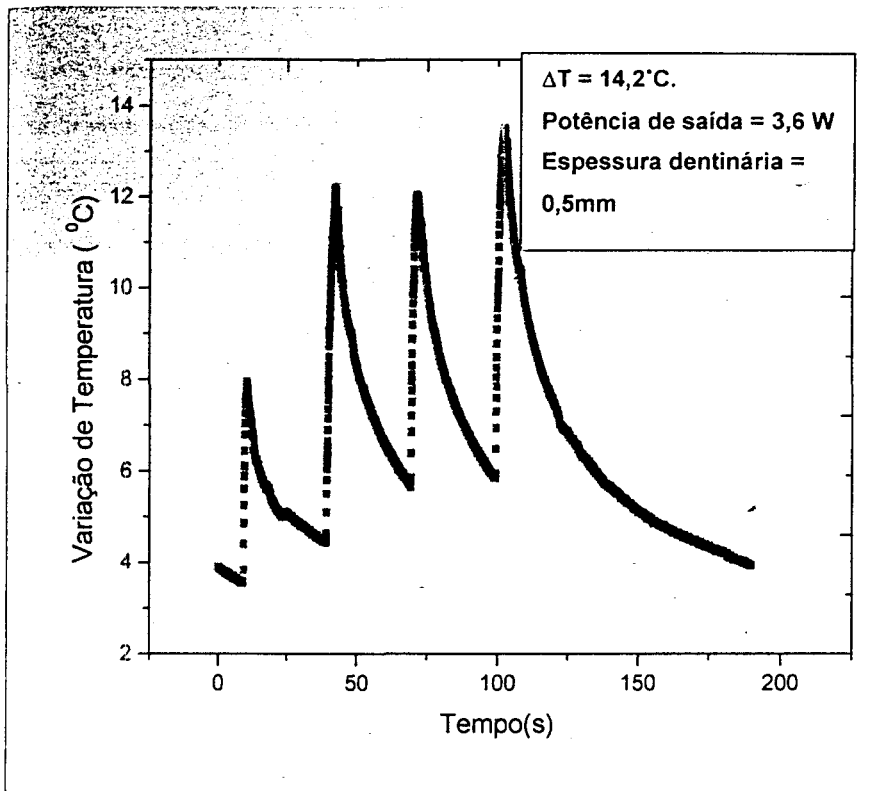


FIGURA 18D - Variação térmica referente à potência de 3,6W”.



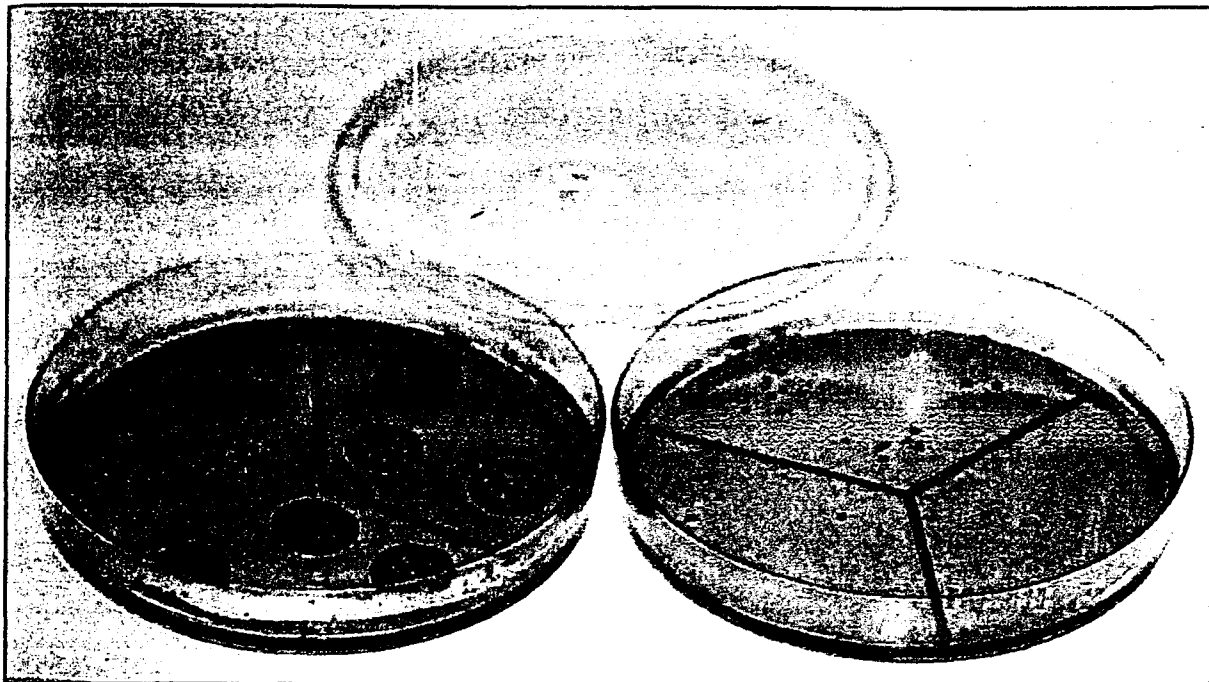
"FIGURA 18E - Variação térmica referente à potência de 3,6 W".

5.2 Avaliação microbiológica

Os cones de papel absorventes colocados no interior dos corpos de prova antes da irradiação laser comprovaram a presença de microorganismos viáveis em 100% das amostras coletadas nos grupos que foram inoculados, pelo teste da turbidez apresentado no TSB. Não houve crescimento bacteriano nos Grupos Controle Negativo, que não foram inoculados e nem irradiados.

Após a semeadura, as placas de Petri foram incubadas por 24 horas. Em seguida, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias. Nos Grupos Controle Negativo Imediato e no Controle Negativo 48 horas não houve nenhum crescimento. Nos Grupos Controle Positivo houve crescimento significativo, que

pode ser observado na (FIG. 19).



"FIGURA 19 – Colônias de *Enterococcus faecalis* em placa de Petri contendo o meio específico *m-Enterococcus*, na qual foi realizada a semeadura em triplicada a partir de diluições de um espécime pertencente ao Grupo Controle Positivo. Pode-se observar o crescimento bacteriano de alíquotas: sem diluição e nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ".

Os resultados foram obtidos a partir da contagem das u.f.c./ml de acordo com a diluição e estão expressos nas (TAB. 4 a 17). Nas (TAB. 4 a 10) é possível observar os resultados referentes aos números de u.f.c./ml quando o parâmetro de 3W foi utilizado. Nas (TAB. 11 a 17) pode-se visualizar os resultados referentes aos números de u.f.c./ml quando o parâmetro de 2,5W foi utilizado.

"TABELA 4 – Grupo CN1 IM – parâmetro de 3W".

diluição espécime	SD	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0

"TABELA 5 – Grupo CN1 48H – parâmetro de 3W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0

"TABELA 6 – Grupo C1 IM – parâmetro de 3W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	incontável	incontável	1.26x10 ⁵			
2	incontável	incontável	3.37x10 ⁵			
3	incontável	incontável	4.13x10 ⁵			
4	incontável	incontável	1.5x10 ⁵			
5	incontável	incontável	2.5x10 ⁵			
6	incontável	incontável	4.13x10 ⁵			
7	incontável	incontável	0.7x10 ⁵			

"TABELA 7 – Grupo C1 48h – parâmetro de 3W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	incontável	incontável	2.98x10 ⁵			
2	incontável	incontável	0.32x10 ⁶			
3	incontável	incontável	0.49x10 ⁶			
4	0	0	0			
5	incontável	incontável	0.25x10 ⁶			
6	incontável	incontável	1.97x10 ⁵			
7	incontável	incontável	0.36x10 ⁶			

"TABELA 8 - Grupo L1 IM – parâmetro de 3W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	0	0	0			
2	0	0	0			
3	0	0	1.32x10 ⁴			
4	0	0	0			
5	0	0	1.32x10 ⁴			
6	0	0	0			
7	0	0	0			

"TABELA 9 – Grupo L1 48H – parâmetro de 3W".

diluição	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
espécime						
1	0	0	0.13x10 ⁴			
2	0	0	0.23x10 ⁴			
3	0	0	0.13x10 ⁴			
5	0	0	0.13x10 ⁴			
6	0	0	0.53x10 ⁴			
7	0	0	0.93x10 ⁴			

"TABELA 10 – Grupo L1 48H/Ca(OH)₂ – parâmetro de 3W".

diluição	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
espécime						
1	0.05x10 ⁻⁵	0	0	0	0	0
2	0.05x10 ⁻⁵	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0

As "Tabelas 11 a 17 – são referentes a contagem da u.f.c./ml dos espécimes irradiados com o parâmetro de 2,5 W.

"TABELA 11 – Grupo ON2 IM – parâmetro de 2,5 W".

diluição	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
espécime						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0

"TABELA 12 – Grupo ON2 48H – parâmetro de 2,5 W".

diluição	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
espécime						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0

"TABELA 13 – Grupo C2 1M – parâmetro de 2,5 W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	incontável	Incontável	2,08x10 ⁵			
2	incontável	Incontável	2.25x10 ⁵			
3	incontável	Incontável	0.86x10 ⁵			
4	incontável	Incontável	3.02x10 ⁵			
5	incontável	Incontável	1.56x10 ⁵			
6	incontável	Incontável	1.21x10 ⁵			
7	incontável	Incontável	4.53x10 ⁵			

"TABELA 14 – Grupo C2 40 – parâmetro de 2,5 W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	incontável	incontável	Incontável	2.0x10 ⁶		
2	incontável	incontável	Incontável	2.66 x10 ⁶		
3	0	0	0	0		
4	incontável	incontável	3.4 x10 ⁵	7.6x10 ⁵		
5	incontável	incontável	Incontável	0		
6	incontável	incontável	Incontável	2.53x10 ⁵		
7	incontável	incontável	2.4 x10 ⁵	4.13x10 ⁵		

"TABELA 15 - Grupo L2 1M – parâmetro de 2,5 W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	0	0	9.20x10 ³			
2	0	0	0			
3	0	0	0			
4	0	0	2.40x10 ³			
5	0	0	0			
6	0	0	0			
7	0	0	0			

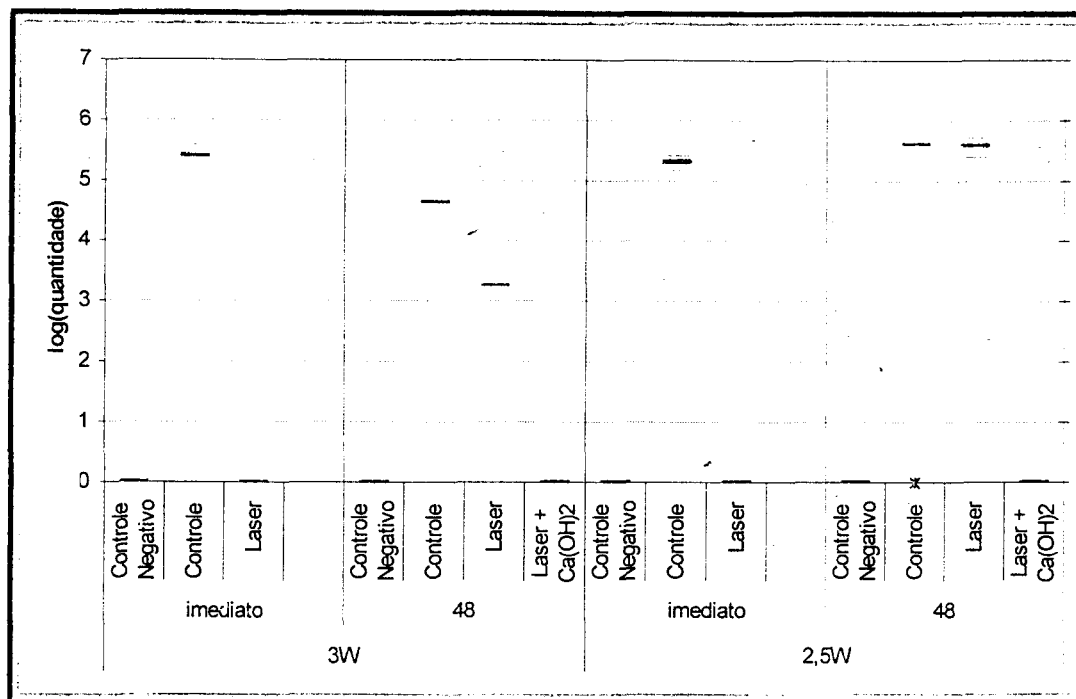
"TABELA 16 – Grupo L2 43H – parâmetro de 2,5 W".

diluição espécime	SD	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
1	0	0	5.34x10 ⁵			
2	0	0	5.36x10 ⁵			
4	0	0	2.34x10 ⁵			
5	0	0	3.89x10 ⁵			
6	0	0	1.50x10 ⁵			
7	0	0	IN			

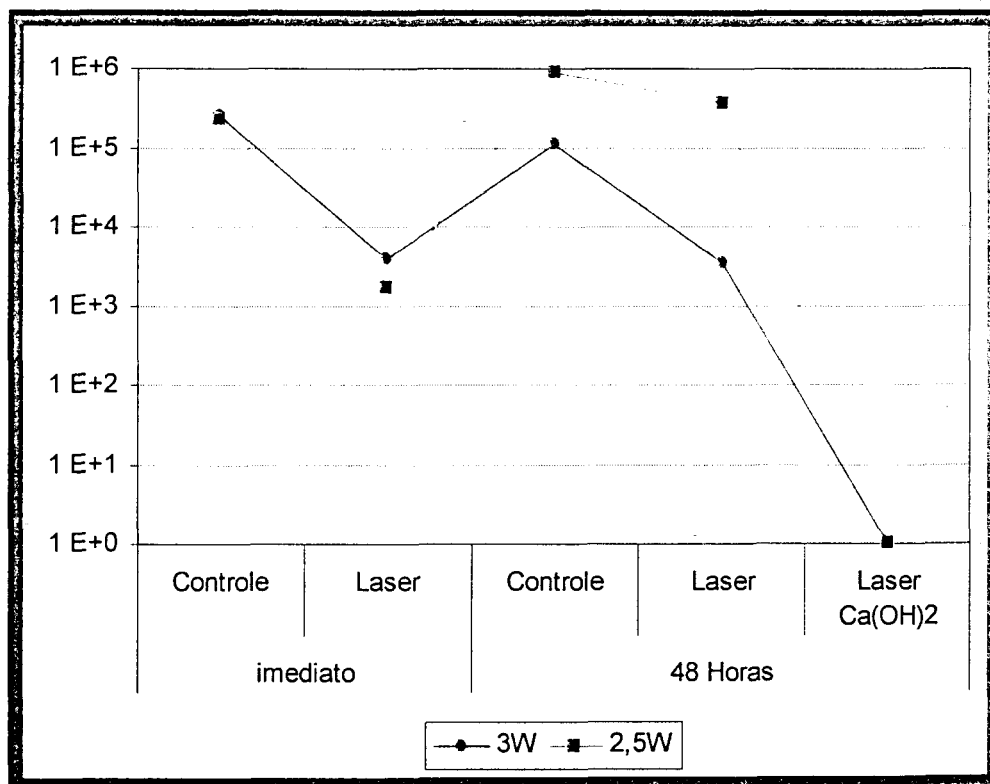
"TABELA 19 - Medidas descritivas para a quantidade de u.f.c./ml".

Potência	Tempo	Grupo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
3W	IM	Controle Neg.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Controle	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$7,0 \times 10^4$	$4,1 \times 10^5$
		Laser	$3,8 \times 10^3$	0,0	$6,4 \times 10^3$	0,0	$1,3 \times 10^4$
	48 h	Controle Neg.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Controle	$1,1 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$
		Laser	$3,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$
		Laser + Ca(OH) ₂	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2,5W	IM	Controle Neg.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Controle	$2,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$8,6 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$
		Laser	$1,7 \times 10^3$	0,0	$3,4 \times 10^3$	0,0	$9,2 \times 10^3$
	48 h	Controle Neg.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Controle	$8,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	0,0	$2,7 \times 10^6$
		Laser	$3,7 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$
		Laser + Ca(OH) ₂	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Um *box-plot* foi construído a partir dos valores obtidos durante a contagem de u.f.c./ml., podendo visualizar a distribuição dos dados. Para construí-lo, esses valores foram colocados em ordem crescente e então divididos em quatro grupos (quartis), com o mesmo número de amostras e então foram utilizados no gráfico. O segundo quartil é igual à mediana, ou seja, é o valor que divide os dados em dois grupos, com a mesma quantidade de valores (50% cada). A caixa desenhada inicia-se no 1º quartil e termina no 3º. O risco no meio da caixa é a mediana. Pontos marcados com círculo são valores que podem ser considerados como sendo extremos. (FIG. 20 e 21)



"FIGURA 20 – Box-plot para o logaritmo da quantidade de bactérias".



"FIGURA 21 – Médias para as quantidades de bactérias (escala logarítmica)".

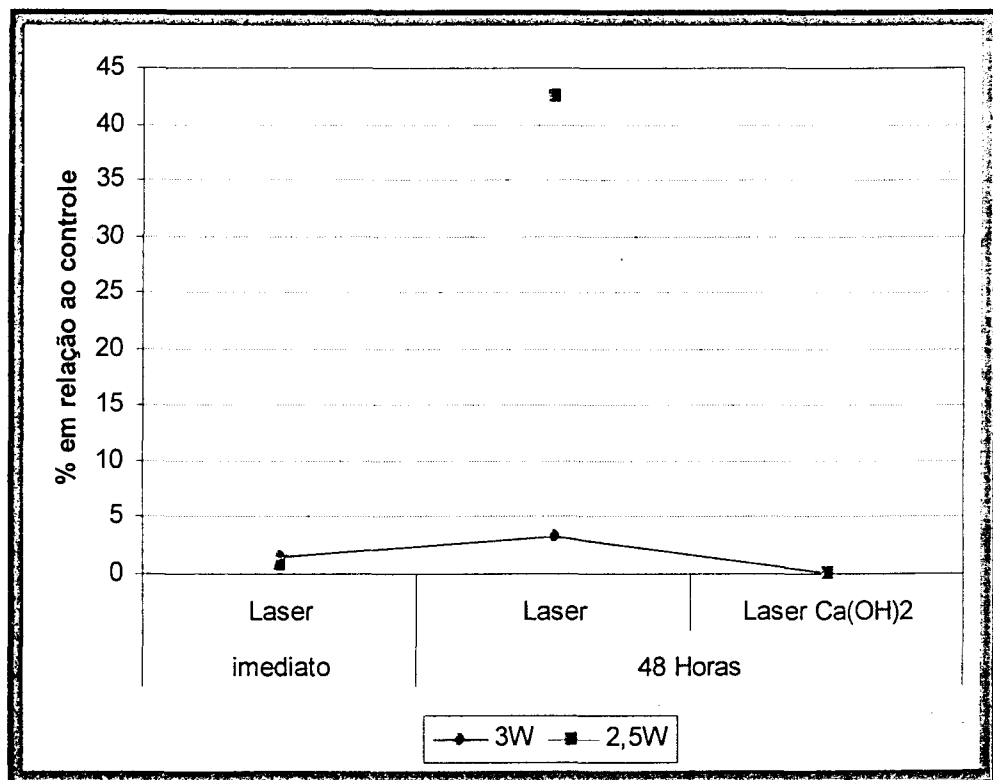
Conforme os resultados demonstrados pelas tabelas e gráficos anteriormente analisados, pode-se observar que os Grupos Controle Positivo apresentaram diferença entre si. Para melhor analisar essa diferença, as (TAB. 21 a 24) e os (FIG. 22 a 28), foram criados para representar os percentuais médios das quantidades de bactérias em relação ao respectivo Grupo Controle. A partir desses dados observa-se que o Grupo Laser 48 horas apresentou um comportamento diferente, variando conforme o parâmetro utilizado. Houve diferença significativa entre os parâmetros de 3W e 2,5W, enquanto o primeiro reduziu significativamente o número de bactérias em relação ao Grupo Controle positivo, obtendo-se um índice de redução de 96,5%, o segundo (2,5W) reduziu apenas 57,6% as u.f.c./ml.

"TABELA 20 - Percentuais médios para a quantidade de u.f.c./ml em relação aos controles".

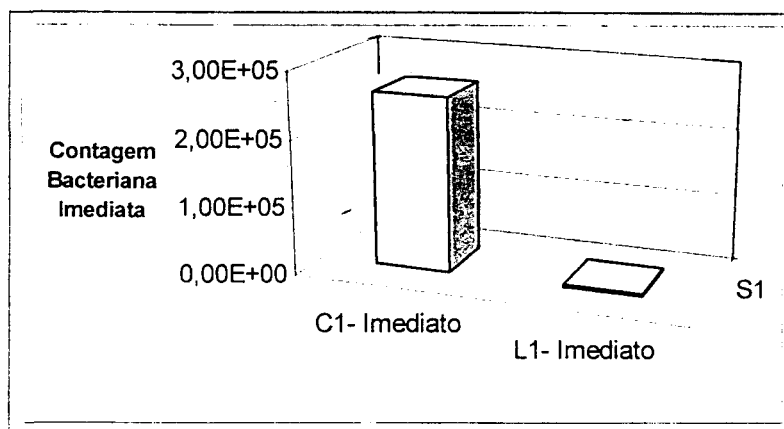
Grupo	Tempo	Potência	
		3W	2,5W
Laser	Imediato	1,50%	0,75%
	48 Horas	3,27%	42,40%
Laser Ca(OH) ₂	48 Horas	0,00%	0,00%

"TABELA 21 - Percentuais médios para a redução bacteriana em relação ao Grupo Controle de ambos os parâmetros".

Grupo	Tempo	Potência	
		3W	2,5W
Laser	Imediato	98,5%	99,2%
	48 Horas	96,5%	57,6%
Laser Ca(OH) ₂	48 Horas	0,00%	0,00%



"FIGURA 22 – Médias para o percentual de quantidade de bactérias remanescentes pós irradiação quando comparadas ao percentual dos Grupos Controle Positivo".



"FIGURA 23 - Média das u.f.c./ml após contagem imediata para o Grupo 1 (3W), comparando o Grupo Controle Positivo Imediato com o Laser Imediato".

Na (FIG. 23) observar-se acentuada redução da população bacteriana de *Enterococcus faecalis* obtida com o parâmetro de 3W imediatamente após a irradiação. A redução obtida foi de 98,5%.

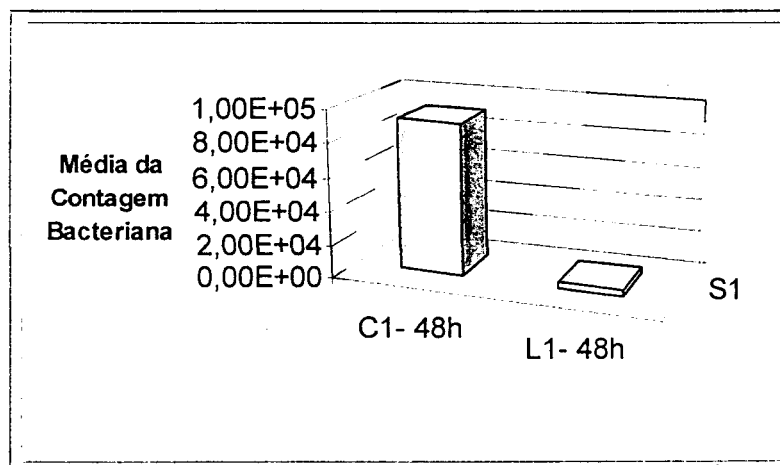
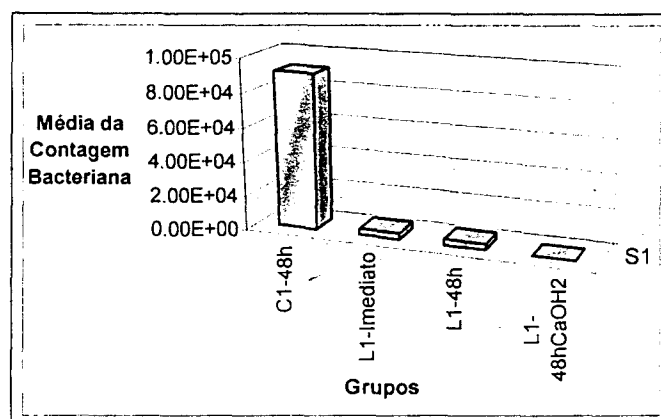


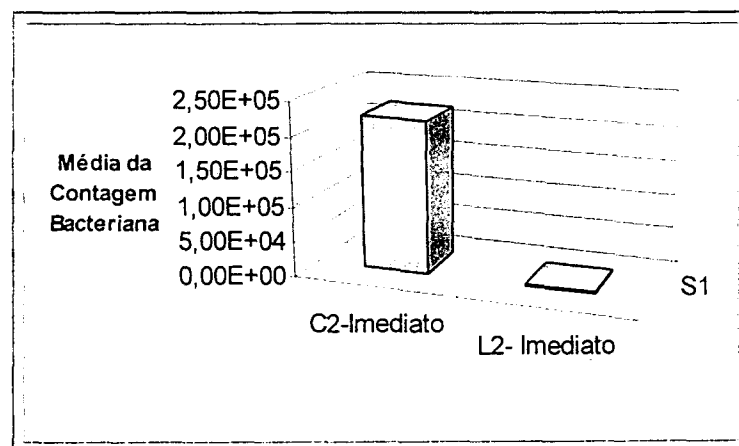
FIGURA 24 - Média das u.f.c./ml após contagem 48 horas depois da irradiação para o Grupo 1 (3W), comparando o Controle Positivo 48h com o Laser 48h".

A (FIG. 24) nos mostra que a acentuada redução da u.f.c./ml. obtida após a irradiação, manteve-se mesmo com a oferta de nutrientes durante 48 horas. A redução foi de 96,5%.



"FIGURA 25 - Valores obtidos das u.f.c./ml comparando o controle positivo 48h com os Grupos irradiados: Imediato, 48h e 48h Ca(OH)₂, utilizando o parâmetro de 3W".

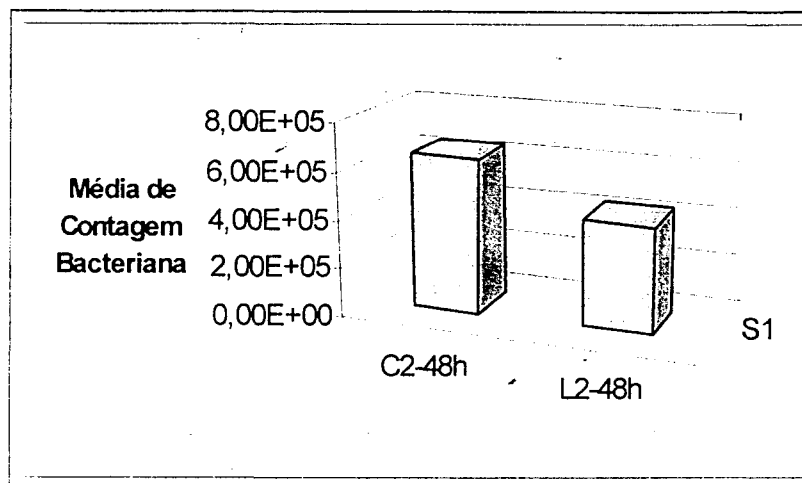
A (FIG. 25) demonstra uma redução elevada da população bacteriana nos grupos irradiados com 3W. No Grupo Laser Imediato a redução foi de 98,5%, enquanto no Grupo Laser 48 horas foi de 96,5%. No Grupo onde foi associada a irradiação laser com o uso de medicação intracanal, constituída por uma pasta de hidróxido de cálcio associada com paramonoclorofenol canforado, não houve crescimento bacteriano (100% de redução).



"FIGURA 26 - Média das u.f.c./ml após contagem imediata para o Grupo 2 (2,5W), comparando o Grupo Controle Positivo Imediato com o Laser Imediato".

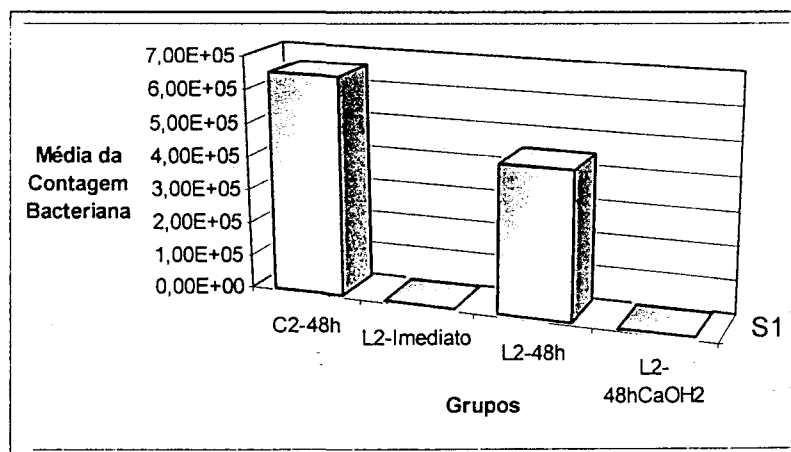
Na (FIG. 26) ao comparar o Grupo Controle Positivo Imediato com o Grupo Laser Imediato, comprova-se que o parâmetro de 2,5W foi capaz de reduzir

significativamente a quantidade de u.f.c./ml, imediatamente após a irradiação. A redução obtida foi de 99,2%.



"FIGURA 27: Média das u.f.c./ml após contagem 48 horas depois da irradiação para o Grupo 2 (2,5W), comparando o Controle Positivo 48h com o Laser 48h".

Na (FIG. 27) pode-se perceber que o grupo irradiado com o parâmetro de 2,5W de potência, após 48 horas apresentou um comportamento diferente dos outros grupos lasers. Nota-se uma menor capacidade de redução das u.f.c./ml quando comparada aos espécimes do Grupo Imediato, cerca de apenas 57,60%.



"FIGURA 28 - Valores obtidos das u.f.c./ml comparando o controle positivo 48h com os Grupos Irradiados: Imediato, 48h e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 48h utilizando o parâmetro de 3W".

Na (FIG. 28) observa-se que a redução das u.f.c./ml foi significativamente menor no grupo L2 48h (2,5W), quando comparado ao controle (57,60%). No Grupo Laser Imediato houve um padrão de redução bacteriana acentuada de 99,2%. Porém, podemos observar que, quando a medicação intracanal foi utilizada, não houve crescimento bacteriano (redução de 100%).

5.2.2 Análise Interferencial

Foi realizada comparando os grupos, utilizando a redução em relação à quantidade média de bactérias existentes no respectivo controle. Para verificar se os Grupos Laser e/ou as potências são significativas nos percentuais de redução, foi realizado o teste de *Análise de variância para 2 fatores fixos*, considerando como um fator a potência do laser e como outro fator os três grupos laser. Para utilizar a técnica de forma mais adequada, foi feita uma transformação na variável em estudo (percentual de redução). A transformação usualmente utilizada é o arco-seno da raiz quadrada do percentual. Esta transformação serve para estabilizar as variabilidades dos grupos. Durante a análise, uma amostra não se enquadrou ao modelo (corpo de prova 6 do Laser 48 horas a 2,5W), sendo retirada e a análise refeita. O resultado está demonstrado na (TAB. 22), que mostra a Análise de Variância (ANOVA), indicada para o percentual reduzido da quantidade (variável transformada), pela qual pode-se concluir através do nível descritivo que existe interação significativa entre os grupos e as potências, ou seja, as diferenças entre as potências não são as mesmas para os três grupos.

Para verificar quais das médias são diferentes, utilizou-se *Comparações Múltiplas pelo método de Tukey*, que permite testar quais médias são diferentes. Na (TAB. 23) constam os níveis descritivos, podendo-se observar:

- O Grupo Laser após 48 horas em 2,5W apresentou comportamento diferente de todos os outros;
- o Grupo Laser + Ca(OH)₂ após 48h em ambos os parâmetros foi significativamente diferente do Grupo Laser após 48 horas, tanto para 2,5W quanto para 3W;
- as outras comparações não foram significativas.

"TABELA 22 – Tabela da ANOVA para o percentual reduzido em relação a quantidade de u.f.c./ml do Controle (variável transformada)".

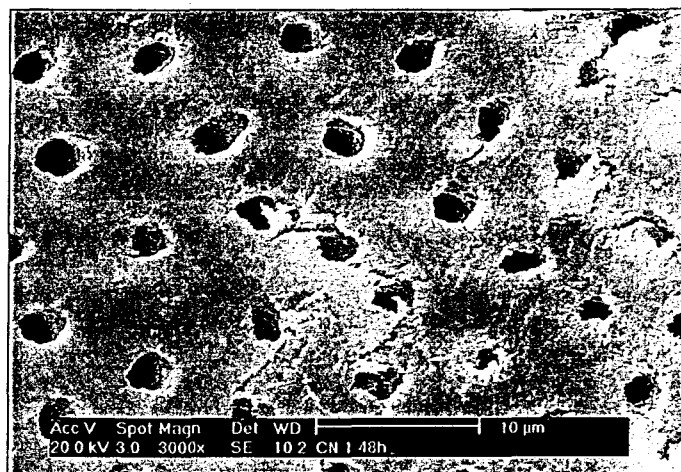
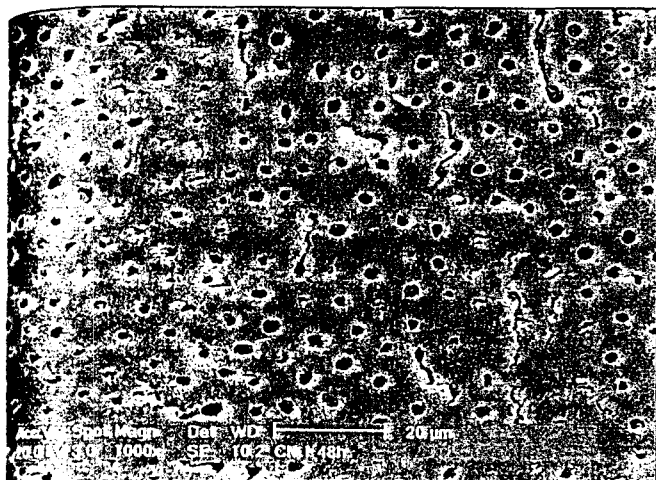
Fonte de Variação	graus de liberdade	Soma de quadrados	Soma de quadrados ajustada	Quadrados Médios ajustados	Estatística F	nível descritivo
Grupo	2	1,05761	1,37317	0,6866	88,29	0,000
Potência	1	0,21091	0,32578	0,3258	41,89	0,000
Grupo * Potência	2	0,66267	0,66267	0,3313	42,61	0,000
Resíduo	30	0,23329	0,23329	0,0078		
Total	35	2,16447				

"TABELA 23 – Comparações múltiplas pelo método de Tukey para percentual reduzido em quantidade de u.f.c./ml (variável transformada) em relação as amostras controle. As diferenças significativas estão demarcadas em azul".

Grupo	Potência	Laser Imediato		Laser 48 horas		Laser+Ca(OH) ₂ 48 horas	
		3W	2,5W	3W	2,5W	3W	2,5W
Laser Imediato	3W		0,997	0,329	0,000	0,757	0,757
	2,5W	0,997		0,151	0,000	0,943	0,943
Laser 48 horas	3W	0,329	0,151		0,000	0,028	0,028
	2,5W	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000
Laser+Ca(OH) ₂ 48 horas	3W	0,757	0,943	0,028	0,000		1,000
	2,5W	0,757	0,943	0,028	0,000	1,000	

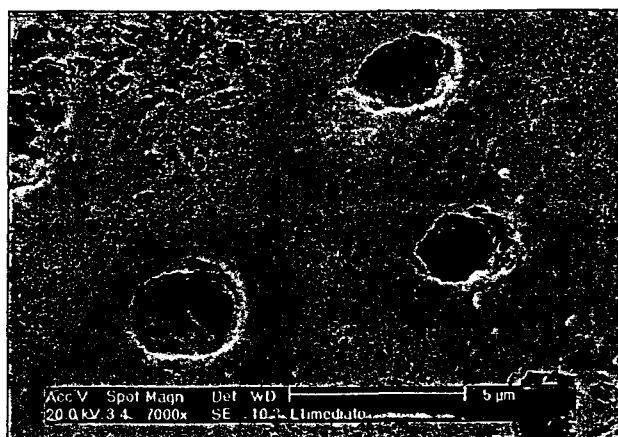
5.3 Avaliação do aspecto morfológico dos espécimes em MEV

Observamos nas micrografias eletrônicas das amostras do Grupo Controle (Controle Negativo) a presença de camada de *smear layer* em algumas áreas e em outros túbulos dentinários abertos. (FIG. 29 e 30)

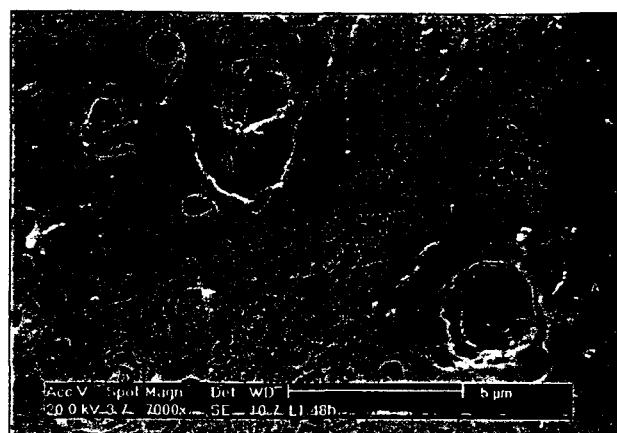
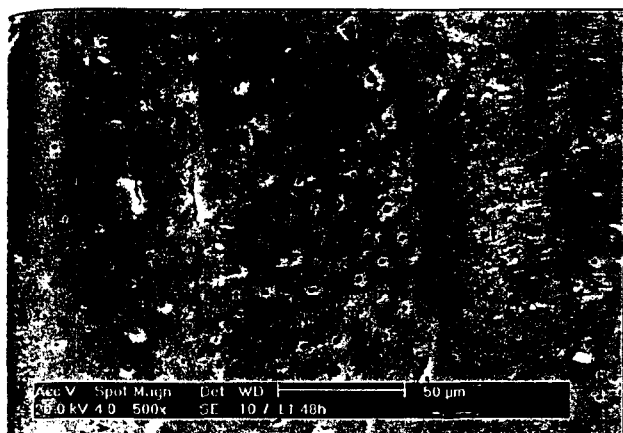


"FIGURAS 29 e 30 – Micrografias eletrônicas de uma das amostras pertencentes ao Grupo CN1 48h".

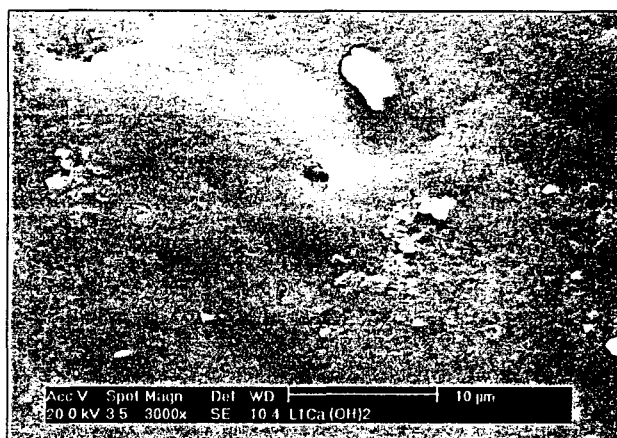
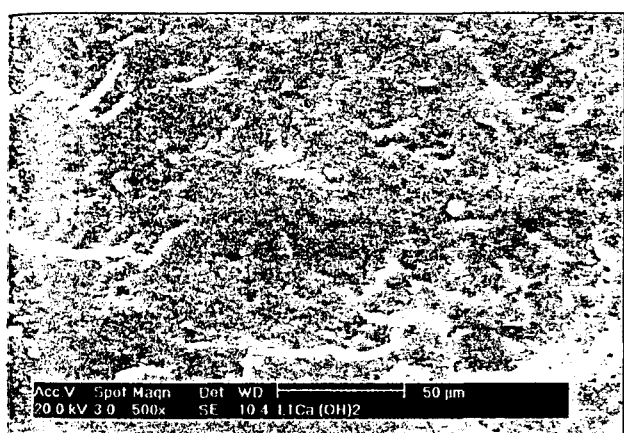
As micrografias eletrônicas permitiram observar alterações estruturais em todas as amostras irradiadas com o laser de diodo, quando comparadas às do Grupo Controle. Todas as amostras observadas apresentaram morfologia levemente diferente. As paredes apresentavam-se limpas, sem a presença de *smear layer*, com um número reduzido de túbulos dentinários abertos. (FIG. 31 a 36)



"FIGURAS 31 e 32 – Micrografias eletrônicas de amostras do grupo L1 IM - referentes ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos".

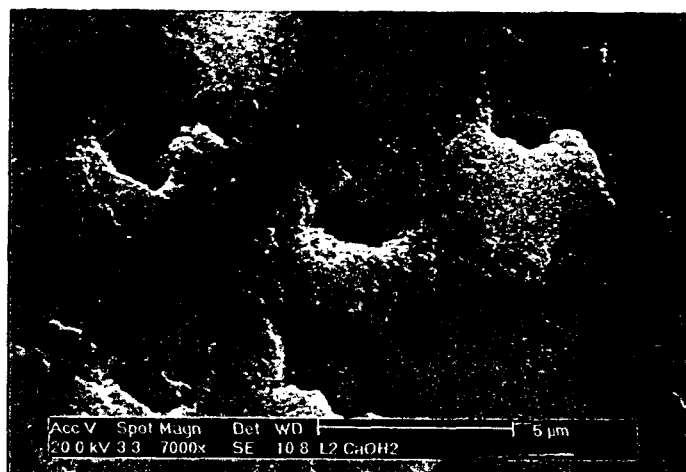
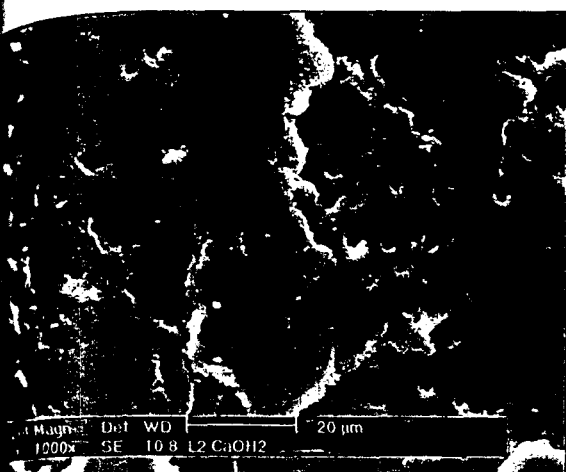


"FIGURAS 33 e 34 – Micrografias eletrônicas de amostras do grupo L1 48H – referentes ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos".



"FIGURAS 35 e 36 – Micrografias eletrônicas de amostras do grupo L1 48H Ca(OH)₂ – referentes ao parâmetro de 3W com diferentes aumentos".

Nas amostras pertencentes aos Grupos nos quais foi utilizada a pasta com hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado, constatou-se a presença de resíduos da medicação na parede do conduto, conforme se pode visualizar nas (FIG. 35 a 38).



"FIGURAS 37 e 38 – Micrografias eletrônicas de amostras do grupo L2 48H Ca(OH)₂ – referentes ao parâmetro de 2,5 W, com diferentes aumentos."

Nas amostras irradiadas da Grupo 2 com o parâmetro de 2,5W observou-se um menor grau de ressolidificação. Como consequência, há um número maior de túbulos dentinários abertos.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A eliminação dos microorganismos na endodontia de canais contaminados se constitui em um aspecto decisivo. Grande parte dos insucessos ocorre devido à permanência de microorganismos e/ou seus produtos no interior da massa dentinária, mesmo após o preparo químico cirúrgico, e pela dificuldade de eliminar a infecção extra-radicular (Moritz, 1997a, Moritz, 1997b; Gouw-Soares, 1998; Siqueira Jr., 2001; Peciulienė *et al.*, 2000, Peciulienė *et al.*, 2001; Sukawat *et al.*, 2002). A flora endodôntica que é polimicrobiana e altamente dinâmica, sofre alterações relacionadas com disponibilidade de nutrientes, baixa tensão de oxigênio nos canais com polpa morta e com interações microbianas de sinergismo e antagonismo (Cohen *et al.*, 1994; Sydney, 1996 a, Sydney, 1996 b; Sundqvist *et al.*, 1998b; Antônio, 2001; Love, 2001).

Devido ao elevado grau de importância pertinente à relação entre a capacidade de descontaminação e o índice de êxito dos tratamentos endodônticos, justifica-se o valor de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas técnicas que propiciem a redução, senão a eliminação da população microbiana do sistema de canais radiculares. Para tanto, faz-se necessário o conhecimento de microbiologia oral e da microbiota intracanal, propiciando o estabelecimento de uma terapêutica adequada.

Apenas um limitado número de espécies bacterianas é capaz de se reproduzir e crescer em uma infecção endodôntica. A bactéria penetra no tecido necrótico dos canais radiculares, na seqüência ocorre a adaptação metabólica dos espécimes anaeróbios, que parece ser decorrente do comprometimento do suprimento sangüíneo, do baixo poder de potencial de oxidação-redução do tecido necrótico e do estabelecimento do sinergismo em relação a outras bactérias.

A periodontite apical primária tem uma vasta variedade de combinações de bactérias, havendo usualmente três a seis espécies em um dente (Möller *et al.*, 1981;

Fabricius *et al.*, 1982a, Fabricius *et al.*, 1982 b; Peciulienė *et al.*, 2000, Peciulienė *et al.*, 2001). A flora típica deste processo patológico é composta por um quadro onde há predominância de bactérias anaeróbias estritas, conjuntamente com algumas anaeróbias facultativas como os estreptococos (Noda *et al.*, 2000; Peciulienė *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002). Existe uma correlação entre o tamanho da lesão apical e o número de espécies e células presentes no canal, ou seja, uma lesão de tamanho maior possui um número elevado de células e espécies bacterianas (Möller, 1981; Fabricius, 1982 a, b; Dahlén, 1982; Sundqvist, 1992a, Sundqvist, 1992 b; Peciulienė, 2000, Peciulienė 2001).

Um dos objetivos do preparo químico cirúrgico é diminuir drasticamente a população microbiana do sistema de canais radiculares, reduzindo-a a um número insuficiente para causar ou perpetuar a patologia apical. Porém, quando os canais são parcialmente ou impropriamente preparados e obturados, poderá ocorrer a proliferação microbiana favorecendo uma reinfecção, comprometendo o sucesso do tratamento.

Portanto, diferentes condutas adotadas durante o tratamento podem estar relacionadas com variações marcantes na composição da microflora em periodontites apicais. Mudanças do meio podem levar ao decréscimo das bactérias anaeróbias estritas, podendo ocorrer o favorecimento de outras espécies bacterianas. Nas periodontites secundárias, as espécies anaeróbias estritas constituem uma minoria e são isoladas com menor freqüência. A predominância de bactérias facultativas e a monoinfecção são mais freqüentes nos retratamentos, sendo o *Enterococcus faecalis* encontrado freqüentemente (Peciulienė, 2000, Peciulienė 2001). Essa é uma das espécies mais presentes em periodontites secundárias, porém, a relação entre a sua presença e o desenvolvimento de abscessos periapicais ainda não está esclarecida (Noda *et al.*, 2000).

As lesões periapicais resultam da reação do sistema imunológico do hospedeiro frente a ação de microorganismos e seus subprodutos presentes no conduto radicular. Como não é possível atuar nos mecanismos de defesa pela ausência da circulação sangüínea local, a terapia deve ser fundamentada na eliminação da infecção (Love, 2001).

O caminho da reinfecção durante o tratamento parece ser decorrente da microinfiltração coronária de restaurações provisórias ou definitivas, ou mesmo da multiplicação de microorganismos que sobreviveram ao tratamento, ou por espécimes inoculados durante as manobras endodônticas. Os últimos, quando presentes no interior dos túbulos, por vezes são inacessíveis aos mecanismos de defesa do hospedeiro, aos agentes antimicrobianos aplicados via sistêmica, ao preparo químico cirúrgico, às substâncias irrigantes e à ação da medicação intracanal (Siqueira Jr., 2001). O fator de virulência de algumas espécies, tais como o *Enterococcus faecalis*, pode estar relacionado com a capacidade de invadir os túbulos dentinários e aderir-se ao colágeno (Love, 2001).

As substâncias irrigantes podem penetrar através dos túbulos dentinários a uma profundidade inferior à alcançada pelos microorganismos (Kouchi *et al.*, 1980; Haapasalo *et al.*, 1987; Meryon *et al.*, 1990; Gutierrez *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1993a, Perez *et al.*, 1993b; Buck *et al.*, 2001). Os agentes irrigantes reduzem a flora em apenas 50% (Gutknecht *et al.* 1996a, Gutknecht *et al.* 1996b; Folcwaczny *et al.*, 2002), a permanência do *smear layer* obstrui a entrada dos canalículos e dos túbulos dentinários, formando uma barreira entre o agente irrigante e os microorganismos, protegendo-os da ação anti-séptica das substâncias auxiliares (Folcwaczny *et al.*, 2002). Entretanto, a efetividade do irrigante é amplamente dependente do tipo de bactéria presente nos túbulos dentinários (Buck *et al.*, 2001).

O hipoclorito de sódio a 1% foi o agente de irrigação escolhido nessa pesquisa, por ser uma das substâncias irrigantes mais efetivas, devido ao seu alto poder de dissolução tecidual. Os cocos Gram positivos são mais suscetíveis do que os bacilos Gram positivos esporulados, porém rotineiramente a população de *Enterococcus faecalis* é apenas reduzida, não sendo completamente eliminada pelo uso do hipoclorito de sódio (Buck *et al.*, 2001).

Os *Enterococcus faecalis* são bactérias, classificadas como cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, resistentes à elevação térmica, capazes de multiplicar-se e sobreviver em temperaturas de 10 a 45°C, tornando difícil sua eliminação (Gouw-Soares, 1998; Cecchini, 2001). Outro fator marcante é a sua facilidade em sobreviver e reproduzir-se mesmo em condições de monoinfecção

(Gouw-Soares, 1998; Peciulienė *et al.* 2000, Antônio, 2001). Além desses fatores devemos salientar a capacidade de aderência e de penetração em profundidade na massa dentinária, adaptação a alterações da microbiota e de substrato (Love, 2001). Apresentam resistência às diversas soluções proteolíticas e desinfetantes utilizadas como irrigantes, visando remover o tecido pulpar necrótico infectado e resistem também às medicações intra-radulares, as quais visam promover uma descontaminação do conduto (Sjögren *et al.*, 1991; Gouw-Soares, 1998; Gouw-Soares *et al.*, 2001a, Gouw-Soares *et al.*, 2001b, Gouw-Soares *et al.*, 2001c; Cecchini, 2001; Siqueira Jr., 2001; Buck *et al.* 2001; Love, 2002; Sukawat *et al.*, 2002). Esses espécimes são resistentes inclusive ao hidróxido de cálcio, pois são capazes de resistir a pH alcalino elevado desta substância (Haapasalo *et al.*, 1987; Peciulienė *et al.*, 2000, Peciulienė *et al.*, 2001; Siqueira Jr., 2001; Cecchini, 2001), sobrevivem a um pH de até 11,5 (Sukawat, 2002), sendo capazes de aderirem às células do hospedeiro. São considerados uma das espécies de microorganismos mais resistentes ao preparo químico cirúrgico, e a sua população na flora do canal radicular, após a instrumentação, pode se tornar mais alta do que a original (Peciulienė *et al.*, 2001).

O *Enterococcus faecalis* foi escolhido para esse experimento pela sua alta resistência a diversas modalidades de tratamento tradicional. Além disso, o *Enterococcus faecalis* é uma bactéria encontrada em alta incidência em dentes portadores de lesões periapicais refratárias ao tratamento convencional (Gutknecht *et al.*, 1996 a, Gutknecht *et al.*, 1996b; Murray *et al.*, 1997; Antônio, 2001; Buck *et al.*, 2001; Gouw-Soares, 1998; Gouw-Soares *et al.*, 2001a, Gouw-Soares *et al.*, 2001b; Eduardo e Gouw-Soares, 2001; Sukawat *et al.*, 2002).

Devido à capacidade limitada de eliminar os microorganismos e seus irritantes teciduais do sistema de canais radiculares que as substâncias auxiliares apresentam durante o preparo químico cirúrgico, faz-se necessário o uso de uma medicação intracanal, para a obtenção da adequada limpeza e desinfecção do canal radicular e prevenir o crescimento, multiplicação e recolonização de espécimes remanescentes no interior da massa dentinária.

O Ca(OH)_2 é consagrado como medicação de demora utilizado como curativo após o preparo químico cirúrgico em canais contaminados, por ser capaz de reduzir o conteúdo microbiano (Sjögren *et al.*, 1991). O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio é proveniente dos íons hidroxila; porém, a dentina tem uma capacidade tamponante própria para bases, o que provoca o decréscimo do pH dessa medicação. Esse fator é um dos responsáveis pela não eliminação total de algumas espécies microbianas, como os *Enterococcus faecalis* (Peciulienė *et al.*, 2000, Peciulienė *et al.*, 2001; Sukawat *et al.*, 2002).

O paramonoclorofenol canforado (PMCC) foi escolhido para ser adicionado à pasta de hidróxido de cálcio nesse experimento, pois diversos estudos têm sido realizados comprovando o seu efeito antimicrobiano. O PMCC pode ter um efeito tóxico sobre o tecido periapical quando usado em altas concentrações (Siqueira Jr. *et al.*, 1996; Sukawat *et al.*, 2002). Kawahara *et al.* (1975) observaram que muitas vezes se utilizam concentrações mais altas do que as necessárias para se obter o efeito antimicrobiano ideal na terapia endodôntica. O paramonoclorofenol canforado é um composto fenólico com bom espectro de ação antimicrobiana, estável, incolor e não mancha os tecidos dentários, possui baixa tensão superficial e é altamente penetrante, podendo atuar à distância devido à sua capacidade de difusão (Siqueira Jr., 1997, Leonardo *et al.*, 1998). Dependendo de sua concentração, pode atingir a junção cimento-dentina (Haapasalo *et al.*, 1987). A atividade bacteriana promove o rompimento da membrana citoplasmática bacteriana, a desnaturação protéica, a inativação enzimática de oxidases e desidrogenases bacterianas. Há a liberação de cloro, que é antibacteriano e a cânfora diminui sua toxicidade.

A adição do paramonoclorofenol canforado à pasta de hidróxido de cálcio é ideal porque propicia uma maior capacidade de difusão, podendo penetrar mais profundamente na massa dentinária, aumentando a capacidade de redução de microorganismos viáveis no sistema de canais radiculares, inclusive sobre os *Enterococcus faecalis* (Sukawat *et al.*, 2002). O hidróxido de cálcio em contato com o paramonoclorofenol canforado, provoca uma reação química, ocorrendo a liberação de um sal bactericida composto por paramonoclorofenol e hidroxila. Os componentes fenólicos apresentam baixa tensão superficial e podem penetrar facilmente nos

túbulos dentinários. A pasta de hidróxido de cálcio, associada ao paramonoclorofenol canforado demonstrou boa resposta dos tecidos periapicais. Fato explicado devido à liberação mais lenta do hidróxido de cálcio promovida pela presença do paramonoclorofenol canforado. Além disso, sua concentração na pasta não é suficiente para destruir o tecido (Sukawat *et al.*, 2002).

A penetração bacteriana nos túbulos dentinários foi analisada por diversos autores como Kouchi *et al.* (1980), Haapasalo *et al.* (1987), Meryon *et al.* (1990), Perez *et al.* (1993a, b). Em um modelo bovino *in vitro* Haapasalo *et al.* (1987) observaram que o *Enterococcus faecalis* demorou 48 horas para penetrar em toda a extensão do corpo de prova, sendo que este permaneceu durante todo o período, submerso no meio de cultura.

Nesta pesquisa optou-se pelo uso de uma micropipeta de semi-precisão para inocular 10µl no canal radicular do corpo de prova. Esta medida constitui-se na quantidade suficiente para preencher todo o conduto. No entanto, como o espécime não permaneceu submerso no meio de cultura, optou-se por um período maior de incubação, durante 72 horas, visando facilitar a penetração bacteriana em profundidade nos túbulos e canáliculos dentinários (Antônio, 2001).

Nesta pesquisa, preconizou-se a utilização de EDTA 17% pós-instrumentação para remover o *smear layer* da superfície dentinária, expondo os túbulos e canáliculos dentinários e desta maneira facilitando a penetração bacteriana em profundidade na massa dentinária (Haapasalo *et al.*, 1987; Antônio, 2001).

Para impedir que as bactérias alcançassem a superfície externa radicular, e permanecessem restritas ao sistema de canais radiculares, utilizou-se uma gota de cola Super-Bonder para o selamento do forame apical (Antônio, 2001) e a aplicação de 2 camadas de esmalte de unha sobre o cimento radicular visando impermeabilizá-lo (Haapasalo *et al.*, 1987).

O uso de dentes humanos como espécimes neste experimento *in vitro*, almejou reproduzir da melhor maneira possível a realidade clínica, viabilizando o uso da técnica de desinfecção preconizada neste estudo para uso na rotina do consultório. Os espécimes foram preparados de acordo com uma técnica consagrada. O hipoclorito de sódio a 1% foi usado como agente irrigante, seguido

da irrigação com EDTA - 17% (efetivo na remoção de *smear layer* e pré-dentina, promovendo um maior grau de abertura dos túbulos dentinários) e finalmente, o ultra-som, para uma melhor limpeza e remoção de resíduos remanescentes do preparo químico cirúrgico.

Visando reproduzir da melhor forma possível a infecção endodôntica, utilizamos a concentração de $1,5 \times 10^8$ ufc/ml de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) que correspondente àquela encontrada *in vivo* em infecções dentárias (Gutknecht *et al.*, 1996b).

Após 72 horas de incubação e antes da irradiação dos espécimes, um cone de papel estéril foi utilizado, com a finalidade de remover o conteúdo da luz do canal, permanecendo apenas as bactérias localizadas nas paredes e no interior da massa dentinária. Na seqüência, um segundo cone de papel estéril foi introduzido no canal, com o intuito de comprovar, com o teste da Turbidez, a presença bacteriana antes da irradiação.

Diversos estudos *in vitro* com variadas técnicas para constatar a presença de microorganismos no interior dos canais radiculares vêm sendo realizados (Kouchi *et al.*, 1980; Haapasalo *et al.*, 1987; Meryon *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1993a, b). Em alguns optou-se pelo análise em MEV (Siqueira Jr., 1996), porém, esse tipo de avaliação apenas evidenciará a presença ou ausência de microorganismos na superfície avaliada, não permitindo constatar a viabilidade, a capacidade de reinfecção e se há presença de bactérias alojadas em profundidade nos túbulos dentinários. Quando se realiza a cultura bacteriana e a contagem das u.f.c./ml, pode-se constatar a presença de microorganismos viáveis alojados em maior profundidade (Haapasalo *et al.*, 1987; Sydney, 1996b; Gouw-Soares, 1998; Antônio, 2001 Cecchini, 2001).

Para que a contagem das u.f.c./ml fosse viável realizou-se o processo de diluição usada na cultura. O espécime foi colocado em 1ml de água peptonada, sendo agitado durante 2 minutos em um *Vortex*. Na seqüência, diluições seriadas foram realizadas até a concentração de 10^{-5} . A técnica em triplicata de semeadura foi utilizada no Agar *m-Enterococcus*. Esse meio foi escolhido por ser seletivo para *Enterococcus spp.*, não permitindo o crescimento de outras bactérias que pudessem

ter contaminado o experimento durante os passos operatórios. As etapas foram realizadas na câmara de fluxo laminar. Os Grupos Controle Negativo Imediato e 48 horas não apresentaram crescimento bacteriano, comprovando que não houve contaminação externa.

Ainda simulando condições *in vivo*, após a irradiação foram introduzidos 10µl de TSB no interior do conduto radicular, com auxílio de uma micropipeta de precisão, a cada 24 horas, durante 48 horas. O TSB é um meio nutritivo que foi usado com a finalidade de atuar como nutriente, facilitando o crescimento bacteriano de espécimes viáveis, permitindo sua detecção na coleta realizada após 48 horas.

A reinfecção dos dentes tratados endodonticamente pode ocorrer devido à presença de microorganismos infiltrados na intimidade da massa dentinária, e também por espécimes inoculados durante as manobras endodônticas (Buck *et al.*, 2001). Devido à capacidade limitada das substâncias químicas e medicações em eliminar os microorganismos dos canais radiculares, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas utilizando diversos lasers como coadjuvantes na redução microbiana (Gutknecht *et al.*, 1996a, Gutknecht *et al.*, 1996b, 1997; Moritz *et al.*, 1997a, Moritz *et al.*, 1997 b; Gouw-Soares, 1998; Gutknecht *et al.*, 2000; Gouw-Soares *et al.*, 2001a, Gouw-Soares *et al.*, 2001b, Gouw-Soares *et al.*, 2001c; Cecchini, 2001; Antônio, 2001; Eduardo & Gouw-Soares, 2001 a, Eduardo & Gouw-Soares, 2001 b; Eduardo *et al.*, 2002; Folwaczny *et al.*, 2002). A redução microbiana com a irradiação laser na terapia endodôntica é obtida pelo efeito térmico com o aumento controlado da temperatura. A irradiação laser promove a vaporização do material orgânico ou dos *debris* remanescentes, contribuindo para a redução microbiana dentro do canal radicular, diminuindo a proliferação e devido à ação térmica, pode ocorrer a atuação em profundidade (Cecchini, 2001).

De acordo com o laser utilizado, pode aumentar a permeabilidade dentinária (Lage-Marques, 1997; Gouw-Soares *et al.*, 2001b).

Conforme a densidade de energia empregada, diferentes gradientes de temperatura e efeitos diversos são estabelecidos nos tecidos irradiados. Durante a irradiação intracanal, um ponto primordial a ser considerado para não haver o estabelecimento de dano aos tecidos de suporte, é o aquecimento da superfície

radicular externa. A absorção da luz pelo tecido alvo é responsável por efeitos térmicos. Nesse processo ocorre a conversão de energia luminosa em energia térmica. A absorção da energia do laser no tecido é a somatória das absorções de cada um de seus componentes (Zezell *et al.*; 1998, Zezell *et al.*; 1999; Brandão, 2001). Portanto, antes de iniciar um tratamento, os parâmetros de exposição a serem empregados devem ser definidos, sendo necessário avaliar o comprimento de onda, potência, intensidade ou densidade de energia, tempo de exposição, regime de operação e as propriedades óticas do tecido alvo, pois estes fatores determinarão a natureza e a extensão da interação laser com o tecido (Miserendino & Pick, 1995).

A aplicação do laser de diodo, como coadjuvante ao tratamento endodôntico em dentes portadores de contaminação, promoverá a elevação térmica causando efeitos danosos aos microorganismos, inclusive aos resistentes à terapêutica tradicional (Gouw-Soares *et al.*, 2001c). O aumento da temperatura da superfície externa radicular acima de 10°C, durante as manobras intra-radulares deve ser evitado, pois poderá provocar necrose dos ligamentos periodontais, anquilose do cimento ao osso alveolar e reabsorção radicular externa (Eriksson e Albrektsson, 1983; Carruth *et al.*, 1986). A energia térmica produzida pelo feixe laser não deverá causar um super aquecimento, evitando o estabelecimento de resultados adversos (Gutknecht *et al.*, 1996, Moritz *et al.*, 1997).

Por esta razão, se realizou um estudo prévio de monitoramento da elevação térmica, durante a irradiação intra-radicular com o laser de diodo em alta intensidade. Após diversos parâmetros serem testados, optou-se por utilizar os parâmetros de 2,5W e 3W, pois não promovem um aumento térmico acima de 10°C no tempo de 1 minuto, que é o limiar permitido aos tecidos periodontais (Eriksson e Albrektsson, 1983), tornando sua utilização viável clinicamente. (FIG. 18a, 18b, 18c), (TAB. 3 e 4).

A literatura descreve a associação de diversos outros lasers ao tratamento convencional com o objetivo de reduzir a população microbiana (Gutknecht, 1996, Gutknecht, 1997, Gutknecht, 2000a, Gutknecht, 2000b; Gouw-Soares, 1998, Gouw-Soares 2001a, Gouw-Soares 2001b; Antônio, 2001; Cecchini, 2001; Eduardo e Gouw-Soares, 2001a, Eduardo e Gouw-Soares, 2001b; Folwaczny, 2002). Porém,

poucos estudos foram realizados com o laser de diodo em alta intensidade (Moritz *et al.*, 1997a, Moritz *et al.*, 1997 b; Gutknecht *et al.*, 2000 a, Gutknecht *et al.*, 2000b).

O laser de diodo foi selecionado neste estudo devido ao seu comprimento de onda, por apresentar uma capacidade de penetração maior que os outros lasers, pelo fato de quase não ser absorvido pela água. Além disso, possui diversas outras vantagens, como ser portátil, podendo ser facilmente transportado; apresentar o preço mais acessível entre os lasers em alta intensidade; pode ser utilizado em várias outras modalidades na clínica diária, viabilizando seu uso por profissionais de diversas áreas, devidamente treinados. O meio de entrega é constituído por fibra ótica, o modo de emissão pode ser contínuo ou interrompido (Moritz *et al.*, 1997 a, Moritz *et al.*, 1997 b; Klim *et al.*, 2000). Entretanto, para uma adequada utilização é preciso que o profissional apresente conhecimento e compreensão de suas interações com os tecidos.

Wymann *et al.* (1992); Klim *et al.* (2000), afirmam se tratar de um laser com interações teciduais semelhantes a do Nd:YAG, porém, com um poder de penetração superior, especialmente quando utilizam comprimentos de onda próximos a 800nm. Um equipamento com essas características pode ser capaz de descontaminar a massa dentinária do sistema de canais radiculares em profundidade, proporcionando um alto índice de descontaminação microbiana (Gutknecht *et al.*, 2000a, b).

A constituição da parede celular das bactérias é decisiva quando se avalia a resistência individual de cada espécie frente à irradiação laser. As pertencentes ao Grupo Gram positivo como o *Enterococcus faecalis*, parecem ser mais resistentes do que as Gram negativas como as *E. coli*, quando irradiadas com laser. A resistência bacteriana pode se relacionar também com a quantidade de água, volume da célula, propriedades de absorção da luz, capacidade de migração para o interior da massa dentinária e produção de pigmentos (Antônio 2001, Folwaczny *et al.*, 2002).

Um fator desfavorável da fibra ótica tradicional, se deve à condução do feixe em apenas uma direção durante a irradiação intracanal. Para minimizar esta limitação utilizamos a técnica helicoidal de Gutknecht (1996a, b). Nesta técnica a

irradiação é conduzida de apical para cervical, a uma velocidade de 2 mm/s, em quatro repetições de 10 segundos, visando irradiar todo o conduto.

Conforme resultados obtidos em diversos trabalhos encontrados na literatura, pode-se considerar como consagrada a capacidade imediata de redução microbiana em endodontia, quando se associa os lasers ao tratamento tradicional (Gutknecht *et. al.*, 1996 a, Gutknecht *et. al.*, 1996 b, Gutknecht *et. al.*, 1997, Gutknecht *et. al.*, 2000 a, Gutknecht *et. al.*, 2000 b; Moritz *et. al.*, 1997; Gouw-Soares, 1998; Gouw-Soares *et. al.*, 2001 b; Antônio, 2001; Eduardo e Gouw-Soares, 2001; Folwaczny *et. al.*, 2002). Fato comprovado em nosso experimento, que demonstrou acentuada redução da população bacteriana imediatamente após a irradiação, atingindo níveis de redução na contagem das u.f.c./ml de 98,5% para o Grupo 1 (3W), e de 99,2% para o Grupo 2 (2,5W).

As condições *in vivo*, como a presença de exsudato, fluido tissular, pus e fluido dentinal atuam favoravelmente na reinfecção do conduto pós instrumentação. Com o objetivo de reproduzir essa situação *in vitro*, introduziu-se 10 µl de TSB nos grupos L1-48 horas e L2-48 horas a cada 24 horas, durante o período de 48 horas após a irradiação. O propósito de preencher os canais com TSB, foi para que este atuasse como nutriente (Antônio, 2001), avaliando dessa maneira, se o remanescente da população bacteriana seria capaz de reproduzir e recolonizar novamente o sistema de canais radiculares.

Neste trabalho pode-se perceber claramente que o Grupo Laser 48 horas apresentou um comportamento diferente, de acordo com o parâmetro utilizado. A diferença entre as potências 3W e 2,5W foi significativa. O primeiro parâmetro reduziu significativamente o número de bactérias em relação ao Grupo Controle Positivo, obtendo-se apenas uma porcentagem de aproximadamente 3,27% de u.f.c./ml. Porém, o segundo parâmetro, de 2,5W, foi incapaz de apresentar uma redução na mesma porcentagem, resultando em uma porcentagem de 42,4% de u.f.c./ml.

Provavelmente o que contribui para a sobrevivência do *Enterococcus faecalis* após a irradiação, é a sua capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários e ligar-se ao colágeno, demonstrado por Love (2001), o que pode

tê-los protegido da ação do feixe laser. Por essa razão, se faz necessário o uso de um curativo intracanal, visando aumentar a efetividade da técnica empregada, impedindo o crescimento de bactérias viáveis que possam ter sobrevivido à terapia endodôntica associada ao uso do laser de diodo em alta intensidade. O uso da pasta de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado como medicação intracanal após a irradiação laser, demonstrou ser efetiva, impossibilitando a recontaminação dos espécimes, mesmo após 48 horas, apresentando um resultado consideravelmente melhor do que nos Grupos Laser 48 horas com ambos os parâmetros.

Os *Enterococcus faecalis*, mesmo quando em concentrações muito baixas como 10^1 e 10^2 , são capazes de se implantar no sistema de canais radiculares e originar processos inflamatórios nos linfonodos (Antônio, 2001).

Por todos estes fatores, escolhemos como curativo de demora a pasta de hidróxido de cálcio contendo paramonoclorofenol canforado, associada ao tratamento com irradiação intracanal com laser de diodo de alta intensidade, no comprimento de onda de 830nm, visando analisar os níveis de redução bacteriana.

O grupo que recebeu o curativo de hidróxido de cálcio associado a paramonoclorofenol canforado, após ter o curativo removido, recebeu 10 μ l de TSB como nutriente, com o propósito de comprovar se realmente não havia mais bactérias viáveis de promover uma reinfecção.

O uso do laser de diodo em tratamentos endodônticos é indicado, sendo vantajoso quando comparado à terapêutica tradicional, principalmente nos casos de infecções resistentes e ou refratárias, devido a sua efetividade em profundidade, no interior dos túbulos dentinários. O laser de diodo mostrou-se uma ferramenta extremamente útil nos casos de tratamento de lesões contaminadas, e sua associação com o hidróxido de cálcio maximiza a capacidade de redução bacteriana. O uso da pasta de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado como curativo de demora associado à irradiação com o laser de diodo, demonstrou ser eficiente na redução bacteriana, pois as amostras tratadas com esta associação não apresentaram crescimento bacteriano. Dessa maneira, fica demonstrado o benefício do uso do laser de diodo em alta intensidade associado à medicação intracanal. É

conhecido que existe a presença de microorganismos em dentes sem sinais ou lesões periapicais, sugerindo que alguns dentes tratados podem estar contaminados, comprovando que a permanência de bactérias no interior de canais radiculares não propicia necessariamente a falha do tratamento, mas com certeza, sua ausência favorece e aumenta muito o índice de sucesso.

Durante a avaliação em MEV, constatou-se que, dependendo do parâmetro utilizado, a irradiação intracanal com o laser de diodo em alta intensidade poderá promover a remoção e evaporação do magma dentinário, a obliteração parcial ou em grande quantidade dos túbulos dentinários, o que reduz a permeabilidade dentinária, e promove o aumento da microdureza da dentina.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante da análise dos resultados e frente à metodologia empregada, é lícito concluir que:

1. As potências de 3W e 2,5W demonstraram ser parâmetros seguros para a irradiação intracanal e promoveram acentuada redução da população bacteriana imediatamente após a irradiação, obtendo-se níveis de redução na formação das u.f.c./ml de 98,5% para o Grupo 1 (3W), e de 99,2% para o Grupo 2 (2,5W).
2. No Grupo Laser sem receber medicação intracanal, com avaliação microbiológica após 48 horas, apresentou um índice de redução para o Grupo 1 (3W) de 96,5% e para o Grupo 2 (2,5 W) de 57,6%. Houve aumento da quantidade de u.f.c./ml em ambos os parâmetros, quando comparado com os Grupos Laser avaliados imediatamente após a irradiação, nos quais houve a redução imediata de 98,5% para o Grupo 1 e de 99,2% para o Grupo 2.
3. O uso da pasta de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado como curativo de demora associado à irradiação com o laser de diodo, demonstrou ser eficiente na redução bacteriana, visto que as amostras desse grupo não apresentaram crescimento bacteriano. Dessa maneira, fica demonstrado o benefício do uso da terapia laser associada à medicação intracanal.
4. As fotomicrografias das amostras irradiadas com laser apresentaram a superfície limpa, sem *smear layer*, com morfologia dentinária levemente diferente, distribuído homoganeamente por toda área irradiada obliterando grande parte dos túbulos dentinários.

ANEXOS

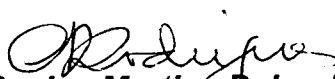


PARECER nº 87/02
Protocolo 29/02

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Avaliação da redução bacteriana em conduto radicular infectado e irradiado com laser de diodo. Estudo "in vitro"**", de responsabilidade da pesquisadora **Claudia Amaral Rabello de Mello Radaelli**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios referentes ao andamento da pesquisa em 27 de novembro de 2002 e em 27 de maio de 2003. Ao término da pesquisa, cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEP.

São Paulo, 27 de maio de 2002


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

ANEXO B

Principais características dos *Enterococcus faecalis*

a) Fisiologia e Estrutura

Os enterococos foram previamente classificados como pertencentes ao Grupo D dos estreptococos, porque possuem um antígeno na parede celular (o ácido glicerol teicoic associado com a membrana citoplasmática). As espécies mais comumente isoladas são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Os enterococos são cocos Gram positivos, tipicamente distribuídos em pares ou cadeias curtas. A morfologia microscópica desses espécimes quando isolados, é de difícil distinção do *Streptococcus pneumoniae*. Esses cocos são anaeróbios facultativos e crescem em temperatura de aproximadamente 35°C; quando isolados, podem crescer em temperaturas que variam de 10 a 45°C. Crescem rapidamente em meio de Agar, com colônias brancas aparecendo após 24 horas de incubação. As colônias são tipicamente não hemolíticas, mas podem ser alfa hemolíticas ou betahemolíticas. Os enterococos crescem na presença de cloreto de sódio a 6,5%, toleram 40% dos sais biliares. Para diferenciar as variadas espécies de enterococos, testes de certas propriedades devem ser realizados: reações de fermentação, motilidade, produção de pigmentos (Murray *et al.*, 1998).

b) Patogênese e Imunidade

Os enterococos são organismos comensais e têm potencial limitado para causar doenças. Essas bactérias não possuem uma toxina única potente ou uma enzima hidrolítica, como as produzidas por outros microorganismos, sendo por vezes fagocitadas pelas células de defesa do hospedeiro. Entretanto, a combinação dos fatores de virulência pode tornar possível que os enterococos promovam doenças sérias. Por exemplo, proteínas e carboidratos são fatores que permitem a adesão de organismos a células. Os enterococos podem também produzir proteínas como bacteriocininas que inibem a competição bacteriana, e possibilitam a multiplicação dessa espécie, que se torna resistente e regula a sobrevivência de organismos na presença de antibioticoterapia

empírica. Os enterococos são resistentes a optocin, não se dissolvem frente à bile, produzem pigmentos, têm motilidade (Murray *et al.*, 1998).

c) Epidemiologia

São bactérias entéricas comensais humanas ou de algumas variedades de animais, encontradas no trato gastrointestinal e genito-urinário. Não são comumente isoladas no trato respiratório ou na pele. A maior parte das infecções com enterococos, é transmitida via paciente a paciente, ou pelo consumo de água ou alimentos contaminados. Encontram-se adaptados à ecologia rica em nutrientes, meios com teor de oxigênio reduzido. Sua maneira de atuar é colonizando inicialmente o hospedeiro e envolvendo-se em uma série de interações. Inicialmente há uma perda da associação física dos organismos com a superfície de um tecido que permite uma adesão mais forte e permanente, a qual será estabelecida através de atividades adesivas das superfícies das células microbianas às dos receptores das células do hospedeiro. Uma vez que as células são aderidas, tornam-se viáveis de utilizar os nutrientes, iniciando a competição com outras espécies bacterianas do ambiente. Uma vez que esses mecanismos são estabelecidos em múltiplos sítios, os hospedeiros tornam-se colonizados (Murray *et al.*, 1998; Love, 2001).

Encontram-se normalmente no intestino humano, mas podem permanecer temporariamente na cavidade bucal, especialmente o *Enterococcus faecalis*, que pode ser encontrado na placa, saliva, superfície da mucosa e gengiva. Quando presentes na cavidade oral, podem estar associados com lesões na mucosa de pacientes imuno-suprimidos, podendo atuar como agente super-infectante em periodontites e infecções endodônticas refratárias. Dahlén *et al.* (2000) e Sjögren *et al.* (1991) observaram que os *Enterococcus faecalis* podem ser encontrados freqüentemente em amostras de dentes vitais e em dentes com grande destruição coronária, sugerindo que esses atinjam o canal radicular a partir de lesões cariosas e do sulco gengival.

É conhecido que bactérias viáveis podem recolonizar o sistema de canais radiculares após este ter sido preparado corretamente com instrumentação químico-mecânica (Sundqvist, 1992a, 1992b; Siqueira Jr., 2001).

Os *Enterococcus faecalis* podem invadir eficientemente os túbulos dentinários (Haapasalo *et al.*, 1987; Sydney, 1996 a, b; Gutknecht *et al.*, 1996 a, b; Moritz *et al.*, 1997; Gouw-Soares, 1998; Love, 2001) e reinfetar o canal radicular preparado (Gouw-Soares, 1998, Peciulienė *et al.*, 2000; Love, 2001). Para isso ocorrer, as células precisam ser viáveis, capazes de adaptar-se ao suplemento da reserva de nutrientes que foi alterado, e hábeis para crescerem dentro dos túbulos. Os *Enterococcus* possuem um fator de virulência que possibilita essa ocorrência, apresentam a aderência às células hospedeiras, assegurando a sobrevivência de suas células como resultado de uma alteração do substrato do meio ambiente, sendo ainda, capazes de competir com outras espécies bacterianas e alterar a resposta do hospedeiro (Love, 2001).

A composição do fluido dentinal da raiz de dentes não vitais não está bem elucidada. Existe uma teoria que afirma que seja proveniente do fluido intersticial, originado a partir do osso alveolar e do ligamento periodontal, podendo ser também proveniente de soro remanescente. Acredita-se que esse fluido possa sustentar as células dentro dos túbulos, permitindo que elas causem doenças. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos bacterianos durante a invasão bacteriana aos túbulos dentinários. O conteúdo dos túbulos dentinários têm uma quantidade apreciável de colágeno não mineralizado, e recentemente tem sido estabelecido que a invasão do túbulo dentinário por estreptococos orais está associada à capacidade das células bacterianas em aderirem-se ao colágeno. Essa propriedade é mediada por antígenos de estreptococos tipo I/II presente nas proteínas das paredes celulares. Alguns polipeptídeos dos antígenos I/II dos estreptococos estão também envolvidos no processo de invasão realizado por outras espécies que não têm a capacidade de invadir sozinhas (Love, 2001).

Esta espécie bacteriana é freqüentemente encontrada em infecções do sistema de canal radicular de dentes, exibindo patologia periapical crônica (Fabricius *et al.*, 1982a, 1982b; Dahlén *et al.*, 1982; Sydney *et al.*, 1996a; Gouw-Soares, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Siqueira Jr., 2001; Love, 2001). Os *Enterococcus faecalis* são responsáveis por 80 a 90% das infecções

enterocóccicas humanas (Love, 2001). O *Enterococcus faecalis* é a espécie dominante entre os *Enterococcus* (Love, 2001) e comumente a única a ser recuperada em canais obturados (Sundqvist, 1998a, b; Dahlén *et al.*, 2000; Love, 2001). Estes fatos indicam que o mesmo tem uma papel patogênico em falhas de tratamento endodôntico. Tem sido sugerido que sua virulência pode estar relacionada com a resistência a medicamentos intracanais como o hidróxido de cálcio e na habilidade de sobreviver em canais radiculares com um organismo único sem necessitar de interação com outras bactérias (Fabricius *et al.*, 1982a, b; Dahlén *et al.*, 1982; Sydney, 1996b; Gouw-Soares, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000 e 2001; Love, 2001; Siqueira Jr., 2001).

Portanto, quando essa bactéria se estabelece no sistema de canais radiculares, sua erradicação por métodos convencionais é extremamente difícil (Peciulienė, 2000; Siqueira Jr., 2001). No momento em que microorganismos se tornam inacessíveis aos produtos de desinfecção intra-radicular, a infecção do tecido extra-radicular pode ser um fator de falha no tratamento endodôntico (Siqueira Jr., 2001; Peciulienė *et al.*, 2000 e 2001).

Provavelmente, um dos mais significativos mecanismos de invasão do sistema de defesa do hospedeiro é a organização dos microorganismos na forma de um biofilme. Um biofilme pode ser definido como uma população microbiana aderida a um substrato orgânico ou inorgânico, cercado por produtos microbianos extracelulares, que formam uma matriz intermicrobiana. Os microorganismos organizados em biofilmes mostram uma alta resistência frente a agentes microbianos e mecanismos de defesa do hospedeiro. Dentes com lesões refratárias ao tratamento endodôntico, têm um índice considerável de ocorrência de biofilmes adjacentes ao forame periapical e de colônias de bactérias localizadas dentro dos granulomas periradiculares. Esses achados sugerem que a organização bacteriana em biofilmes permite a invasão das defesas do hospedeiro e facilita a persistência das lesões periradiculares. A presença do biofilme não é detectável clinicamente na maioria dos casos, mesmo naqueles onde o resultado da cultura é negativo. Nesses casos, mesmo após ter sido executado o tratamento tradicional não ocorre a cura, podendo

suspeitar da presença de microorganismos dentro do sistema de canais radiculares, ou da presença de biofilme (Siqueira Jr., 2001).

d) Tratamento, prevenção e controle

A terapia antimicrobiana para tratamento de infecções por enterococos é complicada pois a maioria dos antibióticos não é bactericida em concentrações relevantes.

Os *Enterococcus faecalis* apresentam a facilidade de troca pela membrana plasmática e de aderência às células epiteliais e outras células do hospedeiro. Secretam citolisina, que é uma proteína que inibe o crescimento de outras bactérias Gram positivas, facilitando a colonização e induzindo dano tecidual. Produzem gelatinase, sendo capazes de hidrolisar gelatina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos pequenos, resistentes a antibióticos que possuam aminoglicosídeos, beta-lactídeos e vancomicina. (Murray *et al.*, 1998).

No intuito de erradicar os processos infecciosos, muitos profissionais administram indiscriminadamente antibióticos via sistêmica, o que contribui sobremaneira para o aumento da resistência bacteriana frente aos antibióticos. Espécimes bacterianos, como o *Enterococcus faecalis*, são refratários ao tratamento endodôntico, resistentes a diversos antibióticos como eritromicina, ampicilina, benzilpenicilina, clindamicina, metronidazol, tetraciclina (Dahen *et al.*, 2000; Noda *et al.*, 2000; Zouain e Araj, 2001), e também a diversos antimicrobianos com hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado, clorexidina e hipoclorito de sódio (Siqueira Jr. e Uzeda, 1996; Ayhan *et al.*, 1999; Buck *et al.*, 2001).

Portanto, a eliminação da flora microbiana dos canais radiculares é a chave para o sucesso no tratamento endodôntico das periodontites apicais (Peciulienė *et al.*, 2000). É de conhecimento que os procedimentos tradicionais de desinfecção intra-radicular e a administração de antibióticos pode não afetar facilmente as bactérias localizadas na região externa do forame apical. A utilização de medicamentos endodônticos nos tecidos periradiculares no intuito de eliminar os microorganismos e decompor os biofilmes periradiculares não parece ser o procedimento mais adequado. E em segundo lugar, dependendo

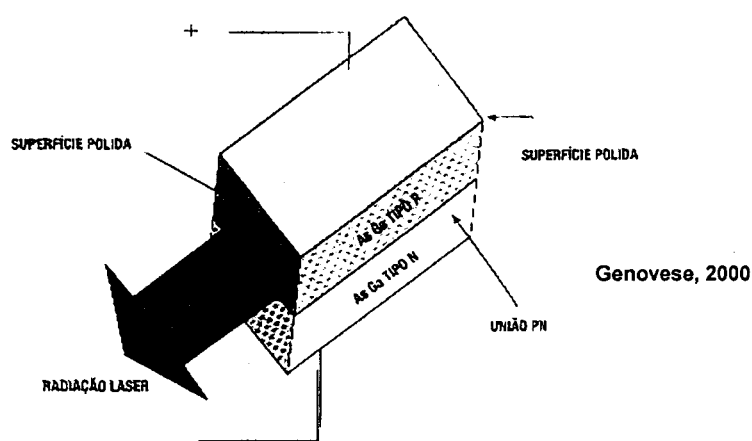
da concentração da medicação, esta poderá provocar reação citotóxica, e ter seus efeitos antimicrobianos neutralizados após a extrusão apical (Siqueira

ANEXO C

Características do laser de diodo

O laser de diodo tem um meio ativo sólido; um semicondutor de estado sólido que usa tipicamente algumas camadas de Gálio, Arseneto e outros elementos como Alumínio e Índio para troca de energia elétrica em energia luminosa (Klim *et al.*, 2000).

O laser de diodo é um *chip* semicondutor que funciona como um diodo elétrico. A região ativa do diodo lembra um sanduíche de materiais semicondutores diferentes. Uma camada de material condutor de carga elétrica positiva (camada P) é separada de outra camada de material condutor de cargas negativas (camada N), e por uma camada não condutora. Quando uma corrente de voltagem negativa é aplicada à camada N e uma corrente positiva é aplicada à P, ocorre o fenômeno de troca na camada não condutora, permitindo que os elétrons passem através de furos existentes nesta camada liberando energia. Na maioria dos semicondutores a energia é liberada na forma de calor; porém, em materiais como arseneto de Gálio e Alumínio, a energia é liberada na forma de fótons. (FIG. 1)



"FIGURA 38 - Representação esquemática do laser de diodo de GaAs".

Para que o diodo emissor de luz seja formador de radiação laser, faz-se necessária a adição de superfícies refletoras em cada extremidade da junção, de forma a criar uma cavidade óptica. Embora essas cavidades sejam extremamente

pequenas, podem produzir vários Watts de potência. A geometria da cavidade óptica resulta em um raio assimétrico, que necessita ser recolimado e focalizado. A potência de vários diodos podem chegar a 100 Watts (Genovese, 2000).

Os lasers de diodo apresentam a vantagem de serem portáteis, de preço acessível, com eficiência relativamente alta de conversão elétrica em ótica, geração de calor menor do que a decorrente de outros lasers como o Nd:YAG. Geram algumas dezenas de Watts, permitindo o resfriamento da unidade por convecção, resultando em aparelhos silenciosos durante a operação, além de possuírem uma vida útil longa (Wymann *et al.*, 1992).

Os lasers de diodo comerciais para odontologia emitem comprimentos de onda na região entre o vermelho e o infravermelho de 620nm a 1200nm do espectro eletromagnético, que são determinados pelo tipo de material semicondutor utilizado (Maldonado, 2001). Porém, a faixa do comprimento de onda de emissão dos lasers de diodo cirúrgicos situa-se na região de 800 a 2 μ m, no início do espectro não ionizante invisível no infravermelho (Klim *et al.*, 2000).

Musacchio em 2000, afirma que os diodos possuem comprimentos de onda no espectro vermelho e infravermelho entre 620 a 1500nm, os quais são determinados pelo tipo de material semicondutor utilizado. Esses tipos de lasers utilizados na odontologia são empregados com finalidades terapêuticas. Dentre eles temos:

- a. Arseneto de Gálio e Alumínio ou AsGaAl: vermelho até o infravermelho próximo variando de 620nm a 900nm; emitindo no modo de operação contínuo;
- b. Arseneto de Gálio ou AsGa: infravermelho próximo variando de 830nm a 920nm; opera com regime de emissão pulsado;
- c. Seleneto de Chumbo-Estanho ou PbSnSe: infravermelho de 1000 a 1200nm;
- d. Antimoniato de Gálio ou GaSb: infravermelho situado na faixa de 1500nm.

Existem outras modalidades de uso do laser de diodo, além da Terapia Laser em Baixa Intensidade do inglês *Low Intensity Laser Therapy* (LILT), que utiliza as propriedades da luz laser com fins analgésicos, de bioestimulação e de

biomodulação, nos comprimentos de onda próximos a 630nm, com potência variando entre 1 e 100mW (Túner, 1996; Gouw-Soares *et al.*, 2001a).

Outra modalidade a que se destina o laser de diodo situado na região do comprimento de onda de 655nm, emitindo no modo pulsado, com potência em torno de 1mW, é a sua utilização como coadjuvante no diagnóstico de cáries dentais. Ao irradiar esmalte hígido e o cariado com certos comprimentos de onda do diodo, ocorre a produção de fluorescência que pode ser medida e quantificada, auxiliando no diagnóstico precoce da cárie dental. A precisão dessa técnica de diagnóstico se baseia na comparação dos seus resultados com os obtidos com as técnicas convencionais. Existem diversas vantagens, pois o diagnóstico da cárie oclusal pode ser feito sem o uso de sonda exploradora, devido à possibilidade de registrar e quantificar o resultado do diagnóstico, podendo monitorar lesões e acompanhá-las. Porém, a fluorescência não diferencia lesões cariosas de defeitos congênitos de formação do dente e não apresenta a capacidade de detectar a presença de cárie secundária sob as restaurações (Chaves, 2001).

É difícil especificar o efeito exato que o laser de diodo terá em cada situação terapêutica. O impacto da energia laser no tecido dependerá da localização e da distância da fibra do tecido. Quando a intensidade é suficientemente alta e a fibra é colocada em contato com o tecido ocorrerá corte do tecido mole, mas se a fibra for posicionada a uma distância de aproximadamente 2mm do alvo, poderá ocorrer evaporação tecidual. Estudos no modo de contato e não contato, comparando a profundidade da coagulação térmica induzida e a profundidade das incisões, indicam um desempenho semelhante ao Nd:YAG (Wymann *et al.*, 1992).. No modo de contato e não contato, a profundidade da coagulação térmica é determinada pelas propriedades óticas e térmicas do tecido. Cuidados devem ser tomados com a carbonização, mesmo que suave, pois esta aumenta dramaticamente a absorção do feixe, podendo aumentar a profundidade de penetração, acelerando a carbonização tecidual e a vaporização. Outro fator a ser considerado é a quantidade de tecido vascularizado e a presença de sangue na área a ser irradiada. A absorção da hemoglobina no comprimento de onda na faixa de 810 – 830nm pode prevenir a penetração do feixe no tecido. Em todas as aplicações de não contato, a

profundidade de penetração do feixe laser pode atingir diversos milímetros. O uso na forma de contato resulta em uma penetração limitada de 0,5mm, devendo ser usado no modo contínuo (Wymann et al., 1992).

Esse equipamento apresenta como vantagens dimensões pequenas; sendo portátil, pode ser transportado em uma maleta com um gasto mínimo de tempo. É o laser cirúrgico com menor custo disponível no mercado atualmente. Pode ser usado na desinfecção de canais radiculares, procedimentos de curetagens, clareamentos dentais e pequenas cirurgias orais (Klim et al., 2000).

A maior parte dos lasers de diodo em alta intensidade têm como meio de entrega as fibras óticas e o modo de emissão contínuo ou pulsado. O uso da fibra ótica exige alguns cuidados, devendo ser clivada e preparada antes do uso inicial e, muitas vezes durante o procedimento, assegurando uma operação eficiente e uma boa qualidade do feixe laser. Em alguns casos, a fibra poderá ser condicionada antes do uso cirúrgico intra-oral. Nesse processo denominado de iniciação, condicionamento ou preparação, realiza-se a deposição de uma fina camada de pigmento escuro na extremidade da fibra, que produzirá um efeito de "ponta quente". Para esse fim pode-se utilizar corante preto solúvel em água, bloco de papel de cor escura, papel de articulação ou qualquer filme de articulação. A fibra deve ser gentilmente esfregada na superfície pigmentada enquanto o laser emite radiação. Para alguns modelos do laser de diodo, pontas de vidro estão disponíveis e podem ser colocadas no fim da fibra para certas aplicações (Klim et al., 2000).

A profundidade de transmissão dos comprimentos de onda de emissão dos lasers de diodo em água, especialmente aqueles próximos a 800nm, é algumas ordens de grandeza maior do que a do Nd:YAG (1064nm).

Os lasers de diodo emitindo nesta região do espectro são relativamente pouco absorvidos pelas estruturas dentais, pela água e hidroxiapatita. Por esta razão a cirurgia de tecidos moles pode ser realizada com segurança em proximidades com o esmalte. Cuidados precisam ser tomados quando usado em modo de emissão contínuo, devido ao rápido aumento térmico do tecido alvo (Klim et al., 2000), (FIG. 2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKTENER, B.O.; BILKAY, U. Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. *Journal of Endodontics*, Chicago, v. 19, n.5, p. 228 –231, may, 1993.
2. ANTONIO, M.P.S. *Estudo in vitro do efeito antibacteriano causado pela irradiação do laser de Er:YAG aplicado intracanal*. 2001. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
3. BACHMANN, L. *Sistema de entrega de feixe para laser de Ho:YLF e aplicações em endodontia*. 2000a. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
4. BACHMANN, L.; STREFEZZA, C.; ZECELL, D.M.; EDUARDO, C.P. An alternative procedure for laser irradiation in endodontical therapy [abstract] *7th International Congress on Lasers in Dentistry*. Brussels, 2000b.
5. BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER, W.A. Bacterial in the apical 5mm of infected root canals. *Journal of Endodontics*, v. 17, n. 6, aug., 1991.
6. BEHNEN, M.J.; WEST, L.A.; LIEWEHR, F.R.; BUXTON, T.B.; MCPHERSON, J.C. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *Journal of Endodontics*, v. 27, n. 12, p.765 –767, dec., 2001.
7. BERUTTI E.; MARINI R.; ANGERETTI A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *Journal of Endodontics*, v. 23, n. 12, p. 725 – 7, dec., 1997.
8. BRANDÃO, R.V. *Estudo in vitro da alteração da temperatura durante a aplicação do Er:YAG laser intracanal*. 2001. Dissertação (Mestrado em laser em odontologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
9. BUCK, R.A.; ELEAZER, P.D.; STAAT, R.H.; SCHEETZ, J.P. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *Journal of Endodontics*, v. 27, n. 3, p. 206 –08, mar., 2001.

10. BYSTRÖM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canal. *Endod. Dent. Traumat.*, Copenhagen, v. 1, n. 5, p. 170 – 75, oct., 1985.
11. CARRUTH, J. A. S. *et al. Medical lasers*. England: Adam Hilger, p. 269, 1986.
12. CECCHINI, S. *Desinfecção da dentina radicular pela irradiação dos lasers de Nd:YAG, Ho:YAG e Er:YAG: um modelo in vitro*. 2001. Tese (Doutorado em endodontia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
13. CHANG, J.; WILDER-SMITH, P. Laser-induced thermal events in empty and pulp-filled dental pulp chambers. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 22, p. 46 –50, 1998.
14. CHAVES, M.A. *Laser e diagnóstico de cáries: estado da arte e avaliação in vitro das diferenças de fluorescência entre esmalte sadio, desmineralizado e cariado*. 2001. Dissertação(Mestrado em laser em odontologia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
15. COHEN, S.; BURNS, R.C. *Pathways of the pulp*. Missouri: Mosby, 1994, p. 377-433.
16. COHEN, B. I.; DEUTSCH, A. S.; MUSIKANT, B. L. Effect of Power settings on temperature change at the root surface when using a Holmium YAG laser in enlarging the root canal. *Journal of Endodontics*, v. 22, n. 11, p. 596 – 99, nov., 1996.
17. DAHLÉN, G.; FABRÍCIUS, L.; HEYDEN, F.; HOLM, S.E.; MÖLLER, A.J.R. Apical perodontitis induced by selected bacterial strains in root canals of immunized and nonimmunized monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*, v. 90, n. 1 – 6, p. 207 –211, 1982.
18. DAHLÉN, G.; SAMUELSSON, W.; MOLANDER, A.; REIT, C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiology an Immunology*, n. 15, p. 309 – 12, 2000.
19. EDUARDO, C.P.; GOUW-SOARES, S. The use of lasers for endodontic applications in dentistry. *Medical laser application*. v. 16, p. 231 – 43, 2001a.
20. EDUARDO, C.P.; GOUW-SOARES, S. The use of lasers in endodontics. *Journal of Oral Laser Applications*, v. 1, p. 221 – 226, 2001b.
21. EDUARDO, C.P.; GOUW-SOARES, S.; HAYPEK, P. Utilização clínica dos lasers. *CIOSP*, 2002. São Paulo.

22. ERIKSSON, A. R.; ALBREKTSSON, T. Temperature threshold levels for heat induced bone tissue injury: a vital microscopic study in the rabbit. *J. Prosthet. Dent.*, v. 50, p. 101 –07, 1983.
23. ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; BAMMANN, L.L.; PECORA, J.D. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *Journal of Endodontics*, v. 27, n. 12, p. 720 – 23, dec., 2001a.
24. ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; BAMMANN, L.L.; PIMENTA, F.C.; PECORA, J.D. Control of microorganisms *in vitro* by calcium hydroxide pastes. *International Endodontic Journal*, v. 5, n. 34, p. 341 – 345, 2001b.
25. FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; ÖHMAN, A. E.; MÖLLER, A. J. R. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scandinavian Journal of Dental Research*, Copenhagen, v. 90, n. 2, p. 134 -144, apr. 1982a.
26. FABRICIUS, L., DAHLÉN, G, STING, E., HOLM, E., MÖLLER, A. J. R. Influence of combination of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*. Copenhagen, v. 90, p. 200 – 06, 1982 b.
27. FRENTZEN, M.; KOORT, H.J. Histological investigation of mid infrared laser ablation of dental hard tissues. In: ISLD, *Proceedings...1992*, p. 243 – 244.
28. FISH, E.W. Bone infection. *Journal of American Dental Association*. v. 26, p. 691 –712, may, 1939.
29. FOLWACZNY, M., MEHL, A., JORDAN, C., HICKEL, R. Antibacterial effects of pulsed Nd:YAG laser radiation at different energy settings in root canal. *Journal of Endodontic*, v. 28, n. 1,p. 24-28, jan, 2002
30. GENOVESE, W. J. *Laser de baixa intensidade. Aplicações terapêuticas em odontologia*, p. 33 – 50. São Paulo: Lovise, 2000.
31. GOODIS, H.E.; WHITE, J.M; MOSKOWITZ, E.; MARSHALL, S.J. Root canal preparation in endodontics: conventional vs laser methods. *Proceedings of SPIE*, v. 1643, p. 412-422, 1992.
32. GOUW-SOARES, S. *Avaliação da redução bacteriana em dentina radicular contaminada irradiada com laser de Ho:YAG. estudo in vitro*. 1998. Dissertação (Mestrado em Dentística) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

33. GOUW-SOARES, S.C. **Avaliação da permeabilidade da superfície dentinária radicular após apicectomia e tratamento com os lasers de Er:YAG ou CO₂ 9,6µm. Estudo in vitro.** 2001a. Tese (Doutorado em Dentística) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
34. GOUW-SOARES, S.; TANJI, E.; HAYPECK, P.; CARDOSO, W.; EDUARDO, C.P. The use of Er:YAG, Nd:YAG e GaAlAs lasers in periapical surgery. Three years clinical cases. **Journal Clinical Laser Medicine. Surgery.** v. 19, n.4, aug., p. 193 – 8. 2001b.
35. GOUW-SOARES, S.; PELINO, J. E. P.; HAYPECK, P.; BACHMANN, L.; EDUARDO, C. P. Temperature rise in cavities prepared *in vitro* by Er:YAG laser. **Science**, v. 1, n. 2, p. 1 – 5, 2001c.
36. GOYA, C. **Avaliação in vitro dos efeitos da parede dentinária do canal radicular irradiada pelos lasers de Er:YAG e Nd:YAG, sob observação do estereoscópio, da micrografia eletrônica e da câmara termográfica.** 2001. Dissertação (Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
37. GUTIERREZ, J. H., JOFRE, A., VILLENA, F., Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. **Oral Surg. Oral Med. Pathol.** v. 69, p. 491 - 501.
38. GUTKNECHT, N.; KRAISER, F.; HASSAN, A.; LAMPERT, F. Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd:YAG lasers. **Journal Clinical Laser Medicine Surgery.**, v. 14, n. 1, p. 7 –11, feb., 1996a.
39. GUTKNECHT, N.; MORITZ, A.; CONRADS, G.; SIEVERT, T; LAMPERT, F. Bacterial effect of the Nd:YAG laser in vitro root canal. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 14, n. 2, p. 77 – 80, 1996b.
40. GUTKNECHT, N.; MORITZ, A.; BURGHARDT, S. F.; LAMPERT, F. The efficiency of root canal disinfection using a Holmium: Yttrium-Aluminum-Garnet laser *in vitro*. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 15, n. 2, p. 75 – 8, 1997.
41. GUTKNECHT, N.; CONRAD, G.; APEL, C.; SCHUBERT, C.; FRIEDRICH, L. The effect of diode laser radiation in root canal wall dentine. A microbiological study. **Proceedings of SPIE**, v. 3910, p. 124 – 27, 2000a.
42. GUTKNECHT, N.; GOOGSWAARDT, D.V.; CONRADS, G.; APEL, C.; SCHUBERT, S.; LAMPERT, F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 57 – 60, 2000b.

43. HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research.*, v 66, n8, p. 1375 - 79, aug., 1987.
44. HAN, G.H.; PARK, S.H.; YOON, T.C., Antimicrobial Activity of Ca(OH)₂ containing pastes with *Enterococcus faecalis in vitro*. *Journal of Endodontics*. v. 27, n. 5, mar., 2001.
45. HUNTER, W. The role of sepsis and antisepsis in medicine. In.: LEONARDO, M.L., LEAL, J.M. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*, 2ª edição, São Paulo: Panamericana, 1991, p. 1-18.
46. KAWAHARA, C.M.; REGAN, P.F., TENCA, J.L., PELLEU, G.B. Antimicrobial efficacy of reduced concentrations of paramonochlorophenol in extracted teeth. *Journal of Endodontics*, Chicago, v. 1, n. 2, p. 49 – 52, feb., 1975.
47. KLIM, J.D.; FOX, D.B.; COLUZZI, D.J; NECKEL, C.P.; SWICK, M.D.; The diode laser in dentistry. *Wavelength*. v. 8, n.4, p. 13 – 16, fall, 2000.
48. KOUCHI, Y.; NINOMIYA, J.; YASUDA, H.; FUKUI, K.; MORIYAMA, T.; OKAMOTO, H. Location of *Streptococcus mutans* in dentinal tubules of open infected root canals. *Journal of Dental Research*, v. 59, p. 2038 – 2045, dec., 1980.
49. LAGE MARQUES, J.L. *Avaliação dos efeitos da irradiação laser, utilizando Nd:YAG, CO₂ e Argônio no selamento dentinário e marginal de obturações retrógradas*. 1997. Dissertação (Habilitação à Livre-Docência na Disciplina de Endodontia do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia). Universidade de São Paulo, São Paulo.
50. LAGE MARQUES, J.L.; ANTONIAZZI, J.H. Quando a medicação intracanal é fundamental para o sucesso da terapia endodôntica. In: FELLER, C., GORAB, R. *Atualização na clínica odontológica*. São Paulo: Artes Médicas, 2000, v. 1, p. 59 –89.
51. LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. 2ª edição, São Paulo: Panamericana, 1991, p. 1 –18.
52. LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.B. Medicação tópica entre sessões “curativo de demora” em biopulpectomia e necropulpectomias I e II. In: LEONARDO, M.R, LEAL, J.M. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. 3ª edição. São Paulo: Panamericana, 1998, p. 491 – 545.

53. LOVE, R.M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal*, n. 34, p. 399 – 405, 2001.
54. MAILLET, H. *O laser: princípios e técnicas de aplicação*. São Paulo: Manole, p. 153 – 190, 1987.
55. MALDONADO, E.; RIBEIRO, M.S.; ZECELL, D.M. *Mecanismos de interação laser tecido*. 2001 (apostila do Mestrado Profissionalizante “Lasers em Odontologia”) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2001.
56. MARTINS, J.B.; BERNADINELLI, N.; BERBET, A.; BRAMANTE, C.M.; MARQUES, A.L. Efeitos da biomecânica e de curativos de demora com hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol a 1% ou a associação de ambos na redução da flora microbiana de canais radiculares infectados. *Ars Curandi Odontol.*, São Paulo, v. 6, n. 7, p. 44 – 57, out., 1979.
57. MANNI, J. G. The diode laser in dentistry. *Wavelengths*. v. 8, n.4, p. 13, fall, 2000.
58. MATSUMOTO, K. Laser treatment in endodontics. *3rd International Congress on Lasers in Dentistry* [abstract]. Salt Lake City, aug., 1992, v. 44, p. 889 – 906, oct., 1992.
59. MERYON, S. D.; BROOK, A. M. Penetration of dentine by three oral bacteria in vitro and their associated cytotoxicity. *International Endodontic Journal*, v. 23, p. 196 – 202, 1990.
60. MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENKE, B.; TOTA, J.G., Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.* v. 122, p. 532 – 35, 1971.
61. MISERENDINO, L. J., PICK, R. M. *Lasers in dentistry*. Quintessence, p. 341, Chicago, 1995.
62. MÖLLER, A.J.R.; FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; OHMAN, A.E.; HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*, v. 19, n. 6, p. 475 – 84, dec., 1981.
63. MORITZ, A.; GUTKNECHT, N.; GOHARKHAY, K.; SCHOOP, U.; WERNISCH, J.; SPERR, W. In vitro irradiation of infected root canals with diode laser. Results of microbiologic, infrared spectrometric, and stains penetration examinations. *Quintessence International*, v. 28, n. 3, p. 205 – 209, 1997a.

64. MORITZ, A.; GUTKNECHTM N.; SCHOOP, U.; GOHARKHAY, K.; DOERTBUDAK, O.; SPERR, W. Irradiation of Infected root canals with diode laser *in vivo*: results of microbiological examinations. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 21, p. 221-26, 1997b.
65. MUSACCHIO, C. V. *Reparação à laser diodo em baixa intensidade após procedimento cirúrgico de enxerto gengival livre*. Rio de Janeiro: ABO, Rio de Janeiro, 2000.
66. MURRAY, P. K.; ROSENTHAL, K., S.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M. A. *Streptococcus*. In: MURRAY, P. K.; ROSENTHAL, K., S.; KOBAYASHI, G., PFALLER, M. A. *Medical Microbiology*. St. Louis, Missouri: Mosby, 1998, p. 189 – 205.
67. MURRAY, P. K.; ROSENTHAL, K., S.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M. A. Enterococcus and other Gram-positive cocci. In: MURRAY, P. K.; ROSENTHAL, K., S.; KOBAYASHI, G.; PFALLER, M. A. *Medical Microbiology*. St. Louis, Missouri: Mosby, 1998, p. 206 – 208.
68. NODA, M.; KOMATSU, H.; INOUE, S.; SANO, H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 4, p. 221 –24, apr., 2000.
69. NUNEZ, S.P. *Normas e regulamentos de segurança no uso de lasers* (no prelo). São Paulo, 2001.
70. OSTBY, B.N. Seis años de experiencia clinica y experimental com el ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) como coadyuvante en la terapia de los conductos radiculares. *Rev. Asoc. Odontol. Argent.*, Buenos Aires, v. 50, n. 1, 1962.
71. PECIULIENE, V.; BALCIUNIENE, I.; ERICKSEN, H.M.; HAAPASALO, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canal in a lithuanian population. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 16, p. 593 – 95, oct., 2000.
72. PECIULIENE, V.; REYNAYD, A.H.; BALCIUNIENE, I.; HAAPASALO, M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, n. 34, p. 429 – 34. sep., 2001.
73. PEREZ F.; CALAS P.; de FALGUEROLLES A.; MAURETTE A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. *Journal of Endodontics*, v. 19, n. 6, p.297-301, jun., 1993a.
74. PEREZ, F.; ROCHD, T.; LODTER; J.P., CALAS, P.; MICHEL, G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Sur. Oral Med. Pathol.*, v. 103, p. 76 - 97 , 1993b.

75. PEREZ, F.; FRANCHI, M.; PÉLI, J.F. Effect of calcium hydroxide form and placement on root dentine pH. *International Endodontic Journal*, v. 6, m. 34, p. 417 – 23, 2001.
76. RENSON, C. E. *Lasers in dentistry*. v. 16, n. 9, p. 371-72, nov. 1989.
77. SHOVELTON, D. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *British Dental Journal*, v. 117, n. 3, aug. p. 101 – 07, 1964.
78. SILVA, L.A.B.; NELSON-FILHO, P.; LEONARDO, M.R.; ROSSI, M.A.; PANSANI, C.A. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *Journal of endodontics*. v. 28, n. 2, feb., p. 94 – 98, 2002.
79. SIQUEIRA Jr., J. F. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics*, v. 22, n. 12, dec., p. 674 – 76, 1996.
80. SIQUEIRA Jr., J.F. Substâncias e materiais usados no controle da infecção endodôntica. In: Siqueira Jr., J. F. *Tratamento das infecções endodônticas*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1997, p. 101 –122.
81. SIQUEIRA Jr., J. F. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International Endodontic Journal*, London, v. 34, n. 1, p. 1 – 9, Jan. 2001.
82. SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; SPANGBERG, L; SUNDQVIST, G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International Endodontic Journal*, v. 24, n. 3, p. 119 – 125, may, 1991.
83. STABHOLTZ, A. Lasers in endodontics. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 6, 1998. Hawaii. *Proceedings of SPIE*, Utah: International Society for Lasers in Dentistry, 1998, p. 7 –11.
84. STERN, R. H.; SOGNAES, R. F. Laser beam on dental hard tissues. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR DENTAL RESEARCH. General Session and Exhibition, 42. Los Angeles, mar. 19 –22, 1964. Abstract of papers. Los Angeles. *Journal of Dental Research*, v. 43, n. 5, p. 873, [Resumo n. 307], 1964.
85. SUKAWAT, C.; SRISUWAN, T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics*, v. 28, n. 2, feb., p. 102 – 104, 2002.

86. SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections, *Journal of endodontics*, v. 7 n. 5, p. 257 – 62, 1992a.
87. SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. *Journal of Endodontics*. v. 1,8, n. 9, p. 257 – 62, 1992b.
88. SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJÖGREN, U. Microbiologic analyses of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg. Oral Pathol.*, St. Louis, v. 85, n. 1, p. 86 – 93, jan. 1998a.
89. SUNDQVIST, G., FIGDOR, D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: ORSTAVIK, D., PITT FORD, T.R. *Essencial Endodontology*. London: Blackwell Science, 1998b, p. 242 – 277.
90. SYDNEY, G.B.; ESTRELA, C. Influence of root canal preparation on anaerobic bacteria in teeth with asymptomatic apical periodontitis. *Braz. Endod. J.* v. 1, p. 7 –10, 1996 a.
91. SYDNEY, G. B. *Identificação da microflora endodôntica após o preparo do canal radicular de dentes portadores de periodontite apical assintomática e o emprego de medicação de hidróxido de cálcio em diferentes tempos*. 1996b. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
92. TANJI, E.Y.; GOUW-SOARES, S.C.; EDUARDO, C.P. Aplicação do laser de Nd:YAG como coadjuvante no tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical. *RPG.*, v. 4, n.4, out/nov/dez, 1997.
93. TÚNER, J., HODE, L. *Laser Therapy in dentistry and medicine*, Sweeden: Prima Books AB, 1996.
94. WEICHMAN, J. A.; JOHNSON, F. M. Laser use in endodontics. A preliminary investigation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 31, n. 3, p. 416 - 20, mar, St Louis, 1971.
95. WEICHMAN, J. A.; JOHNSON, F. M.; NITTA, L. K. Laser use in endodontics. Part II. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 34, n.5, p. 828 - 30, nov, St Louis, 1972.
96. WYMAN, A.; DUFTY, S.; SWEETLAND, H. L., SHARP, F., ROGERS, K. Preliminary evaluation of a new high power diode laser. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 12, p. 506 –09, 1992.

97. ZEZZEL, D.M.; CECCHINI, S.C.M.; EDUARDO, C.P.; MATSUMOTO, K.; ROSSI, W.; NOGUEIRA, G.E.C.; BERRETA, J.R., VIEIRA, N.D.; MORATO, S.P. Experimental studies of the applications of the holmium laser in dentistry. *J. Clin. Lasers Med. Surg.* v. 13, n. 4, p. 283 – 89, 1995.
98. ZEZZEL, D.M. Potencial of Ho:YLF and fluoride in prevention of dental caries. *Proceedings of SPIE of 6TH International Congress on lasers in dentistry.* p. 63-63, 1998.
99. ZEZZEL, D. M. Workshop: *Utilização clínica do laser.* 1999. Apostila (Curso FUNDECTO)- FOU SP, São Paulo.
100. ZEZZEL, D.M., MALDONADO, E.P.; RIBEIRO, M.S. *Interação da luz laser com tecidos biológicos: Aplicações.* 2001. (apostila do Mestrado Profissionalizante “Lasers em Odontologia”) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.



M22604



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Diretoria de Ensino & Informação Científica e Tecnológica
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3816 - 9148
SÃO PAULO - São Paulo - Brasil
[http: //www.ipen.br](http://www.ipen.br)

O Ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, e associada à Universidade de São Paulo.