

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Caroline Tumelero Dias

**Influência da terapia fotodinâmica no processo
de descontaminação de canais radiculares
preparados com baixas concentrações de
soluções de hipoclorito e sistema recíprocante –
estudo *in vitro***

Passo Fundo

2018

Caroline Tumelero Dias

**Influência da terapia fotodinâmica no processo
de descontaminação de canais radiculares
preparados com baixas concentrações de
soluções de hipoclorito e sistema recíprocante –
estudo *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Matheus Albino Souza.

Passo Fundo

2018

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A bênção de viver é uma graça de *Deus* e por isso Lhe agradeço eternamente.

Aos meus pais, *Sonia e Afrânio* e ao meu irmão, *Fabiano*, pelo incansável apoio, dedicação, amor e paciência a mim doados a cada dia. Sem vocês comigo nada faria sentido. Faço tudo isso por vocês e porque amo vocês.

Ao meu namorado e companheiro há 10 anos, *Lucas*, por aguentar o meu mau humor e meu cansaço durante esses 2 anos. Sempre me fazendo rir. Você sempre pensando que tudo vai dar certo e eu preocupada que alguma coisa podia dar errada. Você em Blumenau, eu em São José do Herval. Você em Palmas, eu em Passo Fundo. Porém, agora, temos nossa Pandora que uniu ainda mais nossos caminhos. Obrigada por tudo. Amo você.

À minha amada *família e amigos* que nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar onde estou hoje. Sei que fariam tudo novamente e me faltam palavras para agradecer todo esforço e toda a confiança em mim depositados.

Ao meu professor e orientador, *Prof. Dr. Matheus Albino Souza*, pela paciência, profissionalismo, sabedoria, organização transmitidos a mim e ao nosso grupo de pesquisa. Obrigada pela disponibilidade e pela honra em ser tua orientada.

À minha amiga e futura colega, *Julia Zandoná*, que colocou toda a sua dedicação e seu perfeccionismo para que esse trabalho se realizasse. Sem ela, esse sonho não teria se concretizado. És merecedora de muito sucesso e sou eternamente grata pela tua ajuda em todos os momentos desse trabalho. O mérito desse trabalho também é teu. Como sempre falei: “esse trabalho é nosso.” Obrigada, obrigada e obrigada. Aliás, mil vezes obrigada.

Ao colega e amigo, *Huriel Palhano*, pelo tempo dedicado ao nosso trabalho, pela paciência em nos explicar quantas vezes fossem necessárias para realizarmos o trabalho da melhor maneira possível. Sua sabedoria e sua disponibilidade foram essenciais do início ao fim.

Às *Professoras Charise Bertuol e Luciana Rossato Grando*, e ao *Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo*, pela recepção e pela incansável ajuda desde o início. Obrigada por nos cederem as instalações impecáveis do Curso de Farmácia e pelo apoio incessante vindo de vocês. Sem vocês o nosso trabalho não teria se concretizado.

Aos amigos e futuros colegas, *Igor e Victor Hugo* pela ajuda na fase decisiva em nossa pesquisa. Obrigada pela paciência e pela convivência. Foi um prazer conhecê-los.

Aos meus amigos *Débora, Érlon, Giordana, Isadora, Matheus, Renato e Tábata*, que prazer conhecê-los e aprender com vocês. Não chamo de colega, porque fomos muito mais que isso. Ir à aula era divertido, vocês me fizeram rir em meio a tanta turbulência e correria que estava minha vida. A “semana do Mestrado” era a semana que apesar de tudo, eu descansava. Vocês me deixavam tranquila e como eu aprendi com vocês! Que sigamos sempre assim, como amigos, rindo, tirando fotos uns dos outros e que possamos tomar muito chimarrão juntos e que o Renato também aceite. Obrigada por tudo, sucesso meus amigos!

À *secretaria do Mestrado*, pela competência e por toda ajuda e auxílio indispensável desde o início.

À todos os *professores* da Faculdade de Odontologia da UPF que me receberam tão bem em minha volta à essa Instituição que eu admiro tanto. Aprendi tanto com vocês, professores do Mestrado, professores que me receberam de uma maneira tão linda nos Estágios Supervisionados. Obrigada pela oportunidade de ser aluna de profissionais tão talentosos.

Aos *alunos*, que me receberam e acolheram de uma maneira impecável. Foi um prazer conhecê-los e espero ter deixado um pouquinho de mim em cada um de vocês, pois, estou levando um pouco de cada um comigo.

À PUC-RS, ao Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da PUCRS, ao Professor José Antônio Poli de Figueiredo (PUC-RS), aos técnicos do laboratório pelo excelente atendimento e pelo impecável trabalho realizado por todos. Nossa gratidão à essa Instituição que nos recebeu tão bem. Obrigada.

À CAPES, a qual disponibilizou bolsa para a concretização deste estudo.

Ao meu Professor e colega, *Dr. Bruno Carlini*, pela oportunidade e honra em poder trabalhar com ele e por entender que muitas vezes eu precisava estar na Faculdade e não estava disponível no consultório. Você é um exemplo para mim.

À Faculdade IDEAU, instituição a qual, com muito orgulho faço parte, como docente. Obrigada pela oportunidade e pela confiança que depositaram em mim desde o início. Agradeço ainda mais, por me liberarem sempre que necessário para as aulas do Mestrado. Aos *meus colegas e amigos* pela convivência e pela amizade que criamos tornando nosso trabalho muito mais leve e prazeroso.

A todos que contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível, tornando este meu sonho realidade. Que Deus dê em dobro a todos vocês tudo o que fizeram por mim.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
SUMÁRIO	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1.INTRODUÇÃO	16
2.REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Enterococcus faecalis</i>	19
2.2 Hipoclorito de sódio	26
2.3 Hipoclorito de cálcio	35
2.4 Terapia Fotodinâmica	43
2.5 Sistemas Reciprocantes	53
3.PROPOSIÇÃO	65
4.MATERIAIS E MÉTODOS	67
Obtenção e preparo das amostras	67
Controle de esterilização	71
Preparo do inóculo	72
Contaminação dos canais radiculares	72
Avaliação dos protocolos de descontaminação	74
Realização das coletas e análise microbiológica	78
Análise estatística	82

5.RESULTADOS.....	83
6. DISCUSSÃO	86
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIAS.....	93
9. ANEXOS.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos grupos de acordo com o protocolo de descontaminação testado.....	77
Tabela 2: Média (desvio padrão) do percentual de redução de <i>Enterococcus faecalis</i> (%).....	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Padronização das raízes. A – remanescente radicular, B – Seccionamento das coroas com disco diamantado dupla face, C – Remanescente radicular apresentando um comprimento de 15mm.....68
- Figura 2 – Preparo das raízes. A – odontometria, B- preparo cervical realizado com broca Largo nº 3, C- ampliação apical com limas tipo-K, iniciando com a lima nº 15, D- finalizando com a lima nº 45, E- lavagem final com EDTA 17%.....69
- Figura 3 – Preparo das amostras. A- vedamento do foramen apical com resina fotopolimerizável, B – impermeabilização externa das raízes com adesivo a base de cianoacrilato, C – fixação com silicone de condensação em microtubo plástico.....70
- Figura 4 – Disposição das amostras em caixa de polipropileno.....70
- Figura 5 – Controle da esterilização. A- dente selecionado aleatoriamente e preenchido com solução salina, B- cone de papel estéril #45 colocado em contato com as paredes do canal, C- cone de papel foi transportado para microtubos plásticos contendo solução salina, D- semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA através da técnica da gota.....71
- Figura 6 – Contaminação dos canais radiculares e controle de contaminação. A – contaminação dos canais radiculares, B - câmara de fluxo laminar, C – cone de papel em contato com as paredes do canal, D – cone de papel em 1ml de solução salina estéril, D – técnica de gotas, E – análise da morfologia.....73
- Figura 7 –A –sistema recíprocante Reciproc e lima R40, B – fibra óptica intracanal acoplada a um aparelho de laser de baixa intensidade e azul de Metileno 0,01%.....77
- Figura 8 - Protocolos de descontaminação. A – canais preenchidos com solução de soro fisiológico, B - instrumentação com a lima R40 do sistema recíprocante e irrigação com substância química auxiliar de cada grupo, C - canal preenchido com azul de metileno 0,01% por 5 min., D –PDT, E - irrigação final com 5 ml de água destilada e uma lavagem final com 3 ml de 17% de EDTA.....78
- Figura 9 – Realização das coletas e análise microbiológica. A – Ponta de papel absorvente no interior do canal radicular, B- Homogeneização, C – técnica de gotas, D - E – placas com PCA após incubação.....79
- Figura 10 –MEV. A- B - raízes fixadas glutaraldeído 2% e lavadas em uma proporção de 0,2 M de tampão de fosfato de 1:1 e água destilada, C - D - amostras colocadas em bases metálicas (stubs) e revestidas com ouro-paládio, E – F - microscópio eletrônico de varredura (Philips XL 30, Eindhoven, Holanda), G - imagens em 5000x nas paredes do canal radicular.....81
- Figura 11 – MEV- eficácia dos procedimentos de descontaminação final, iniciando pelo G1 (A) até o G10 (J)..85

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius
% - percentagem
- diâmetro
μCT - microtomografia
μL – microlitros
APDT - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
AT – azul de toluidina
BHI – *brain heart infusion*
BSE - recurso de retroespalhamento
CaOH₂ - hidróxido de cálcio
Ca(OCl)₂ - hipoclorito de cálcio
CE- composição elementar
CFU – unidades formadoras de colônias
CHX - digluconato de clorexidina
CMD - desbridamento químico-mecânico
CLSM - Microscópio de escaneamento de laser confocal
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDTA- ácido etileno diamino tetracético
E.faecalis – *Enterococcus faecalis*
Er: YAG – *laser* Erbium
h – horas
HEDP - ácido etidrônico
H₂O – água
J – joules
Log- logarítmo
LED - *laser* de diodo de baixa potência
M- solução molar, relativo a mol
MB – azul de metileno
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
mg – miligramas
mL – mililitro
min- minutos
mW – megawatt
NaCl – cloreto de sódio
NaOCl – hipoclorito de sódio
Nd: YAG – *laser* Neodímio
PAD - desinfecção modificada fotoativada
PBM - preparo biomecânico
pH – potencial de hidrogênio, representação da escala uma solução neutra é igual a 7
PCA - *Plate Count Agar*
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PUC – RS - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Qmix – bisbiguanida, ácido poliaminocarboxílico, soro fisiológico e agente surfactante
s- segundos
TBS - caldo tríptico de soja
SAF – Self – Adjusting – File, limas auto-ajustáveis
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande Sul

RESUMO

Introdução: O objetivo principal da terapia endodôntica é realizar a modelagem e limpeza adequadas usando instrumentos e protocolos antibacterianos. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antimicrobiana de soluções de hipoclorito e instrumentação alternativa associada à terapia fotodinâmica (PDT). **Métodos:** Cento e vinte canais radiculares foram ampliados até a lima tipo K #45 e inoculados com *E. faecalis* por 14 dias. Cem amostras foram divididas aleatoriamente em dez grupos (n=10) e submetidos aos seguintes protocolos: G1-água destilada + Reciproc R40 (controle), G2-1% de hipoclorito de sódio (NaOCl) + Reciproc R40, G3-2,5% NaOCl + Reciproc R40; G4-1% de hipoclorito de cálcio (Ca [OCl]₂) + Reciproc R40, G5-2,5% Ca (OCl)₂ + Reciproc R40; G6-PDT; G7-1% NaOCl + Reciproc R40 + PDT, G8-2,5% NaOCl + Reciproc R40 + PDT; G9-1% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT, G10-2,5% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT. A porcentagem de redução bacteriana foi verificada contando as unidades formadoras de colônias (UFC). As restantes 20 amostras foram submetidas aos mesmos protocolos de descontaminação (n=2) e submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para ilustrar a eficácia dos tratamentos propostos. Os dados foram submetidos à ANOVA unidirecional seguido do teste post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** A maior habilidade para promover a redução bacteriana foi observada nos grupos 7 (1% NaOCl + R40 + PDT), 8 (2,5% NaOCl + R40 + PDT), 9 (1% Ca [OCl]₂ + R40 + PDT) e 10 (2,5% Ca [OCl]₂ + R40 + PDT), sem diferença significativa entre eles (p <0,05). **Conclusões:** A associação de PDT com soluções de hipoclorito e instrumentação recíproca proporciona efetiva eliminação de *E. faecalis*.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio, terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Introduction: The main goal of endodontic therapy is to perform adequate shaping and cleaning by using instruments and antibacterial protocols. Thus, the aim of this study is to evaluate the antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy (PDT). **Methods:** One hundred and twenty root canals were enlarged up to #45 K-file and inoculated with *E. faecalis* for 14 days. One hundred samples were randomly divided into ten groups (n=10) and subjected to the following protocols: G1-distilled water + Reciproc R40 (control), G2-1% sodium hypochlorite (NaOCl) + Reciproc R40, G3-2.5% NaOCl + Reciproc R40; G4-1% calcium hypochlorite (Ca[OCl]₂) + Reciproc R40, G5-2.5% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40; G6-PDT; G7-1% NaOCl + Reciproc R40 + PDT, G8-2.5% NaOCl + Reciproc R40 + PDT; G9-1% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT, G10-2.5% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT. The percentage bacterial reduction was checked by counting the colony-forming units (CFUs). The remaining 20 samples were subjected to the same decontamination protocols (n = 2) and submitted to scanning electronic microscopy (SEM) to illustrate the effectiveness of the proposed treatments. Data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test ($\alpha = 0.05$). **Results:** The greatest ability to promote bacterial reduction was observed in groups 7 (1% NaOCl + R40 + PDT), 8 (2.5% NaOCl + R40 + PDT), 9 (1% Ca[OCl]₂ + R40 + PDT), and 10 (2.5% Ca[OCl]₂ + R40 + PDT), with no significant difference between them ($p < 0.05$). **Conclusions:** The association of PDT with hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation provides effective elimination of *E. faecalis*.

1. INTRODUÇÃO

A presença de microorganismos é a causa mais prevalente de patologias de polpa e periapical (Kakehashi *et al.*, 1965). Assim, o uso de soluções irrigantes e instrumentação é necessário para promover uma limpeza adequada, criando condições para permitir uma terapia endodôntica bem-sucedida. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigante mais comumente utilizada em endodontia, apresentando atividade antimicrobiana de amplo espectro, entre outras propriedades (Bukhary *et al.*, 2017). Contudo, são necessárias uma concentração elevada e uma longa exposição ao NaOCl para a eliminação de bactérias persistentes. Com o advento dos sistemas reciprocantes, a instrumentação tornou-se mais rápida, reduzindo o tempo de contato das soluções de hipoclorito com as paredes do canal radicular, podendo interferir no processo de descontaminação, especialmente quando são utilizadas baixas concentrações de NaOCl no intuito de reduzir a sua citotoxicidade. (Retamozo *et al.*, 2010). Além disso, o NaOCl apresenta potencial citotóxico, induzindo altos níveis de resposta inflamatória, mesmo quando usado em baixa concentração (Blattes *et al.*, 2017). Em vista de suas limitações, novos recursos alternativos foram pesquisados em endodontia para auxiliar a descontaminação do sistema de canais radiculares.

O hipoclorito de cálcio (Ca [OCl]₂) é um pó branco alcalino que foi inicialmente utilizado para tratamento de água e esterilização industrial (Whittaker & Mohler, 1912). Hoje em dia, o Ca(OCl)₂ foi pesquisado em endodontia, mostrando atividade antimicrobiana contra *Enterococcus*

faecalis (*E.faecalis*) (de Almeida *et al.*, 2014) e biocompatibilidade (Blattes *et al.*, 2017). Por outro lado, o uso de um único arquivo na instrumentação alternativa demonstrou uma redução considerável no tempo necessário para executar a instrumentação (Yared, 2008). No entanto, é sabido que algumas áreas do canal principal não são tocadas por instrumentos endodônticos (Vaudt *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo, há menos tempo de contato entre a solução irrigante e as paredes do canal radicular ao usar esta técnica, o que pode comprometer algumas propriedades antimicrobianas dessas substâncias, mesmo com maior agilidade na instrumentação (Souza *et al.*, 2017).

Devido à anatomia complexa, alguns recursos são necessários para fornecer um complemento para o processo de descontaminação. A terapia fotodinâmica (PDT) é um suporte eficaz para a preparação quimiomecânica convencional. Esta modalidade terapêutica envolve uma fonte de luz gerada por um laser de baixa potência e um fotossensibilizador não tóxico, mostrando a capacidade de neutralizar patógenos endodônticos pela formação de espécies reativas de oxigênio (Souza *et al.*, 2017). Além disso, a PDT induz níveis insignificantes de citotoxicidade (Gomes-Filho *et al.*, 2016). No entanto, não há estudos na literatura referentes ao uso de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e instrumentação alternativa associada à PDT para avaliar sua eficácia na descontaminação de canais radicais infectados por *E.faecalis*.

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de soluções de hipoclorito e instrumentação alternativa associada à PDT em canais radicais infectados com *E.faecalis*. Testamos a hipótese de que a associação de PDT com soluções de hipoclorito e

instrumentação alternativa proporciona uma maior descontaminação de *E.faecalis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os microorganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais (Kakehashi *et al.*, 1965). Nesse sentido, faz-se necessário o uso de substâncias químicas e recursos auxiliares visando contribuir no processo de descontaminação do sistema de canais radiculares.

2.1 *Enterococcus faecalis*

E. faecalis foi o microrganismo mais freqüentemente em infecções endodônticas secundárias (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013) além de estar altamente associado com radiolucidez periapical e episódios de dor (Cogulu *et al.*, 2008). Chávez de Paz (2012) mostraram que o *E. faecalis* forma comunidades estáveis e reprodutíveis, mostrando um crescimento contínuo ao longo do tempo.

Fouad *et al.* (2005) buscaram identificar a presença de *E. faecalis* em casos de insucessos endodônticos utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento molecular, e determinar se a prevalência de *E. faecalis* é aumentada em pacientes diabéticos. Quarenta casos de retratamento foram selecionados e incubados em caldo de tioglicolato 37°C e extraído o DNA. O PCR foi utilizado para identificar filogeneticamente a espécie através do marcador genético 14 *Enterococcus spp.* Três casos foram eliminados porque os pacientes

estavam em uso de antibióticos ou o dente não apresentou radiolucidez perirradicular. Os 37 casos restantes, incluindo seis pacientes diabéticos tiveram oito amostras positivas para *E. faecalis*. Destes, 6 (19%) eram de não diabéticos e 2 (33%) de pacientes diabéticos. Filogeneticamente, todas as sequências de amostras positivas corresponderam a *E. faecalis*, sendo a única espécie de enterococos detectada com uma prevalência geral de 22%.

Gomes *et al.* (2006) pesquisaram a presença de *E. faecalis* em infecções endodônticas por meio de testes de reação em cadeia da polimerase (PCR) e cultura microbiana. As amostras microbiológicas foram obtidas a partir de 50 dentes com polpas necróticas não tratadas (infecção primária) e de 50 dentes com falha do tratamento endodôntico (infecção secundária). Foram utilizadas as técnicas de cultura, incluindo diluição em série, chapeamento incubação e identificação bioquímica. Para a análise por PCR foi utilizado um primer específico espécies do 16S DNAr. Cultura e PCR detectaram o *E. faecalis* em 23 dos 100 e 79 dos 100 dos dentes, respectivamente. A espécie alvo foi cultivada em 2 (4%) de 50 canais com polpa necrótica e em 21 (42%) de 50 canais tratados endodônticamente. Já o PCR identificou a espécie em 41 (82%) nas infecções primárias e 38 (76%) nas infecções secundárias.

Cogulu *et al.* (2008) avaliaram a presença de patógenos em amostras de canais radiculares de dentes decíduos e permanentes, utilizando o método de PCR e determinaram a associação desses microrganismos com os sintomas clínicos de infecções endodônticas. Cento e quarenta e cinco crianças de 5 a 13 anos de idade participaram do estudo. Foram identificados os seguintes patógenos nos dentes infectados: *Actinomyces israelii*, *Candida albicans*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*,

Porphyromonas endodontalis, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola*, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsythensis*, *Enterococcus faecium*, *Prevotella melaninogenica*. *T. denticola* e *E. faecalis* foram altamente associados com radiolucidez periapical, enquanto em dentes decíduos e permanentes sensíveis a percussão pode-se associar a presença de *P. gingivalis*.

Sassone *et al.* (2008) verificaram a microbiota de infecções endodônticas primárias em dentes com ou sem fistula. As amostras foram coletadas após instrumentação com uma lima #15 H-file e duas pontas de papel estéreis de 30 casos. A presença de 40 espécies bacterianas foi determinada pelo método de hibridação DNA-DNA. As espécies encontradas com maior prevalência foram: *Fusobacterium nucleatum sp. vincentii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella parvula*, *E. faecalis*, *Campylobacter gracilis* e *Neisseria mucosa*. As contagens bacterianas totais foram semelhantes entre os dentes com e sem uma fistula. *E. faecalis*, *Streptococcus anginosus*, *Capnocytophaga sputigena* e *Capnocytophaga gingivalis* tinham contagens significativamente mais elevadas na ausência de fistula. Níveis mais elevados de *P. gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum sp. nucleatum* foram observadas em casos com uma fistula. *Buccalis Leptotrichia* e *Porphyromonas endodontalis* foram associados a indivíduos com maior chance de fistula.

Chivatxaranukul *et al.* (2008) analisaram capacidade de invasão e a predileção de *E. faecalis* nas paredes dos túbulos dentinários. A capacidade de invasão dos túbulos dentinários foi medida após 8 semanas de incubação em dentes humanos *ex vivo*. Extensão e profundidade máxima de invasão tubular foram avaliadas

histologicamente. A aderência foi avaliada após a fratura vertical, exposição dos túbulos dentinários e contaminação com estirpes resistentes a eritromicina de *Enterococcus faecalis* aerobicamente por 2 horas e analisadas com microscopia eletrônica de varredura calculando no número de células por 100 microns. A invasão dos túbulos dentinários mostrou-se moderada após 8 semanas, no estudo de adesão havia significativamente mais bactérias aderidas a linha de fratura que nas paredes dos túbulos dentinários. Com relação à parede tubular a adesão foi maior na dentina interior comparada a porção mais externa e maior quando a adesão bacteriana foi testada em meio definido quimicamente que em solução salina tamponada com fosfato.

Zhu *et al.* (2010) investigaram a prevalência, o fenótipo e o genótipo de *E. faecalis* extraídos da saliva e de canais de pacientes com insucesso no tratamento endodôntico. Foram coletadas amostras de 32 adultos submetidos ao retratamento de casos de raízes com lesões periapicais após tratamento endodôntico realizado nos últimos 2 anos. Para identificação do *E. faecalis* foram utilizados os testes API20 STREP e 16S rRNA, além de testes fenotípicos e genótipos para detecção de genes de virulência. Das 19 amostras isoladas de *E. faecalis*, 6 eram da saliva e 13 dos canais radiculares, em 3 pacientes as amostras isoladas da saliva apresentaram maior resistência a gentamicina e os genes, ace, asa, gelE, cylA, e efaA, apresentaram correlação em todas as amostras.

Chávez de Paz (2012) testou a capacidade de quatro bactérias do canal radicular em estabelecer uma comunidade multiespecies e determinando as características estruturais, fisiológicas e a composição desta comunidade. Foram isoladas as seguintes estirpes *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, e *E.*

faecalis, e cultivados juntos em um sistema de célula miniflow, além de avaliar a viabilidade celular e os parâmetros de biovolume, utilizando um corante Redox de fluorescência para determinar a atividade metabólica do biofilme bacteriano. As quatro espécies testadas foram capazes de formar comunidades estáveis e reprodutíveis, mostrando um crescimento contínuo ao longo do tempo. No entanto, na ausência de glicose mostrou biovolumes significativamente menores. Uma elevada proporção de células viáveis (>90%) foi observada, e o crescimento do biofilme estava correlacionado com a atividade metabólica celular. A estrutura em meio rico não mudou consideravelmente nas primeiras 120 horas, período no qual o *E. faecalis*, *L. salivarius*, e *S. gordonii* foram mais abundantes.

D'Amato-Palumbo *et al.* (2013) avaliaram os microrganismos de possível origem oral associados às infecções de acesso vascular (VAI) durante o período de 10 anos em pacientes sob hemodiálise através do Human Oral Microbiome Database (HOMD). Dos 218 registros identificados, 65 pacientes apresentaram coletivamente 115 episódios VAI. Os microrganismos mais envolvidos foram: *Staphylococcus aureus* (49,6% de infecções), *Staphylococcus epidermidis* (10,4%), *Serratia marcescens* (10,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,6%), e *E. faecalis/fecum* (8,7%). Segundo o HOMD o risco de ocorrer uma VAI sendo causada por microrganismos provenientes da cavidade oral é muito pequena.

Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2013) analisaram a contribuição do *E. faecalis* na formação de biofilme em diferentes substratos. Placas infectadas com *E. faecalis* foram utilizadas para o crescimento de biofilme em dentina e osso bovino, gutta-percha e hidroxiapatita, os substratos foram incubados a 37°C durante 14 ou 21 dias, e o meio foi

trocado a cada 48 horas, após os períodos de indução do crescimento, as amostras (n = 5 por grupo e por período de indução) foram coradas usando o *Live / Dead* e as imagens foram analisadas ao microscópio confocal. Neste caso a formação do biofilme foi observada em todos os grupos, a gutta-percha teve o menor volume total em 14 dias e a hidroxiapatita mais elevada aos 21 dias, no entanto ao final dos 21 dias o volume de todas as amostras era semelhante.

Tennert *et al.* (2014) analisaram a microbiota de pacientes submetidos a tratamento de infecções endodônticas persistentes primárias e secundárias, relacionados aos aspectos clínicos e radiográficos. Foram coletadas amostras de 21 pacientes por meio de cones de papel esterilizados. As amostras foram plaqueadas, e em seguida, os microrganismos foram isolados e identificados morfológicamente por análise bioquímica e sequenciação dos genes de RNAr 16S de microrganismos isolados. Em 12 dos 21 canais foram isoladas 33 espécies de bactérias, 12 anaeróbios facultativos e 21 anaeróbios obrigatórios. *E. faecalis* foi mais frequentemente isolado em infecções endodônticas secundárias e a *Moraxella osloensis* foi isolada a partir de uma infecção endodôntica secundária, que tinha obturação do canal radicular insuficiente acompanhada de uma leve sensação de dor.

Murad *et al.* (2014) investigaram a microbiota de canais radiculares após insucessos no tratamento endodôntico, afim de, identificar e quantificar os microrganismos existentes. Amostras microbiológicas foram retiradas de 36 canais radiculares com infecção endodôntica persistente e as espécies bacterianas foram determinadas pelo quadrado de hibridização DNA-DNA. Os mais altos níveis encontrados foram as seguintes espécies: *Enterococcus faecium*, *Dialister*

pneumosintes, *Staphylococcus epidermidis* e *Helicobacter pylori*, com diferença estatística significativa entre bactérias gram-negativas e gram-positivas. Também se pôde observar nesse estudo uma correlação entre a área da lesão periapical e os níveis de espécies gram-negativas.

Vengerfeldt *et al.* (2014) realizaram um trabalho com pacientes que não tiveram contato com antibióticos para revelar as comunidades bacterianas presentes no tratamento endodôntico, através do sequenciamento Illumina (Illumina Inc, San Diego, CA). As amostras foram coletadas em condições assépticas rigorosas a partir de 12 dentes (5 com PAC primário, 3 com PAC secundário, e 4 com um abscesso periapical [PA]) e caracterizado o perfil da comunidade microbiana. Os resultados dessa análise demonstraram comunidades altamente polimicrobianas nos três grupos pesquisados, sendo, as mais frequentes, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. As comunidades foram individualmente diferentes, mas as bactérias anaeróbias predominaram como regra. *E. faecalis* foi encontrado apenas em pacientes com PAC secundário.

Ran *et al.* (2015) analisaram a capacidade de invasão de túbulos dentinários de *E. faecalis*. Foram infectados 40 dentes humanos unirradiculares em pH alcalino e condições de estresse nutricional. Os canais foram padronizados e após 4 semanas de contaminação as raízes foram divididas verticalmente em duas metades: uma metade foi processada para análise de formação de biofilme usando um microscópio eletrônico de varredura, a outra metade foi corada com reagentes fluorescentes e a profundidade de invasão tubular dos microrganismos foi examinada por microscopia confocal. A estirpe de *E. faecalis* resultou na formação de biofilme e invasão dos túbulos dentinários sob todas as condições de estresse, com exceção de pH 11 e 12. No entanto,

a distância de penetração túbulo foi drasticamente reduzida nestas condições de stress em comparação com em caldo tríptico de soja (TBS) ou pH 7. A profundidade de invasão na dentina na porção medial da raiz foi significativamente maior do que nas secções apicais em TSB e meio de privação de energia.

2.2 Hipoclorito de sódio

O NaOCl é conhecido pela sua atividade antimicrobiana (Du *et al.*, 2014) e capacidade de promover a dissolução da matéria orgânica (Okino *et al.*, 2004). No entanto, é uma solução citotóxica quando utilizada em elevadas concentrações (Marins *et al.*, 2012), instável quimicamente (Leonardo *et al.*, 2016) e interfere negativamente na adesão do material restaurador à dentina (Farina *et al.*, 2011).

Sena *et al.* (2006) investigaram a ação antimicrobiana com e sem agitação mecânica das seguintes soluções: NaOCl 2,5% e 5,25% e clorexidina 2,0%, e como grupo controle uma solução salina, sobre biofilmes de uma única espécie de *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum*, na qual, foram gerados sobre uma membrana de nitrato de celulose e colocados em meio de ágar. Os biofilmes foram imersos nas soluções de teste durante 30 segundos, e por 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, com e sem agitação mecânica. Após cada período, os filtros de membrana foram transferidos para tubos contendo 2 ml de caldo fresco associado a

neutralizantes. Os microorganismos foram suspensos e diluídos por 10 vezes. Alíquotas das diluições foram semeadas em meio ágar a 5% e incubadas em condições adequadas. Foram calculadas unidades formadoras de colônias, e comparadas pelo teste de Friedman e teste de Tukey, a um nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que a agitação mecânica promoveu uma melhor ação antimicrobiana das soluções testadas, por resultar na diminuição do tempo na eliminação dos microorganismos, exceto para *S. aureus* com 2,5% de NaOCl. NaOCl 5,25% e clorexidina 2%, demonstraram ação antimicrobiana mais rápida. O grupo controle apresentou ausência de inibição a todos os microorganismos testados, com ou sem agitação.

Soares *et al.* (2006) avaliaram as condições microbiológicas dos canais radiculares, por meio de esfregaços e culturas de dentes anteriores e pré-molares com necrose pulpar associada à radiolucências periapicais antes e após o preparo biomecânico (PBM). Utilizou-se a técnica de instrumentação biescalonada coadjuvada por soluções de 1%, 2,5% e 5% de NaOCl nos grupos I (n=39), II (n=36) e III (n=36), respectivamente. Antes do PBM havia 100% de culturas positivas e os esfregaços apresentavam diversificados morfotipos microbiológicos, sendo 20, 20 e 23 nos grupos I, II e III, respectivamente. Após o PBM, o percentual de culturas negativas nos grupos I, II e III foi 74,2%, 86,3 e 93,4% ($p>0,05$) e a incidência de morfotipos declinou para 14, 15 e 5, respectivamente. Todos os dentes biradiculares e/ou portadores de fístulas apresentaram-se microbiologicamente negativos após o PBM, independentemente do irrigante utilizado. Os morfotipos Gram-negativos foram mais suscetíveis à ação do PBM. Após o PBM persistiram apenas cocos e bacilos Gram-positivos no grupo III. Portanto, concluiu-se que o PBM

realizado com 5% de NaOCl, proporcionou o melhor desempenho e potencial antisséptico, pois, nas poucas culturas positivas, houve também significativa redução do número de morfotipos microbiológicos ($p < 0.05$).

Baumgartner *et al.* (2007) compararam a eficácia da ação antimicrobiana entre NaOCl 5,25% com irrigação de EDTA 15%, e NaOCl 1,3% com irrigação Biopure MTAD na viabilidade do *E. faecalis*. Foram utilizadas amostras de vinte e seis pares de dentes humanos uniradiculares, divididos em dois grupos ($n=20$), um grupo controle positivo ($n=6$) e um grupo controle negativo ($n=6$), na qual foram incubados com *E. faecalis* durante quatro semanas. Os canais foram instrumentados e irrigados de acordo com as soluções experimentais e as amostras bacterianas foram coletadas após a instrumentação e irrigação. A análise estatística dos dados foi feita através do teste dos postos sinalizados de Wilcoxon, na qual demonstrou diferenças significativas entre os grupos experimentais. As primeiras amostras bacterianas não revelaram crescimento nas amostras com NaOCl 5,25% com irrigação de EDTA 15% e, em 8 de 20 amostras com NaOCl 1,3% com irrigação de Biopure MTAD. As amostras colhidas após o alargamento adicional do canal revelaram novamente ausência de crescimento das 20 amostras com NaOCl 5,25% com irrigação de EDTA 15% e, em 10 de 20 amostras com NaOCl 1,3% com irrigação de Biopure MTAD. Conclui-se que a desinfecção mais consistente foi utilizando 5,25% NaOCl com irrigação de EDTA a 15%, ressaltando que a combinação de 1,3% de NaOCl com irrigação de Biopure MTAD deixou cerca de 50% dos canais contaminadas com *E. faecalis*.

Davis *et al.* (2007) investigaram a ação antimicrobiana do Dermacyn, Biopure MTDA, clorexidina 2%, e NaOCl 5,25% contra *E. faecalis*. Foram utilizadas 18 placas de Petri em ágar (BHI) inoculadas com *E. faecalis*. Cada placa continha cinco discos de papel, quatro discos foram saturados com uma das quatro soluções de ensaio e um disco foi utilizado como controle e saturado com água destilada estéril. Houve aleatorização na distribuição das placas em dois grupos (n=9): G1: incubados aerobicamente e G2: incubados anaerobicamente, ambos a 37°C e por 48 horas. O maior diâmetro das zonas de inibição microbiana foi medido em milímetros e gravados, e a análise estatística foi feita com a análise de medidas repetidas de variância (ANOVA). O Biopure MTDA apresentou uma maior zona de inibição microbiana quando em comparação com o NaOCl 5,25% e clorexidina 2%, não havendo diferença significativa entre os dois últimos. Porém o NaOCl 5,25% e clorexidina 2% resultaram em zonas de inibição microbiana maiores que Dermacyn, não havendo diferença significativa entre o Dermacyn e o grupo controle, já que ambos não demonstraram inibição microbiana.

Krauzer *et al.* (2007) compararam o efeito antimicrobiano de dois componentes de MTAD, doxiciclina e ácido cítrico e NaOCl 5,25% em dois modelos *in vitro* em *E. faecalis*. No modelo de dentes bovinos, os lúmens de 30 discos de dentina bovina foram infectados com *E. faecalis* durante 2 semanas antes do tratamento com um dos irrigantes experimentais ou solução salina. As bactérias foram recolhidas e enumeradas após a cultura durante a noite. As zonas de inibição foram registradas no modelo de difusão em ágar para cada irrigante. No modelo de dente bovino, NaOCl e 100 mg/mL de Doxiciclina foram

significativamente mais eficazes na morte de *E. faecalis* do que MTAD, ácido cítrico ou o controle de solução salina a uma profundidade de aproximadamente 100 µL nos túbulos dentinários. NaOCl foi significativamente mais eficaz que os outros irrigantes experimentais. No modelo de difusão em ágar, a doxiciclina foi significativamente mais eficaz do que MTAD, NaOCl ou ácido cítrico. Nenhum dos grupos experimentais foi capaz de tornar o canal estéril. Portanto, os autores relatam que pesquisas adicionais são indicadas para encontrar um irrigador intracanal que possa erradicar completamente *E. faecalis* do interior do canal radicular.

Retamozo *et al.* (2010) realizaram um estudo para determinar a concentração de NaOCl e o tempo de irrigação necessário para desinfetar cilindros de dentina infectados com *E. faecalis*. Quatrocentos e cinquenta cilindros de dentina foram preparados a partir de incisivos bovinos recém-extraídos. Tanto o cimento como a pré-dentina foram removidos e a abertura dos túbulos deu-se aplicando EDTA 17% durante 4 minutos e em seguida foram imersos em 5,25% de NaOCl pelo mesmo tempo. Após foram autoclavados em água à 121°C por 20 min., e posteriormente, inoculados com *E. faecalis* em caldo BHI, mantendo-os em condições aeróbicas a 37°C durante 3 semanas. Dividiu-se em três grupos: 1,3%, 2,5%, e 5,25% de NaOCl que foi aplicado em 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 minutos de intervalo para um total de 30 subgrupos, incluindo o grupo controle positivo e negativo. Cada amostra foi colocada em um tubo de 2 ml de caldo BHI e incubou-se por 72 horas. A ausência de turbidez demonstrou ausência de crescimento bacteriano, ao passo que, a presença de turbidez indicou a permanência de bactérias viáveis. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas

entre 5,25% de NaOCl e o tempo de exposição, e entre 2,5%, 5,25% de NaOCl e o grupo controle positivo (solução salina). Os resultados mostraram que a irrigação mais eficaz foi utilizando 5,25% NaOCl por 40 min., enquanto que a irrigação com 1,3% e 2,5% NaOCl por este mesmo intervalo de tempo foi ineficaz na remoção de *E. faecalis*, podendo-se concluir que a alta concentração e longa exposição ao NaOCl são necessárias para a eliminação de *E. faecalis*.

Guerreiro-Tanomaru *et al.* (2011) avaliaram a atividade antibacteriana de soluções irrigadoras convencionais e experimentais sobre *E. faecalis*. As seguintes substâncias foram avaliadas por teste de contato direto: NaOCl a 2,5%, clorexidina (CHX) a 2%, ácido peracético a 1%. Após diferentes períodos de contato (30s, 1,3 e 10 min), um agente neutralizante foi empregado. Diluições decimais seriadas foram realizadas e semeadas em placas de *tryptic soy agar* (TSA). O número de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) foi determinado. Solução salina foi utilizada como controle negativo. Os resultados mostraram que NaOCl a 2,5% e CHX a 2%, eliminaram *E. faecalis* após 30s de contato. O ácido peracético reduziu a contagem bacteriana em 86% após 3 min e eliminou completamente *E. faecalis* após 10 min. Estes resultados permitem concluir que o ácido peracético a 1% é efetivo sobre *E. faecalis*, apesar de sua ação mais lenta quando comparado ao NaOCl a 2,5% e CHX a 2%.

Stojicic *et al.* (2012) avaliaram a efetividade em remoção de *smear layer* e atividade antimicrobiana do QMix, em comparação com os soluções antimicrobianas convencionais: NaOCl 1% e NaOCl 2%, clorexidina 2%, MTAD, que juntamente com o QMix, foram mantidas pelos tempos de 5s, 30s e 3min., utilizando suspensão de *E. faecalis*

isolado de canais infectados e uma suspensão mista de bactérias da placa coletada de três voluntários. Após os tempos de exposição, as amostras foram coletadas e cultivadas em ágar (BHI) por duas semanas. Também foram realizados testes em biofilmes de *E. faecalis* cultivados em discos de dentina, com tempo de contato de 1 e 3 minutos aos agentes antimicrobianos. Os resultados para os testes microbiológicos foram verificados por meio da microscopia confocal e para remoção de *smear layer* por meio de microscopia confocal. Os resultados mostraram que o NaOCl e QMix eliminaram 100% das bactérias na forma planctônica ou em biofilme no tempo de 5 segundos. QMix e NaOCl 2% chegaram a ser doze vezes mais eficazes na eliminação de bactérias, e, em relação a *smear layer* a remoção promovida pelo QMix foi comparável à do EDTA.

Wang *et al.*, (2012) com o objetivo de avaliar a efetividade de desinfecção endodôntica contra biofilmes jovens e velhos de *E. faecalis*, contaminaram blocos de raízes dentárias humanas pelo método da centrifugação. Os biofilmes de 1 dia e os de 3 semanas de desenvolvimento foram submetidos a tratamentos de 1 e 3 minutos de contato com: NaOCl 2%, NaOCl 6%, clorexidina 2% e QMix. As proporções de células viáveis e não viáveis foram verificadas por meio do método de Microscópio de escaneamento de laser confocal (CLSM), o qual demonstrou que menos bactérias foram eliminadas nos biofilmes com 3 semanas de desenvolvimento. O tempo de exposição mais prolongado aos agentes antimicrobianos (3 minutos) resultou, para ambos os biofilmes, na maior quantidade de eliminação bacteriana quando comparado ao tempo de 1 minuto. O NaOCl 6% e o Qmix foram as soluções mais efetivas contra a forma jovem de biofilme, 44%-61% e

46%-61% de eliminação bacteriana respectivamente, e contra o biofilme de 3 semanas. O NaOCl 6% foi o mais efetivo (35%-54% de eliminação), seguido pelo Qmix (26%-40% de eliminação). Clorexidina 2% e NaOCl 2% apresentaram a mesma capacidade de redução bacteriana. Concluiu-se que no interior dos canais radiculares, bactérias estabelecidas em biofilmes com maior tempo de desenvolvimento (3 semanas) são menos susceptíveis (21%) a ação das soluções bactericidas do que as organizadas em biofilmes recentes (1 dia).

Morgental *et al.* (2013) verificaram a ação antimicrobiana na presença ou ausência de dentina do QMiX em comparação com as soluções convencionais de irrigação contra o *E. faecalis*: NaOCl 6%, NaOCl 1%, clorexidina 2%, EDTA 17%, e como grupo controle uma solução salina esterilizada. A amostra constituiu-se de cinco incisivos bovinos, na qual as coroas foram removidas e a dentina radicular foi moída. Posteriormente o pó foi suspenso em água destilada a 28 mg por alíquota de 50 ml, sendo cuidadosamente misturado com 50 ml das soluções testadas e 50 ml de suspensão bacteriana, dando um volume total de 150 ml. As incubações foram realizadas por 10 s, 1min e 6 horas. Posteriormente 100 ml foram retirados das amostras para monitorar a sobrevivência das bactérias expostas aos irrigantes na presença ou ausência de dentina e as unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas. Na ausência de dentina, depois de 10s de contato com a suspensão bacteriana 6% de NaOCl mostrou o menor número de bactérias e a diferença com o grupo controle foi significativa. Após 30s NaOCl 6% exibia UFCs por mililitro, ao passo que NaOCl 1% e QMiX apresentaram redução no número de UFCs em comparação com o grupo controle. Após 1 min, ambas as concentrações

de NaOCl apresentaram crescimento bacteriano e QMiX reduziu o número de UFCs, porém EDTA 17% e CHX 2% apresentavam contagens bacterianas semelhantes ao grupo controle. Concluiu-se que a dentina teve um efeito inibidor significativo em 6% de NaOCl (10s), 1% de NaOCl (10s e 1min) e QMiX (10s e 1min). Após 6 horas, ambas as concentrações de NaOCl, QMiX, e CHX inibiram todas as bactérias, independentemente da presença de dentina. Sendo assim, 6% de NaOCl foi o irrigante mais eficaz contra *E. faecalis*, e a presença de dentina atrasou o efeito antimicrobiano tanto do NaOCl como do QMiX, mas não impediu completamente sua ação.

Wong, *et al.* (2014), determinaram o grau de descontaminação mediada por concentrações de 0,5% e 3,0% de NaOCl das paredes dos canais radiculares. Biofilmes de *E. faecalis* e *Porphyromonas gingivalis* foram cultivados em dentina do canal radicular durante sete dias. A parede do canal foi irrigada com 0,5% e 3% de NaOCl, sendo n = 8 para cada grupo das soluções testadas, e como grupo controle uma solução salina estéril, n=2. Os resultados foram examinados por CLFM e, em seguida, MEV. As proporções de células viáveis situadas em diferentes profundidades na dentina do canal radicular foram comparadas a um nível de significância de P=0,05. Ambas as concentrações de NaOCl reduziram significativamente a quantidade de bactérias na camada mais superficial de dentina (0,1mm) do canal radicular, em comparação com o grupo controle, no entanto, a diferença não foi significativa entre as duas concentrações. Para as outras duas camadas (0,1 à 0,3 mm) a irrigação com 3% NaOCl apresentou valores mais baixos de bactérias viáveis, em comparação com 0,5% NaOCl e com o grupo controle. Pode-se concluir que o aumento da concentração de

NaOCl melhora sua penetração em profundidade e com isso sua ação antimicrobiana, mas não foi capaz de erradicar completamente as bactérias no sistema de canais radiculares.

Arias-Moliz *et al.* (2015) analisaram o efeito antimicrobiano de hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl) sozinho e associado a 9% HEDP (ácido etidrônico) (NaOCl/HEDP), ácido peracético 2% (PAA) e clorexidina 2% sobre a viabilidade de *E. faecalis*. Foram produzidos blocos de dentina que permaneceram em contato com o biofilme de *E. faecalis* durante cinco dias para contaminação e por 3min em contato com a solução testada, como grupo controle foi utilizado água destilada. O volume total e a porcentagem de células mortas na dentina infectada foram analisados por microscopia confocal e pela técnica *life/dead*. Nas soluções de NaOCl e NaOCl/HEDP, pode-se observar um percentual significativamente maior de células mortas, seguindo da solução de PAA. Nenhum efeito antimicrobiano significativo de CHX foi observado em comparação com o grupo de controle. O volume total diminuiu significativamente em NaOCl, NaOCl/HEDP e PAA, em comparação com ao grupo de controle e a CHX. As soluções de NaOCl e NaOCl/HEDP foram mais eficazes contra biofilme de *E. faecalis*.

2.3 Hipoclorito de cálcio

O $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ é normalmente utilizado no processo de esterilização industrial para purificação da água. Esta substância química tem demonstrado capacidade antimicrobiana contra patógenos endodônticos

(de Almeida *et al.*, 2014) e capacidade de promover a dissolução tecidual (Dutta *et al.*, 2012).

Lang *et al.* (2000) investigaram alternativas de tratamentos utilizando ácido láctico, ácido acético, e $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ na eliminação da *Escherichia coli* 0157: H7 em sementes de alfafa. Foram inoculadas cada uma das cinco estirpes de *E. coli* 0157: H7 nas sementes de alfafa. As alternativas de tratamento foram: G1: 5% de ácido láctico, à 42°C, durante 10 min.; G2: 5% de ácido acético, à 42°C, durante 10 min.; G3: 2,5% de ácido láctico, à 42°C, por 10 min., seguido por 2.000 ppm de cloro ativo ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), à 25°C, durante 15 min.; G4: 5% de ácido láctico, à 42°C, durante 10 min., seguido de 2.000 ppm de cloro ativo ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) à 25°C, durante 15 min.; G5: 20.000 ppm de cloro ativo ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) à 25°C, durante 15 min. Cada tratamento apresentou redução de células de 6,0 log 10 UFC/g, através do plaqueamento em ágar MacConkey Sorbitol (SMAC). O plaqueamento em ágar (BHI) mostrou que G1 e G4 reduziram a contagem de 2,3-4,1 log 10 UFC/g; G3 e G4 foram mais eficientes que o G1 e G2. Após o tratamento com o G5, nenhuma célula sobrevivente foi detectada em SMAC e BHI. A germinação das sementes não foi afetada por nenhum dos tratamentos. Pode-se concluir que a lesão celular não letal deve ser considerada na avaliação dos tratamentos contra *E. coli* 0157: H7 em sementes de alfafa; pode ser alcançada uma redução de 2-4 log 10 UFC/g, utilizando 20.000 ppm de cloro ativo ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$); a utilização de ácido láctico seguido por $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, apresenta maior letalidade contra *E. Coli* 0157: H7.

Gandhi *et al.* (2003) analisaram a eficácia de 20.000 ppm de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ no tratamento de sementes de alfafa contaminadas com

Salmonella. Para isso, após a contaminação artificial das sementes, realizou-se uma pulverização com água contendo 100 ppm de cloro, durante a germinação e crescimento da alfafa. Posteriormente foi feito o tratamento utilizando 200.000 ppm de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, e água como grupo controle. Os resultados mostraram que a aplicação de 100 ppm de cloro, foi minimamente eficaz, apresentando uma redução de 0,5 log na população de *Salmonella*. Concluiu-se que o tratamento das sementes com 20.000 ppm de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ em combinação com 100 ppm de cloro durante a germinação e crescimento não eliminou completamente a presença de *Salmonella* nos brotos, existindo assim a necessidade de modificações ou novas alternativas para desinfecção de sementes antes da germinação e durante o crescimento para garantir a segurança microbiana de semente germinada.

Dutta & Saunders (2012) comparou as propriedades de dissolução tecidual de 5% e 10% de $\text{Ca}(\text{OCI})_2$, e de 1,36% e 4,65% de NaOCl sobre tecido muscular bovino. A concentração de cloro livre de cada solução foi determinada utilizando titulação iodométrica. Os espécimes de tecido de músculo bovino foram ajustados de acordo com o peso (50 +/- 5mg). Dez amostras de tecido de cada grupo foram imersas em 5 ml de cada solução de ensaio, removidas após 5 minutos, secas com papel absorvente, e pesadas. O processo foi repetido a cada 5 min com uma alíquota de 5 ml da solução de ensaio para 60 minutos ou até a dissolução completa dos tecidos, e a perda de peso percentual das amostras foi calculada. Os resultados mostraram que as concentrações de cloro disponível dos irrigantes variaram de 1,36% a 4,65%. Todas as soluções de tecido foram completamente dissolvidas aos 60 minutos, exceto 5% $\text{Ca}(\text{OCI})_2$ (99,4% de dissolução). Entre as leituras de teste de

35 e 60 minutos não houve diferenças significativas entre as soluções. NaOCl 4,65% apresentou mais rápida dissolução tecidual durante os primeiros 35 minutos ($P < 0,05$). Nesse período, a perda de peso com 10% de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ diferiam de 4,65% de NaOCl em todos os intervalos de tempo, exceto aos 5 e 35 minutos ($P < 0,05$); 5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ não demonstrou diferenças significativas com 10% de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e 1,36% de NaOCl nos primeiros 35 minutos exceto durante a mensuração de 5 minutos. Pode-se concluir que 4,65% de NaOCl dissolveu tecido mais rapidamente do que soluções de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e 1,36% de NaOCl em relação aos primeiros 35 minutos mas não houve diferenças significativas entre as soluções.

de Almeida *et al.* (2014) compararam a efetividade do $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e do NaOCl associados à irrigação ultrassônica passiva em canais radiculares de dentes bovinos infectados com *E. faecalis*. Para isso, os canais dos 60 dentes bovinos unirradiculares extraídos foram preparados, autoclavados, inoculados com *E. faecalis*, e incubados por 30 dias. As amostras foram divididas em seis grupos ($n=10$), de acordo com o protocolo de descontaminação: G1: nenhum tratamento; G2: água destilada; G3: 2,5% de NaOCl; G4: 2,5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$; G5: 2,5% NaOCl com ativação ultrassônica; e G6: 2,5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ com ativação ultrassônica. Testes microbiológicos (UFC) foram realizados para avaliar e mostrar a efetividade dos tratamentos propostos. Os dados foram submetidos à análise estatística de variância seguida pelo teste Tukey. Conforme os resultados, G1 e G2 mostraram maiores médias de contaminação (3,26 UCF/ml e 2,69 UFC/ml, respectivamente), com diferença estatística para todos os outros grupos ($P < 0,05$). O G6 mostrou a menor média de contaminação (1,00 UFC/ml), com nenhuma

estatística encontrada no G3, G4 e G5. Pode-se concluir que o uso de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e a irrigação passiva ultrassônica podem contribuir de maneira significativa na redução do conteúdo microbiano no preparo químico-mecânico, durante o tratamento endodôntico.

Wang e Kniel (2014), compararam a eficácia do $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ na inativação de bactérias e vírus em sementes de alfafa. Para isso, as sementes de alfafa foram inoculadas com norovirus humano (huNoV), norovirus murino (MNV), vírus da Tulane (TV), *Escherichia coli* 0104:H4, e *Salmonella entérica* (sorotipo Agona). Posteriormente, as sementes foram tratadas com $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ a 2.000 ppm e 20.000 ppm, com a média de cloro livre 1.388 ± 117 mg/L e 11472 ± 1500 mg/L, respectivamente, com pH 7,00. A redução de cópias genômicas de huNoV, demonstraram que o mesmo é resistente ao $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, independentemente da concentração. Utilizando 20.000 ppm de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, foram observadas reduções significativas, na ordem: $\text{TV} < S. \text{entérica} < \text{MNV} < E. \text{coli}$ 0104:H4. Utilizando 2.000 ppm $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, as reduções foram: $\text{TV}, S. \text{entérica}, \text{MNV} < E. \text{coli}$ 0104: H4. 20.000 ppm de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ foi mais eficaz que 2.000 ppm de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ em todos os microorganismos testados. Nas amostras contendo uma carga de material orgânico artificial, a atividade do $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ sobre a inativação do vírus diminuiu à medida que a carga orgânica aumentou. Pode-se concluir que o $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ não inativa completamente todas as bactérias e vírus inoculados em sementes, e altos níveis de *E. coli* 0104: H4 e *S. entérica*, estavam presentes em brotos de amostras de sementes higienizados após um período de germinação de 7 dias.

Görduysus *et al.* (2015) avaliaram os efeitos dos copolímeros ácido acrílico e ácido maleico (Poli (AA-co-MA)) e do $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ sob a dentina

radicular, por meio de MEV. Vinte e quatro dentes foram instrumentados, removendo o terço cervical e apical das raízes, mantendo apenas 5 mm do terço médio, que posteriormente foi separado em dois pedaços no sentido longitudinal. Os espécimes foram aleatoriamente divididos em seis grupos e submetidos a cada agente irrigante por 5 minutos, como segue: G1: 7% Ca(ClO)₂; G2: 25% Poli (AA-co-MA); G3: 7% Ca(ClO)₂ + 25% Poli (AA-co-MA); G4: 2,5% NaOCl; G5: 17% EDTA; G6: 2,5% NaOCl + 17% EDTA. Os dados foram analisados por meio dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn. Os resultados mostraram que no G4 houve a presença de lama dentinária e detritos estatisticamente diferentes do G2, G3, G5 e G6, onde a lama dentinária e os detritos foram totalmente removidos (P<0,05). O G2, G3 e G5, não apresentaram erosão e não houve diferença significativa entre eles. G6 apresentou intensa erosão sendo estatisticamente diferente dos G2, G3, G5 (P<0,05). Pode-se concluir que o Poli (AA-co-MA) é eficaz na remoção de detritos e da lama-dentinária, sem causar erosão, isoladamente ou associado ao Ca(ClO)₂.

Ferreira *et al.* (2015) investigaram a influência da remoção do colágeno sobre a morfologia da superfície dentinária e na infiltração de restaurações com resina composta, utilizando Ca(ClO)₂. Quarenta terceiros molares foram utilizados e confeccionaram-se duas cavidades em cada um dos dentes, divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento: Na10-10% de NaOCl durante 30 min.; Ca10-10% de Ca(ClO)₂ durante 30 seg.; Ca15-15% Ca(ClO)₂, durante 30 seg. As cavidades foram hibridizadas utilizando um sistema adesivo à base de acetona e um composto de resina. Posteriormente, foram submetidas a ciclos térmicos para 5.000 ciclos, imersos em azul de metileno, durante

quatro horas e seccionados em placas de 1 mm de espessura. Avaliaram-se duas fatias por dente usando microscópio estereoscópico e atribuído o grau de infiltração (escores 0-3). Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$). Quatro dentes receberam tratamento de superfície de acordo com os grupos e foram submetidos ao MEV e EDS para transportar na composição elementar (CE). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p=0,533$). O $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ altera a composição e morfologia da superfície da dentina, resultando num aumento na quantidade de cálcio na interface. Quando usado antes de um sistema adesivo à base de acetona, o $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ não produz quaisquer diferenças de infiltração, quando comparado com o grupo controle e o grupo Na10-10% de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$.

Leonardo *et al.* (2016) avaliaram o pH e o teor de cloro disponível do NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, armazenados em diferentes condições e períodos de tempo, além da tensão superficial de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ em comparação com as soluções de NaOCl . Soluções de 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25% foram preparadas, e armazenadas por 30, 60, e 90 dias por 25°C, 4°C, e 37°C, respectivamente. O pH foi avaliado por um medidor digital e por titulação, e a tensão superficial foi testada utilizando um tensiômetro *Du Nouy*. Os resultados mostraram a formação de um precipitado utilizando 2,5% e 5,25% de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Tanto 2,5% e 5,25% de NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ obtiveram uma diminuição de cloro disponível em comparação com as soluções recém preparadas. Soluções de 0,5 e 1% de NaOCl tendem a ter um pH inferior à 0,5% e 1% de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$; NaOCl 5,25% apresenta pH superior à 5,25% de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$; 0,5% e 1% de NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ apresentam pH inferior quando comparado à soluções com 2,5% e

5,25%. NaOCl mostrou valores de tensão superficial inferior à $\text{Ca}(\text{OCl})_2$. Pode-se concluir que soluções de $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ são altamente alcalinas e apresentam um teor de cloro disponível superior ao NaOCl, porém, a tensão superficial também é mais elevada. Em relação ao teor de cloro disponível, as soluções tendem a ser estáveis por até 30 dias de armazenamento, quando mantidas a 4°C ou 25°C, sendo o calor um fator contribuinte da instabilidade das soluções.

Cecchin *et al.* (2017) avaliaram os efeitos de diferentes tipos de derivação sintética e derivação natural de irrigantes do canal radicular (hipoclorito de sódio 6% [NaOCl], hipoclorito de cálcio 6% [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$] e 6,5% de extrato de semente de uva [GSE]) nas propriedades mecânicas dentinárias (resistência à flexão, resistência à tração máxima [UTS] e resistência à fratura). Feixes de forma retangular e secções em forma de ampulheta obtidos a partir da dentina coronária e dentina radicular foram tratados com NaOCl 6%, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 6% ou 6,5% de GSE durante 30 min. As soluções irrigantes foram substituídas a cada 5 min. Em seguida, os espécimes dentinários foram enxaguados com água destilada (DW) seguido de incubação com EDTA 17% durante 1 min e completamente lavados com DW novamente. As amostras do grupo controle foram testadas sem irrigação prévia. Após o tratamento com irrigantes, utilizaram-se feixes de dentina para avaliar a resistência à flexão (n = 10), enquanto a UTS foi avaliada usando as secções em forma de ampulheta dentinária (n = 10). Raízes com 1 mm de espessura de parede dentinária foram obtidas a partir de dentes humanos e tratadas com as mesmas soluções irrigantes (n = 10). Um carregamento compressivo foi aplicado às superfícies coronárias das raízes até a fratura. Os valores de cada teste mecânico foram analisados estatisticamente por ANOVA

unidirecional seguido pelo teste Tukey HSD ($P < 0,05$). NaOCl reduziu significativamente as propriedades mecânicas da dentina em todos os testes mecânicos ($P < 0,05$) e não foi encontrada diferença estatística entre o $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, o GSE e o grupo controle ($P > 0,05$). Pode-se concluir que o $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ e o GSE podem ser soluções irrigantes alternativas, uma vez que não afetam negativamente as propriedades mecânicas dentinárias.

2.4 Terapia Fotodinâmica

Inicialmente idealizada para o combate ao câncer, a PDT vem ganhando espaço na odontologia devido a sua efetividade antimicrobiana. Na PDT, utiliza-se um fotosensibilizador não tóxico, o qual é estimulado por uma luz de laser de baixa intensidade que reage com as moléculas de oxigênio, gerando espécies reativas de O_2 . Estas espécies agem com componentes celulares bacterianos por meio de oxidação ou reação de redução, induzindo a morte dos microorganismos (Wainwright, 1998). A PDT tem sido considerada uma nova modalidade para desinfecção do canal radicular (de Oliveira *et al.*, 2011) demonstrando também ser efetivo no combate aos patógenos endodônticos (Ghinzelli *et al.*, 2014).

Garcez *et al.* em 2008, analisaram o efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica (PDT), em associação com o tratamento endodôntico. Foram selecionados vinte pacientes. As amostras microbiológicas foram recolhidas após o acesso do canal, tratamento endodôntico e PDT. No fim da primeira sessão, o canal radicular foi preenchido com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, e

após uma semana, uma segunda sessão a terapia endodôntica foi realizada. A terapia endodôntica resultou em uma redução média de 1,08 log. A combinação de PDT aumentou a redução significativamente (1,83 log, $p = 0,00002$). A utilização de PDT para endodontia conduz a uma melhor redução da carga bacteriana e pode ser uma abordagem adequada para o tratamento de infecções orais.

Fimple *et al.* (2008), investigaram os efeitos fotodinâmicos do azul de metileno (MB) em biofilmes multi-espécies de canais radiculares que compreendem *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum* subespécie *nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em canais radiculares infectados experimentalmente de dentes humanos extraídos *in vitro*. A MEV mostrou a presença de biofilmes em canais radiculares antes da terapia. O sistema de canais radiculares foi incubado com MB (25 µg/ml) durante 10 minutos seguido de exposição à luz vermelha a 665 nm, com uma fluência de energia de 30 J/cm². A luz foi transmitida através de um *laser* de diodo com um diâmetro de 250 µm que distribui luz uniformemente através de fibra ótica. A PDT alcançou uma redução de até 80% da contagem de unidades formadoras de colônias. Os autores concluíram que a PDT pode ser um complemento eficaz para o tratamento endodôntico padrão quando os parâmetros de PDT são otimizados.

Garcez *et al.* (2010), relataram o efeito antimicrobiano da PDT associado à endodontia em pacientes com necrose pulpar infectada com microflora resistente a uma terapia antibiótica anterior. Foram selecionados trinta dentes anteriores de 21 pacientes com lesões periapicais que já haviam sido tratados com o tratamento endodôntico convencional e terapia antibiótica. As amostras microbiológicas foram

(1) feitas depois de acessar o canal radicular, (2) após a endodontia, e (3) após a PDT. Todos os pacientes tiveram pelo menos um microorganismo resistente a antibióticos. A PDT utiliza polietilenimina e clorina como um fotossensibilizador e um *laser* de diodo como uma fonte de luz ($P = 40 \text{ mW}$, $t = 4 \text{ minutos}$, $E = 9,6 \text{ J}$). A terapia endodôntica sozinha produziu uma redução significativa no número de espécies microbianas, mas apenas três dentes estavam isentos de bactérias, contudo a interação entre PDT e a endodontia eliminou todas as espécies resistentes aos medicamentos e todos os dentes estavam livres de bactérias. O uso de PDT adicionado ao tratamento endodôntico convencional levou a uma grande redução da carga microbiana. A PDT, portanto, é um tratamento eficiente para eliminar os microorganismos resistentes a múltiplas drogas.

Souza *et al.* em 2010 investigaram os efeitos antibacterianos da PDT com azul de metileno (MB) ou azul de toluidina (AT) (ambos a 15 mcg/mL) como um suplemento à instrumentação/irrigação de canais radiculares experimentalmente contaminados com *E. faecalis*. Setenta dentes extraídos tiveram seus canais radiculares contaminados com uma cepa de *E. faecalis* por 7 dias, instrumentados com instrumentos de níquel-titânio e irrigados com 2,5% NaOCl ou com NaCl 0,85%, e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: MB / NaOCl (PDT com MB e NaOCl como irrigante), TB / NaOCl (PDT com TB e NaOCl como irrigante), MB / NaCl (PDT com MB e NaCl como o irrigante) e TB / NaCl (PDT com TB e NaCl como irrigante). Para a PDT, o fotossensibilizador permaneceu no canal durante 2 minutos, após, foram expostos à luz vermelha emitida a partir de um *laser* de diodo durante 4 minutos. As amostras foram recolhidas

antes e depois da instrumentação/irrigação e seguindo o procedimento de PDT específica para cada grupo. Independentemente do irrigante utilizado (NaOCl ou NaCl), a instrumentação reduziu significativamente as contagens bacterianas, em comparação com o *Baseline* ($p < 0,001$). NaOCl como o irrigante foi significativamente mais eficaz do que o NaCl, e esta diferença persistiu após PDT, independentemente do fotossensibilizador utilizado ($p < 0,05$). PDT com MB ou TB não aumentou significativamente a desinfecção após o preparo químico-mecânico usando hipoclorito de sódio como irrigante ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os dois fotossensibilizadores ($p > 0,05$). A PDT com MB ou TB não pode exercer um efeito suplementar significativo para procedimentos de instrumentação/irrigação no que diz respeito à desinfecção intracanal. É recomendado mais ajustes no protocolo para aumentar a previsibilidade na eliminação de bactérias antes da utilização clínica.

Rios *et al.* (2011), relatam que a PDT com *lasers* de alta potência como fonte de luz tem sido provada ser eficaz na desinfecção de canais radiculares. Os autores avaliaram o efeito antimicrobiano da PDT utilizando azul de toluidina. O (TBO) e um *laser* de diodo de baixa potência (LED) após o protocolo de desinfecção convencional com NaOCl 6%. Dentes unirradiculares extraídos foram limpos e o ápice foi selado antes da incubação com *E. faecalis* por 2 semanas. As raízes foram divididas aleatoriamente em cinco grupos experimentais e três grupos controle. Lascas de dentina foram coletadas dos canais radiculares de todos os grupos com a lima rotatória #50/.06. As unidades formadoras de colônias foram determinadas, e a taxa de sobrevivência bacteriana foi calculada para cada tratamento. A taxa de sobrevivência

das bactérias do grupo NaOCl / TBO / luz (0,1%) foi significativamente menor ($P < 0,005$) do que o NaOCl (0,66%) e / grupos de luz TBO (2,9%). PDT utilizando TBO e um *laser* de diodo possui o potencial de ser utilizado como um procedimento antimicrobiano adjuvante na terapia endodôntica convencional.

Meire *et al.* em 2012 compararam a eficácia antimicrobiana de dois *lasers* de alta potência (Nd: YAG e Er: YAG) e dois sistemas comerciais de PDT com a ação de NaOCl em biofilmes de *E. faecalis* cultivadas em discos de dentina. Biofilmes de *E. faecalis* foram cultivados em discos de dentina em uma placa de microtitulação, foram incubados durante 24 h e submetido aos seguintes tratamentos: PDT (Denfotex e sistema Helbo), irradiação a *laser* Er: YAG (2940 nm, a 50 mJ ou 100 mJ, 15 Hz, 40 s), Nd: YAG (1064 nm, 2 W, 15 Hz, 40 s) e imersão em 2,5% (w/v) de NaOCl durante 1, 5, 10 e 30 min. As bactérias sobreviventes foram colhidas, e o número de UFC por disco foi determinada por contagem de placa. Significativas reduções na contagem foram observadas para PDT (Helbo) (redução dentro das limitações do estudo, NaOCl foi o mais eficaz na eliminação de biofilme de *E. faecalis*, enquanto que o tratamento a *laser* Er: YAG (100 mJ pulsos) também resultou em reduções altas nas contagens das bactérias viáveis. A utilização de ambos os sistemas comerciais de PDT resultou em uma fraca redução do número de células de *E. faecalis*. A irradiação com *laser* Nd: YAG foi a menos eficaz.

Raymond *et al.* (2012). avaliaram os efeitos antimicrobianos da PDT em dentes humanos infectados *ex vivo*. Cinquenta e dois dentes recém-extraídos com necrose pulpar e imagem radiolúcida periapical associadas foram obtidos de 34 indivíduos. Foi realizado desbridamento

químico-mecânico (CMD) de vinte e seis dentes com 49 canais com 6% de NaOCl e 26 dentes com 52 canais receberam CMD além da PDT. Para PDT, os sistemas de canais radiculares foram incubados com azul de metileno (MB) a uma concentração de 50µg/ml durante 5 minutos, seguido por exposição a luz vermelha a 665 nm, com uma fluência de energia de 30 J/cm². O conteúdo dos canais radiculares foi recolhido através de lavagem dos canais no início do estudo e após CMD sozinho ou CMD + PDT e foi diluído em série e cultivado em ágar sangue. As frações de sobrevivência foram calculadas por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A caracterização parcial das espécies do canal radicular no grupo controle e após CMD sozinho ou CMD + PDT foi realizada utilizando sondas de DNA com um painel de 39 espécies a em um tubo de ensaio. Os níveis de detecção pós-tratamento para todas as espécies foram significativamente menores para canais tratados pelo CMD + PDT do que eram para aqueles tratados pelo CMD sozinho. Os dados indicaram que PDT reduziu significativamente as bactérias residuais dentro do sistema de canais radiculares e que PDT, se reforçada por melhorias na técnica, é uma promessa substancial como adjuvante da CMD.

Hecker *et al.* em 2013 estabeleceram um modelo refinado de canais radiculares infectados artificialmente e confirmaram a sua adequação como um método *ex vivo* sensível para avaliar a eficácia de agentes de desinfecção. A desinfecção foi avaliada utilizando NaOCl, e um método recentemente utilizado para promover a desinfecção, a PDT. As raízes de incisivos bovinos foram seccionadas em três partes, os canais foram preenchidos com uma suspensão de *E. faecalis* como um meio de cultura. Após 7 dias, secções coronais foram desinfetadas com NaOCl

(0,5%, 1,0% e 3,0% para 30, 60 e 600 s) ou um sistema fotoativado (Pacto; Cundente, Tubingen, Alemanha) para PDT antibacteriana. As secções apicais serviram como controle estéril e secções do terço médio como controles de crescimento bacteriano. A desinfecção foi detida na metade dos espécimes tratados com NaOCl. O sistema detectou de forma confiável a desinfecção do canal radicular e túbulos dentinários e provou ser um modelo adequado para testes *ex vivo* da desinfecção do canal radicular. O efeito de NaOCl dependia da duração do contato com os espécimes. Nas presentes condições experimentais a PDT não alcançou a desinfecção suficiente.

Miranda *et al.* (2013), avaliaram a eficácia *ex vivo* do sistema EndoVac e PDT como adjuntos para o desbridamento químico-mecânico associado com hidróxido de cálcio (CaOH₂) na redução dos níveis de *E. faecalis* o interior dos canais radiculares. Cento e vinte e cinco dentes pré-molares estéreis foram convencionalmente acessados, preparados e, em seguida, contaminados com *E. faecalis* (ATCC 29212) durante 30 dias. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: controle (desbridamento químico-mecânico com irrigação convencional); Endovac (desbridamento químico-mecânico com sistema de EndoVac); PDT (desbridamento químico-mecânico com irrigação convencional e PDT) e Endovac + PDT (desbridamento químico-mecânico com EndoVac e PDT). Os irrigantes utilizados em todos os grupos NaOCl 5,25% e EDTA 17%. Após o tratamento, um curativo de demora (CaOH₂) foi aplicado em todos os canais, durante 7 dias. As amostras foram obtidas antes (T1) e após os procedimentos terapêuticos (T2) e, depois de medicação intracanal (T3), semeadas em meios BHI e incubadas (37°C, 48 h) para determinar as unidades formadoras de

colônias (UFC ml (- 1)). O uso concomitante do sistema EndoVac e a PDT, em combinação ou não, foi tão eficaz quanto o desbridamento químico-mecânico convencional associado com CaOH₂ na redução de *E. faecalis* intracanal.

Silva *et al.* (2013), avaliaram a formação de biofilme no interior de interfaces de cimento-dentina de segmentos radiculares obturados com gutapercha e cimentos incorporados com nanopartículas de quitosana (CS) com e sem tratamento de superfície do canal com diferentes formulações de CS. Canais de raízes bovinas de 4 mm (n = 35) foram preenchidos com gutapercha e o cimento incorporado com nanopartículas de CS sem tratamento de superfície (grupo CS) ou depois de tratamento de superfície com o CS fosforilada (grupo PHCs), CS-conjugado com rosa bengala e irradiação fotodinâmica (grupo CSR), ou uma combinação de ambos os PHCs e CSR (grupo RBPH). O grupo controle foi obturado com gutapercha e um cimento não modificado. Após 7 dias de fixação, as amostras foram envelhecidas em solução tamponada a 37° C durante 1 ou 4 semanas. Monoespecies de *E. faecalis* foram cultivadas em amostras durante 7 dias em um fermentador de biofilmes à base de quimiostato. A formação de biofilme na interface cimento-dentina foi avaliada por CLFM. Somente nos espécimes de 4 semanas, a média das áreas de biofilme foram significativamente menores do que no controle para o CS. A Incorporação de nanopartículas CS para o cimento de óxido de zinco e eugenol inibiu a formação de biofilme na interface cimento-dentina. Este efeito foi mantido quando os canais foram tratados com CS fosforilada, e foi moderado no tratamento de canal com o CS- conjugado com rosa bengala e irradiação.

Stojicic *et al.* (2013) compararam a eficácia da desinfecção convencional e da desinfecção modificada fotoativada (PAD) contra o *E. faecalis* e bactérias do biofilme. *E. faecalis* (4 cepas) e bactérias do biofilme de três voluntários adultos foram suspensas em água, adicionando azul de metileno (MB, 15 pmol L⁻¹). O MB foi misturado com peróxido de hidrogênio 0,5% e clorexidina (CHX) 0,05%, MB foi misturado com peróxido de hidrogênio 0,5% e EDTA 0,05% ou MB misturado com EDTA 0,05% e CHX 0,05% e expostos a irradiação a *laser* a partir de 10s até 5 min. Após a exposição, foram retiradas amostras, diluídas em série e o crescimento aeróbico e anaeróbico ocorreu em placas de Agar Tríptico de Soja ou em placas de agar de sangue, durante 24 e 72 h, respectivamente. Para experiências de biofilme, *E. faecalis* e bactérias do biofilme foram cultivadas em discos de hidroxiapatita estéril (HA) revestidos com colágeno bovino tipo I durante a noite por 3 semanas. Após a exposição ao MB ou MB e baixa concentração de EDTA com água oxigenada ou CHX, a porcentagem de bactérias mortas pelo PAD foi avaliada utilizando a coloração de viabilidade e CLFM. PAD convencional por 3 min causou a morte de 90,76% a 100% de *E. faecalis*, mas não conseguiu matar todas as bactérias do biofilme, mesmo após 5 min de irradiação a *laser*. Em PAD modificada, até 100% em suspensão de *E. faecalis* e bactérias do biofilme foram mortos após 1 min e 30 s de irradiação. Até vinte vezes mais bactérias do biofilme foram mortas por PAD modificado do que pelo PAD convencional. Os autores concluíram que PAD modificada foi superior à PAD convencional contra bactérias do biofilme.

Ghinzelli *et al.*, (2014), realizaram um estudo, *in vitro*, com objetivo de avaliar a influência da ativação ultrassônica sobre a PDT sobre

sistema de canais radiculares infectados com *E. faecalis*. Os canais radiculares de 50 dentes bovinos unirradiculares extraídos foram ampliados até a lima #60, autoclavados, inoculados com *E. faecalis* e incubados por 30 dias. As amostras foram divididas em cinco grupos (n = 10) de acordo com o protocolo de descontaminação: G1 (grupo controle) - sem procedimentos realizados; G2 - fotossensibilizador (0,01 % de azul de metileno); G3 - ativação ultrassônica de fotossensibilizador (0,01% de azul de metileno); G4 - terapia fotodinâmica sem ativação ultrassônica; G5 - terapia fotodinâmica com ativação ultrassônica. Teste microbiológico (contagem UFC) e MEV foi realizada para avaliar e ilustrar, respectivamente, a eficácia dos tratamentos propostos. A análise microbiológica demonstrou que G5 (PDT com ativação ultrassônica) apresentou a menor média de contaminação (3,17 log UFC/ml), sendo estatisticamente diferente de todos os outros grupos. Os autores concluíram com este estudo que o uso de ativação ultrassônica em PDT melhorou o seu potencial de descontaminação, resultando numa eliminação superior de *E. faecalis* do espaço do canal radicular.

Chrepa *et al.*, em 2014 realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar o efeito da PDT sobre a redução da carga bacteriana durante a desinfecção do canal radicular. A seleção dos artigos para a inclusão na revisão sistemática foi realizada em duas fases, com base em critérios de elegibilidade pré-determinados de acordo com os itens de relatório preferido para revisões sistemáticas e meta-análises (PRISMA). Três artigos preencheram os critérios de inclusão e foram selecionados para esta revisão sistemática. Todos os estudos incluídos mostraram um efeito positivo da PDT na redução da carga microbiana no tratamento endodôntico que varia de 91,3% -100%. A informação clínica disponível

está limitada sobre o uso de PDT na desinfecção do canal radicular. Se for suportada pela pesquisa clínica, a PDT pode ter eficácia para a desinfecção adicional de canais radiculares, especialmente na presença de bactérias resistentes a múltiplas drogas.

Borsato *et al.*, em 2016 avaliaram a resposta dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães com periodontite apical após tratamento endodôntico em uma sessão com e sem PDT quando comparado ao uso de um curativo intracanal. Sessenta canais radiculares com uma lesão periapical induzida foram instrumentados e divididos em três grupos: I: tratamento endodôntico em duas sessões utilizando um curativo intracanal antibacteriano com pasta à base de hidróxido de cálcio; II: tratamento endodôntico em uma sessão utilizando a PDT; e III: tratamento endodôntico em uma sessão em que os canais foram preenchidos imediatamente após o preparo biomecânico. As maxilas e mandíbulas com dentes foram submetidos a processamento histotécnico e hematoxilina-eosina. A análise microscópica descritiva das características da região apical e periapical foram realizadas, bem como a avaliação morfométrica das áreas das lesões periapicais em microscopia de fluorescência. O grupo I foi caracterizado por meio de reparação progressiva, com a presença das fibras, células e vasos sanguíneos. O grupo II apresentou ligamentos periodontais com presença de fibras colágenas e células inflamatórias residuais e o grupo III mostrou um infiltrado inflamatório denso, com extensas áreas edematosas e dissociação fibrilar, sugerindo uma condição inflamatória e reabsorção persistente. Com relação ao tamanho da lesão periapical, o grupo I apresentou lesões significativamente menores ($P < 0,05$) do que os grupos II e III, as quais não diferiram significativamente. Tratamento

endodôntico em duas sessões utilizando um curativo à base de Ca(OH)_2 foi associado com lesões periapicais significativamente menores aos 90 dias e caracterizada por reparação progressiva.

Albino Souza *et al.* (2017), avaliaram a eficácia dos protocolos de descontaminação final contra *E. faecalis* e sua influência na força de adesão do material obturador à dentina do canal radicular. 90 canais radiculares foram ampliados com o sistema ProTaper e inoculados com *E. faecalis* por 15 dias. 60 amostras foram divididas aleatoriamente em seis grupos (n = 10) e submetidas aos seguintes protocolos: G1-DW (controle); G2- CHX 2%; G3 – Qmix; G4 - 6,5% GSE; G5 - PDT com fibra óptica; G6 - PDT sem fibra óptica. A porcentagem de redução bacteriana foi verificada pela contagem de UFCs. As 30 amostras restantes foram submetidas aos mesmos protocolos de descontaminação (n = 5) e preenchidas com guta-percha e obturadas com o cimento AH Plus para realizar o teste de push-out. Os dados de ambos os testes foram submetidos a ANOVA seguido do procedimento post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). A maior redução bacteriana foi observada para CHX 2%, QMix e 6,5% de GSE, sem diferença estatisticamente significativa entre elas. A PDT com e sem fibra óptica, demonstrou uma redução significativamente maior do que a DW, sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0,05$). Para o teste push-out, os protocolos de descontaminação final mostraram valores de resistência de adesão similares ($p < 0,05$), com a maior incidência de falha coesiva em todos os grupos. Pode-se concluir que os protocolos de descontaminação final testados mostraram eficácia contra *E. faecalis* e não interferiram na força de adesão do material obturador à dentina do canal radicular.

Souza *et al.* (2017), avaliaram, *in vitro*, a influência da adição de CHX ao fotossensibilizador na atividade antimicrobiana da terapia fotodinâmica em canais radicais infectados por *E. faecalis*. Os canais radiculares de 50 dentes humanos extraídos foram ampliados até lima F3 do sistema Pro-Taper, autoclavados, inoculados com *E. faecalis* e incubados por 14 dias. As amostras foram divididas em cinco grupos (n = 10) de acordo com o protocolo de descontaminação: G1 (grupo controle) - nenhum procedimento foi realizado; G2-fotossensibilizador (0,01% de azul de metileno); G3- clorexidina gel 2%; G4-terapia fotodinâmica; G5- terapia fotodinâmica com fotossensibilizador modificado pela CHX. O teste microbiológico (contagem de UFC) foi realizado para avaliar a eficácia dos tratamentos propostos. Os dados foram submetidos a ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). O Grupo 3 mostrou a menor contaminação média (2,03 log₁₀ UFC/mL), sendo estatisticamente diferente de todos os demais grupos (p <0,05). Pode-se concluir que a adição de CHX ao fotossensibilizador não resultou em um melhor potencial de descontaminação da terapia fotodinâmica sozinha sobre os canais radicais infectados por *E. faecalis*.

7.5 Sistemas Reciprocantes

O sistema recíprocante (Reciproc) pode ser um recurso eficiente na redução bacteriana, atuando de forma semelhante ao sistema rotatório convencional, desde que a largura do preparo apical, o volume e o tempo de permanência da SQA sejam similares. Alves *et al.* (2012). O sistema

Reciproc apresentou a mesma eficácia em comparação aos sistemas rotatórios convencionais. Marinho *et al.* (2015)

Alves *et al.* (2012) avaliaram a redução bacteriana em canais radiculares através do sistema reciprocante Reciproc (instrumento R40), em comparação ao sistema rotatório convencional BioRaCe (instrumentos BR2 ao BR5). Para isso, os canais radiculares de 34 dentes extraídos foram contaminados com *E. faecalis*. Em ambos os protocolos a substância química auxiliar (SQA) foi NaOCl 2,5%, permanecendo por 11 minutos em contato com o canal. Os dados foram obtidos a partir das amostras bacteriológicas realizadas antes (S1) e após a instrumentação (S2), e a quantificação de bactérias foi realizada pelo método qPCR, e cultura. Os resultados mostraram que ambos os sistemas promoveram redução significativa de *E. faecalis*. A análise das amostras S2 não apresentou diferenças significativas entre os dois sistemas de instrumentação. Quanto aos métodos de quantificação, S1 apresentou contagens significativamente maiores de *E. Faecalis* e não houve diferença significativa entre os grupos para S2. Pode-se concluir que o sistema reciprocante (Reciproc) pode ser um recurso eficiente na redução bacteriana, atuando de forma semelhante ao sistema rotatório convencional (BioRaCe), desde que a largura do preparo apical, o volume e o tempo de permanência da SQA sejam similares.

Siqueira *et al.* (2013), avaliaram a capacidade de desinfecção de três protocolos na preparação de canais radiculares por análise computadorizada de microtomografia (μ CT). Os canais radiculares de molares inferiores extraídos foram contaminados com *E. faecalis* e divididos em três grupos de acordo com a técnica de instrumentação:

Self-Adjusting File (SAF), utilizando o instrumento WL (tamanho 25, conicidade 0,04mm); Reciproc, utilizando instrumento R25; e Twisted File, utilizando a sequência de instrumentos TF 25/0,08, 25/0,06, 25/0,04. A substância química auxiliar utilizada para todos os grupos foi NaOCl 2,5%. As amostras foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2), a quantificação bacteriana foi realizada por meio de cultura, e posteriormente, as raízes foram submetidas à análise de μ CT para avaliar a configuração anatômica dos canais. Os resultados mostraram que ambos os protocolos de instrumentação promoveram redução bacteriana altamente significativa. Quanto à quantificação das amostras não houve diferença significativa entre os grupos, e em relação à configuração anatômica, não se observou diferença estatística entre as técnicas em relação ao percentual médio de aumento de volume e da área de superfície dos canais antes e após a instrumentação. Pode-se concluir que os três sistemas de instrumentação apresentaram redução bacteriana semelhante.

Basmaci *et al.* (2013), avaliaram a eficácia de duas técnicas de instrumentação (Self-adjusting File - SAF e Reciproc) em comparação a um sistema rotatório convencional (ProTaper) na redução de *E. faecalis* em canais radiculares. Para o estudo, 81 pré-molares uniradiculares foram infectados com *E. Faecalis*. As amostras foram divididas aleatoriamente em nove grupos: G1A: solução salina estéril + Sistema SAF; G1B: NaOCl 5% + EDTA 15% + Sistema SAF; G1C: NaOCl 5% + ácido maleico 7% + Sistema SAF; G2A: solução salina estéril + Sistema Reciproc (R25); G2B: NaOCl 5% + EDTA 15% + Sistema Reciproc (R25); G2C: NaOCl 5% + ácido maleico 7% + Sistema Reciproc (R25); G3A: solução salina estéril + Sistema ProTaper; G3B:

NaOCl 5% + EDTA 15% + Sistema ProTaper; G3C: NaOCl 5% + ácido maleico 7% + Sistema ProTaper. Análise estatística obtida por ANOVA, e teste Dunn's post hoc para comparações múltiplas. Os resultados mostraram que todos os protocolos reduziram significativamente o número de células bacterianas. Entre os grupos, a redução bacteriana em números de registros foi menor no G1A, com redução de 29,47%, e maior no G3B, com redução de 70,3%. As comparações entre os grupos revelaram diferenças significativas entre o G1A e G1B (P=0,031); G1A e G2C (P=0,003); G2A e G3B (P=0,036); G3B e G1A (P<0,001); G3C e G1A (P=0,033). Pode-se concluir que não houve diferenças significativas em termos de redução de carga microbiana, entre os sistemas reciprocantes (SAF e Reciproc) e o sistema rotatório (ProTaper) em combinação com os agentes irrigantes.

Machado *et al.* (2013), avaliaram a influência da instrumentação com sistemas reciprocantes e sistemas rotatórios na redução bacteriana em canais radiculares infectados. Para o estudo, sessenta canais radiculares de molares superiores foram contaminados com *E. faecalis*. A amostra foi dividida em cinco grupos, de acordo com o sistema de instrumentação utilizados: Waveone, Reciproc, ProTaper, Mtwo e o sistema manual de instrumentação. As amostras bacterianas foram recolhidas imediatamente (S1), e sete dias após a instrumentação (S2). A análise estatística foi realizada pelo teste T, e ANOVA. Os resultados mostraram que após a instrumentação a contagem bacteriana foi significativamente reduzida em todos os grupos, não havendo diferença significativa entre a técnica de instrumentação com movimento reciprocante, rotatório e manual. No entanto, S2 apresentaram constagens bacterianas significativamente mais elevadas em comparação

com S1. Pode-se concluir que todos os sistemas reduziram as bactérias em nível semelhante.

Martinho *et al.* (2014), compararam a eficácia clínica da instrumentação com sistemas rotatórios e reciprocantes na remoção de endotoxinas e bactérias de canais radiculares infectados. Quarenta e oito pacientes com necessidade de tratamento endodôntico foram incluídos no estudo. A amostra foi dividida aleatoriamente em quatro grupos (n=12) de acordo com os sistemas testados: Waveone, Reciproc, ProTaper e Mtwo. As amostras bacteriológicas foram coletadas antes e após o preparo químico-mecânico, e a substância química auxiliar utilizada foi NaOCl 2,5%. Não foram encontradas diferenças nos valores percentuais médios de redução de endotoxinas alcançados com os sistemas reciprocantes (Waveone: 95,15%, Reciproc: 96,21%) e sistemas rotatórios (ProTaper: 97,98%, Mtwo: 96,34%), sendo $P < 0,05$. Ambos os sistemas foram eficazes na redução bacteriana (Waveone: 99,45%, Reciproc: 99,93%, ProTaper: 99,85% e Mtwo: 99,41%). A análise de cultura não revelou diferenças na redução de carga bacteriana. Pode-se concluir que ambos os sistemas apresentaram redução bacteriana e de endotoxinas de forma semelhante, mas não foram capazes de eliminá-las completamente.

Tinoco *et al.* (2014), avaliaram a extrusão apical bacteriana associada a dois sistemas reciprocantes (Waveone e Reciproc) em comparação com sistema rotatório convencional (BioRace). Foram utilizados quarenta e cinco incisivos inferiores humanos uniradiculares, na qual, foram preparados e contaminados com *E. faecalis*. As amostras foram divididas em três grupos (n=15): G1: Reciproc; G2: Waveone; G3: BioRace. Bactérias extruídas além do forame durante a

instrumentação foram coletadas em frascos contendo 0,9% de NaOCl, e, posteriormente, foram retiradas e incubadas em meio ágar por 24 horas. Foram contabilizadas as unidades formadoras de colônia (UFC) por ml, e os dados analisados pelo teste Kruskal-Wallis e teste H. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no número de UFC entre os dois sistemas reciprocantes. O sistema BioRace apresentou significativamente número mais elevado de UFC quando comparado aos sistemas Waveone e Reciproc. Todos os sistemas de instrumentação extruíram bactérias além do forame, no entanto, os sistemas reciprocantes, apresentaram menor valor de extrusão apical de bactérias em relação ao sistema rotatório.

Nakamura *et al.* (2015), avaliaram a eficácia da instrumentação com sistema reciprocante na desinfecção de canais radiculares. Quarenta e cinco pré-molares humanos extraídos foram infectados com *E. faecalis*, durante 28 dias. O grupo controle consistiu de cinco dentes não contaminados e não instrumentados. A substância utilizada no preparo químico-mecânico foi NaOCl 2,5%. A amostra foi dividida em três grupos experimentais (n=15): manual (Lima tipo K); rotatório (Mtwo); reciprocante (Reciproc, instrumento R50). As amostras bacteriológicas foram coletadas antes (S1) e após o preparo químico-mecânico (S2), também foram coletadas 0,02g de raspas de dentina dos terços radiculares para verificar a redução de microorganismos nos túbulos dentinários. Os resultados mostraram que ambas as técnicas de instrumentação reduziram o número de microorganismos no sistema de canais radiculares, mas não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos. O sistema Reciproc, embora consista em um único instrumento para realizar o preparo do canal radicular, em associação com

NaOCl 2,5% apresentou-se tão eficaz quanto a instrumentação rotatória (Sistema Mtwo) e instrumentação manual.

Marinho *et al.* (2015), avaliaram a eficácia do sistema Reciproc na remoção de bactérias e endotoxinas de canais radiculares em comparação aos sistemas rotatórios convencionais. Quarenta pré-molares inferiores humanos unirradiculares foram contaminados com *Escherichia coli* por 21 dias e distribuídos em quatro grupos (n=10): G1: Reciproc; G2: Mtwo; G3: ProTaper Universal; G4: FKG Race. As amostras bacteriológicas e de endotoxinas foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2), a cultura bacteriana determinou as unidades formadoras de colônia (UFC), e o ensaio de Limulus Amebocyte Lysate foi utilizado para quantificação de endotoxinas. Os resultados foram submetidos ao teste T e ANOVA. Em S2 todos os sistemas apresentaram redução altamente significativa de bactérias e endotoxinas, respectivamente: G1: 99,34% e 91,69%; G2: 99,86% e 83,11%; G3: 99,93% e 78,56%; G4: 99,99% e 82,52%. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os sistemas. Pode-se concluir que o sistema Reciproc apresentou a mesma eficácia em comparação aos sistemas rotatórios convencionais.

Teixeira *et al.* (2015), avaliaram a influência do movimento reciprocante (Sistema Reciproc) com diferentes comprimentos de trabalho (CT) e o tamanho da preparação apical sobre a extrusão apical bacteriana. Para o estudo, sessenta e oito pré-molares humanos unirradiculares, foram contaminados com *Enterococcus faecalis* e a amostra foi dividida em quatro grupos (n=15): G1: R25, CT 0 mm; G2: R40, CT 0 mm; G3: R25, CT -1mm; G4: R40, CT -1 mm. As bactérias extruídas do forame foram coletadas em frascos contendo 0,9% de

NaOCl. As amostras microbiológicas foram incubadas em meio ágar BHI por 24 horas. Foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml. Os dados foram analisados utilizando teste de Wilcoxon e Teste-H de Kruskal-Wallis. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no número de UFCs entre os grupos. Pode-se concluir que os diferentes comprimentos de trabalho e o tamanho da preparação apical não apresentaram efeito significativo sobre a extrusão bacteriana do forame quando utilizado o sistema reciprocante.

Martinho *et al.* (2015), compararam a eficácia dos sistemas reciprocantes e rotatórios na remoção de endotoxinas e bactérias no retratamento endodôntico. Para o estudo, trinta dentes tratados endodonticamente foram selecionados. A amostra foi dividida em três grupos (n=10) de acordo com o sistema utilizado: G1: Waveone; G2: Reciproc; G3: ProTaper Universal. A substância química auxiliar utilizada foi NaOCl 2,5%, e as amostras foram coletadas antes (S1) e após a instrumentação (S2). A cultura bacteriana determinou as unidades formadoras de colônia (UFC), e o ensaio de Limulus Amebocyte Lysate foi utilizado para quantificação de endotoxinas. Em S2, não foram encontradas diferenças nos valores percentuais médios de redução de endotoxinas entre os sistemas Waveone (94,11%), Reciproc (93,29%), ProTaper (94,98%). Os sistemas reciprocantes Reciproc e Waveone foram tão eficazes quanto o sistema rotatório ProTaper.

Neves *et al.* (2016), compararam a eficácia antibacteriana do sistema reciprocante (Reciproc) em comparação ao sistema rotatório (BioRaCe) em canais radiculares infectados. Foram selecionados sessenta pacientes com necessidade de tratamento endodôntico, cada paciente contribuiu com um dente para o estudo. A substância química

auxiliar utilizada foi NaOCl 2,5%. As amostras foram divididas em dois grupos, conforme os sistemas de instrumentação testados: G1: Reciproc e G2: BioRaCe. As amostras foram coletadas antes e após a instrumentação, e a quantificação das bactérias foi feita utilizando reação de cadeia polimerase. Todas as amostras iniciais apresentavam presença de bactérias, com números médios de G1: $7,1 \times 10^5$ (5) e G2: $1,31 \times 10^5$ (5). Após a instrumentação G1: 16 (55%) e G2: 15 (50%) de canais ainda apresentavam bactérias detectáveis com contagens medianas de $7,05 \times 10^2$ (2) e $6,03 \times 10^1$ (1), respectivamente. Ambos os sistemas foram altamente eficazes na redução das contagens totais de bactérias, não havendo diferenças significativas entre eles.

Souza *et al.* (2017), avaliaram e compararam a substantividade da CHX utilizando os sistemas manual, rotatório e recíprocante para o preparo do canal radicular. 45 dentes humanos uniradiculares foram utilizados para foram divididos em três grupos ($n = 15$) de acordo com a técnica de instrumentação utilizada: instrumentação manual (K-File), instrumentação rotatória (ProTaper) e instrumentação recíprocante (Reciproc R25). O gel de CHX (2%) foi utilizado como substância química auxiliar durante o preparo do canal radicular. Foram esculpidos sulcos longitudinais nas superfícies livres das raízes, fornecendo duas metades de cada raiz e resultando em 30 amostras por grupo. Cada grupo foi dividido aleatoriamente em três subgrupos ($n = 10$), e a substantividade foi avaliada após 48 h, 7 dias e 30 dias de incubação. A quantidade de CHX (em mg/mL) foi medida através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. A análise estatística foi realizada por análise de variância e teste de Tukey para comparações *post hoc* ($\alpha = 0,05$). O sistema manual não apresentou diferença significativa

estatística com a instrumentação rotatória ($P > 0,05$), mas a maior substantividade de CHX foi registrada em todos os períodos de observação em relação à instrumentação recíproca ($P < 0,05$). Os autores concluíram que a substantividade de CHX na dentina humana é mais baixa quando se utiliza o sistema recíproca quando comparado com a instrumentação manual e rotatória.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Este estudo teve como objetivos gerais:

3.1.1 Avaliar, *in vitro*, a influência da PDT no processo de descontaminação de canais radiculares preparados com baixas concentrações de soluções de NaOCl 1% e 2,5% e Ca(OCl)₂ 1% e 2,5% e sistema reciprocante.

3.2 Este estudo teve como objetivos específicos:

3.2.1 Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana da PDT associada ao NaOCl e Ca(OCl)₂ nas concentrações de 1% e 2,5%, em um modelo de canais radiculares infectados com *E. faecalis*, por meio da contagem de UFC.

3.2.2 Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana do NaOCl e Ca(OCl)₂ nas concentrações de 1% e 2,5% associada à instrumentação com sistema reciprocante Reciproc, sem a utilização da PDT em um modelo de canais radiculares infectados com *E. faecalis*, por meio da contagem de UFC.

3.3 As hipóteses testadas foram:

3.3.1 A PDT associada ao NaOCl e Ca(OCl)₂ nas concentrações de 1% e 2,5% é eficaz na descontaminação de canais radiculares infectados com *E. faecalis*.

3.3.2 Baixas concentrações de soluções de NaOCl e Ca(OCl)₂ associada à instrumentação reciprocante, é eficaz na descontaminação de canais radiculares infectados com *E. faecalis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sob o número de protocolo 2.195.955.

4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Obtenção e preparo das amostras

Cem dentes unirradiculares humanos extraídos (Figura 1A) foram obtidos através do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo. Os dentes foram congelados e armazenados até o início do experimento, no intuito de preservar as propriedades dos tecidos dentários.

A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária, de forma que o remanescente radicular apresentasse um comprimento de 15 mm (Figura 1B). Foi utilizado para o corte, um disco de diamante rotativo (KG Sorensen Dupla face modelo 1802.7015), acoplado na peça reta de baixa rotação, utilizando água para refrigeração (Figura 1C).

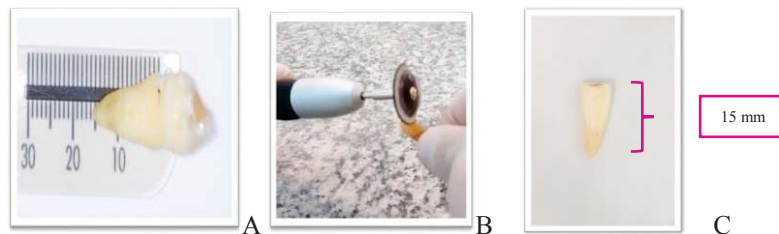


Figura 1 – Padronização das raízes. A – remanescente radicular, B – Seccionamento das coroas com disco diamantado dupla face, C – Remanescente radicular apresentando um comprimento de 15mm.

Todas as raízes foram ampliadas da mesma forma no intuito de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro do canal e criar, após a inoculação um ambiente adequado para o crescimento bacteriano. O comprimento de trabalho foi estabelecido por meio da introdução de uma lima tipo-K #10 no canal radicular até que sua ponta fosse visualizada no forame apical (Figura 2A). A partir desta medida foi reduzido 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo cervical foi realizado com broca Largo nº3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 2B) e a ampliação apical foi realizada manualmente com limas tipo-K, iniciando com a lima #15 (Figura 2C) e finalizando com a lima nº 45, sempre no comprimento de trabalho previamente determinado (Figura 2D). A substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação das raízes foi água destilada (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil) e, após a instrumentação, foi realizada uma lavagem final com 3 mL de EDTA 17% (Iodontosul, Porto Alegre, RS, Brasil), para a remoção de *smear layer* (Figura 2E).

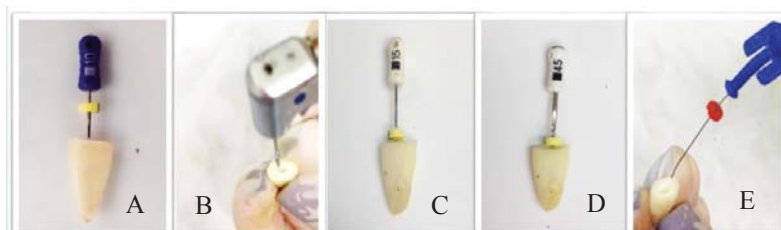


Figura 2 – Preparo das raízes. A – odontometria, B- preparo cervical realizado com broca Largo n° 3, C- ampliação apical com limas tipo-K, iniciando com a lima n° 15, D- finalizando com a lima n° 45, E- lavagem final com EDTA 17%.

Após a conclusão da padronização do diâmetro dos canais radiculares, foi realizado o vedamento do forame apical com resina fotopolimerizável Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil) (Figura 3A), formando um capuz com o material em torno do ápice da amostra, conforme a técnica de hibridização preconizada para confecção de restaurações, evitando assim, o extravasamento das substâncias testadas durante o experimento. A impermeabilização externa das raízes também foi realizada através de duas aplicações de adesivo a base de cianoacrilato (SuperBonder – Henkel, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 3B). Cada raiz foi fixada com silicona de condensação Putty-C para Impressão (Silon2APS - Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) em um microtubo plástico (Axygen Inc, Union City, CA, EUA), de modo que a porção cervical ficasse posicionada para cima (Figura 3C).

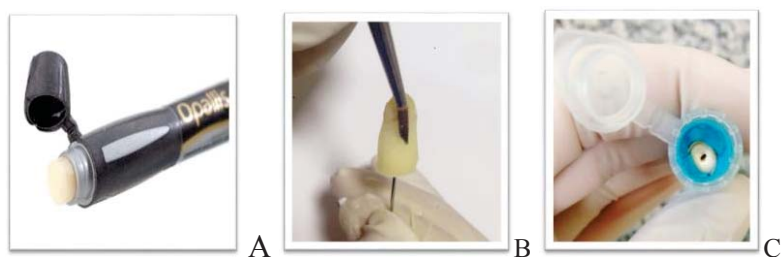


Figura 3 – Preparo das amostras. A- vedamento do foramen apical com resina fotopolimerizável, B – impermeabilização externa das raízes com adesivo a base de cianoacrilato, C – fixação com silicone de condensação em microtubo plástico.

As amostras foram alocadas em caixas de polipropileno (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unites) ((Figura 4) e esterilizadas à temperatura de 120 °C em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), por um período de 30 minutos.



Figura 4 – Disposição das amostras em caixa de polipropileno.

Controle de esterilização

Um dente foi selecionado aleatoriamente e submetido ao controle de esterilização. O dente selecionado foi preenchido com 2 mL de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 5A), e, após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #45 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi colocado em contato com as paredes do canal durante 30 segundos (Figura 5B). Em seguida, o cone de papel foi transportado individualmente para microtubos plásticos (Axygen Inc, Union City, CA, EUA) contendo 1 ml de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 5C). O material foi homogeneizado e semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) através da técnica da gota, sendo pingadas cinco gotas de 15 μ L (Figura 5D). A placa foi incubada a 37 °C durante 48h, a fim de verificar o crescimento bacteriano.

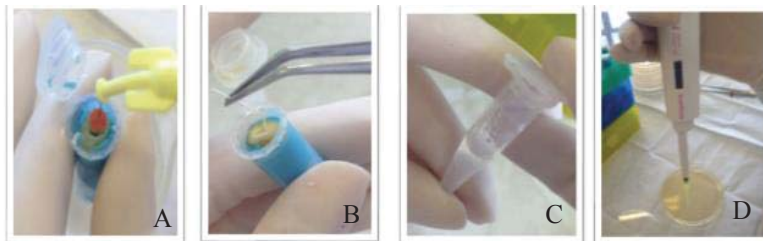


Figura 5 – Controle da esterilização. A- dente selecionado aleatoriamente e preenchido com solução salina, B- cone de papel estéril #45 colocado em contato com as paredes do canal, C- cone de papel foi transportado para microtubos plásticos contendo solução salina, D- semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA através da técnica da gota.

Preparo do inóculo

A estirpe de referência microbiana utilizada foi *E. faecalis* (ATCC 29212), obtida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo. As bactérias foram ativadas e cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24h a 37 °C em uma estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o grau de turbidez do inóculo foi ajustado de acordo com a escala 1,0 de McFarland, que corresponde a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml, referente a uma densidade ótica de 0,25 a 550 nm.

Contaminação dos canais radiculares

Uma alíquota de 100 µL do inóculo de *E. faecalis* contido no tubo de ensaio foi inserida no interior dos canais radiculares até o seu completo preenchimento, utilizando seringas descartáveis de 1 ml (Figura 6A). A cultura de *E. faecalis* foi mantida durante 15 dias, assim como nos estudos de Krause *et al.* (2007) e Rios *et al.* (2011), a fim de promover o crescimento de bactérias e a formação de biofilme, renovando o caldo BHI a cada 48h. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar (Figura 6B).

A cada 48h, uma amostra foi escolhida aleatoriamente para ser submetida ao controle microbiano, no intuito de verificar a ausência de contaminação por outras espécies microbianas, garantindo uma cultura pura de *E. faecalis*. Um cone de papel estéril com calibre #45 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi introduzido no canal radicular e mantido em

contato com as paredes do canal radicular, durante 30 segundos (Figura 6C). Em seguida, o cone foi transferido para um microtubo de plástico estéril contendo 1 mL de solução salina estéril, que foi homogeneizada em um agitador e, então, realizada a semeadura através da técnica das gotas, sendo pingadas cinco gotas de 15 μ L em placas de Petri contendo PCA (Figura 6D). A placa foi incubada a 37 °C durante 48h e, em seguida, foi realizada análise da morfologia das UFCs (Figura 6E), bem como análise de coloração de Gram, a fim de verificar a confirmação de contaminação somente por *E. faecalis*.

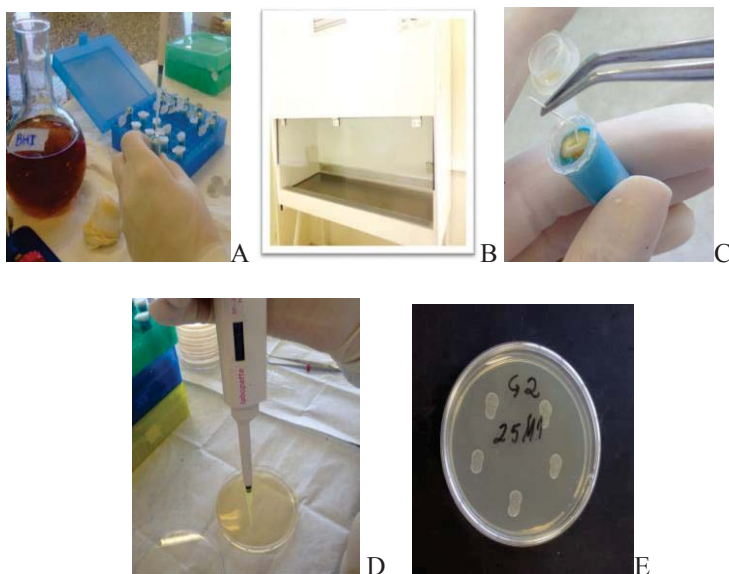


Figura 6 – Contaminação dos canais radiculares e controle de contaminação. A – contaminação dos canais radiculares, B - câmara de fluxo laminar, C – cone de papel em contato com as paredes do canal, D – cone de papel em 1ml de solução salina estéril, D – técnica de gotas, E – análise da morfologia.

Avaliação dos protocolos de descontaminação

Após o período de 15 dias de contaminação com *E. faecalis*, as 100 amostras foram divididas em grupos (n=10), de acordo com o protocolo de descontaminação testado (Tabela 1):

Grupo 1 (DW): os canais radiculares foram preenchidos com água destilada (Figura 8A) até o extravasamento e instrumentados com a lima R50 do sistema Reciprocante Reciproc (VDW, Munchen, Germany) (Figura 7A e 8B) no comprimento de trabalho. Depois da instrumentação, foi realizada irrigação final com 5 ml de água destilada e uma lavagem final com 3 ml de 17% de EDTA.

Grupo 2 (1% NaOCl): foram realizados os mesmos procedimentos descritos no grupo 1. No entanto, a substância química auxiliar foi substituída por NaOCl 1% (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) (Figura 8B).

Grupo 3 (2,5% NaOCl): foram realizados os mesmos procedimentos descritos no grupo 1. No entanto, a substância química auxiliar foi substituída por NaOCl 2,5% (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil).

Grupo 4 (1% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$): foram realizados os mesmos procedimentos descritos no grupo 1. No entanto, a substância química auxiliar foi substituída por $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 1%. A solução foi manipulada a partir de grânulos (R&D Laboratories Ltd, Antrim, Irlanda do Norte, Reino Unido) no momento do experimento. A concentração de 2,5% foi preparada utilizando água destilada (peso/volume [w/ v] ratio), misturando com um agitador magnético durante 10 minutos.

Grupo 5 (2,5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$): foram realizados os mesmos procedimentos descritos no grupo 4. No entanto, a substância química auxiliar foi substituída por $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 2,5%.

Grupo 6 (PDT): o canal radicular foi preenchido com azul de metileno 0,01% (Chimiolux – DMC, São Carlos, SP, Brazil) até o extravasamento, permanecendo em repouso por 5 minutos (tempo de pré-irradiação) (Figura 8C). Em seguida, uma fibra óptica intracanal esterilizada foi acoplada a um aparelho de *laser* de baixa intensidade (X-Therapy, DMC, São Carlos, SP, Brazil) (Figura 7B) sendo inserida 2 mm aquém do comprimento de trabalho. Os canais radiculares foram irradiados por 90 segundos, utilizando 100 mW de potência, 660-690 de comprimento de onda e 9J de dose, de acordo com instruções do fabricante (Figura 8D). Depois da PDT, foi realizada irrigação final com 5 ml de água destilada e uma lavagem final com 3 ml de 17% de EDTA (Figura 8E).

Grupo 7 (1% NaOCl + PDT): os canais radiculares foram preenchidos com NaOCl 1% (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) até o extravasamento, e instrumentados com a lima R50 do sistema Reciprocante Reciproc (VDW, Munchen, Germany) no comprimento de trabalho. Depois da instrumentação, foi realizada irrigação com 5 ml de água destilada e, em seguida, as amostras foram submetidas à PDT, conforme descrito no grupo 6. Depois da PDT, foi realizada irrigação final com 5 ml de água destilada e uma lavagem final com 3 ml de 17% de EDTA.

Grupo 8 (2,5% NaOCl + PDT): foram realizados os mesmos procedimentos descritos no grupo 7. No entanto, a substância química

auxiliar foi substituída por hipoclorito de sódio 2,5% (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil).

Grupo 9 (1% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ + PDT): foram realizados os mesmos procedimentos descritos no grupo 7. No entanto, a substância química auxiliar foi substituída por $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 1%.

Grupo 10 (2,5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ + PDT): foram realizados os mesmos procedimentos descritos no grupo 7. No entanto, a substância química auxiliar foi substituída por $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 2,5%.

Todas as soluções de NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ passaram pelo procedimento de titulometria, no intuito de confirmar a concentração desejada das mesmas.

Na instrumentação recíprocante, todos os canais radiculares foram preenchidos com a substância química auxiliar de cada grupo, após foi introduzida a lima recíprocante no interior do canal realizando movimentos de avanço e retrocesso até atingir o CT. Foi utilizada uma lima recíprocante do sistema Reciproc a cada 5 dentes. Totalizando 20 limas recíprocantes.

A tabela 1 fornece uma visão da distribuição dos grupos:

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o protocolo de descontaminação testado.

Grupo	Protocolo de descontaminação
1	DW
2	1% NaOCl
3	2,5% NaOCl
4	1% Ca(OCl) ₂
5	2,5% Ca(OCl) ₂
6	PDT
7	1% NaOCl + PDT
8	2,5% NaOCl + PDT
9	1% Ca(OCl) ₂ + PDT
10	2,5% Ca(OCl) ₂ + PDT

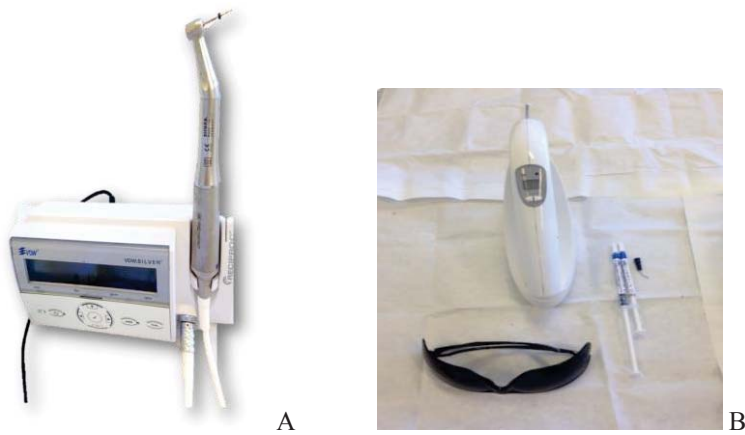


Figura 7 – A –sistema recíprocante Reciproc e lima R40, B – fibra óptica intracanal acoplada a um aparelho de laser de baixa intensidade e azul de Metileno 0,01%.

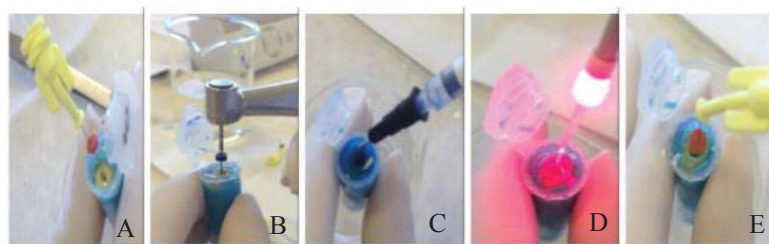


Figura 8 – *Protocolos de descontaminação. A – canais preenchidos com solução de soro fisiológico, B - instrumentação com a lima R40 do sistema reciprocante e irrigação com substância química auxiliar de cada grupo, C - canal preenchido com azul de metileno 0,01% por 5 min., D - PDT. E - irrigação final com 5 ml de água destilada e uma lavagem final com 3 ml de 17% de EDTA.*

Realização das coletas e análise microbiológica

A coleta do conteúdo microbiano do interior do canal radicular das amostras foi realizada em dois momentos. A primeira coleta (S1) foi realizada imediatamente após o período de contaminação das amostras e a segunda coleta (S2) foi realizada imediatamente após os protocolos de descontaminação.

As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma. O canal radicular foi preenchido com solução salina estéril e uma ponta de papel absorvente estéril calibre #50 foi introduzida no interior do canal radicular realizando movimentos circulares no intuito de encostar intencionalmente em todas as paredes do canal pelo período de 30 segundos. (Figura 9A) Depois disso, a ponta de papel absorvente foi

transferida para um microtubo contendo 1 ml de solução salina estéril (Figura 9B). O material foi homogeneizado e diluído até 10^{-3} . Aliquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas, no local correspondente da diluição utilizada (Figura 9C). As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C . Após o período de incubação, a contagem do número de UFCs foi realizada nas placas (Figura 9D e E).

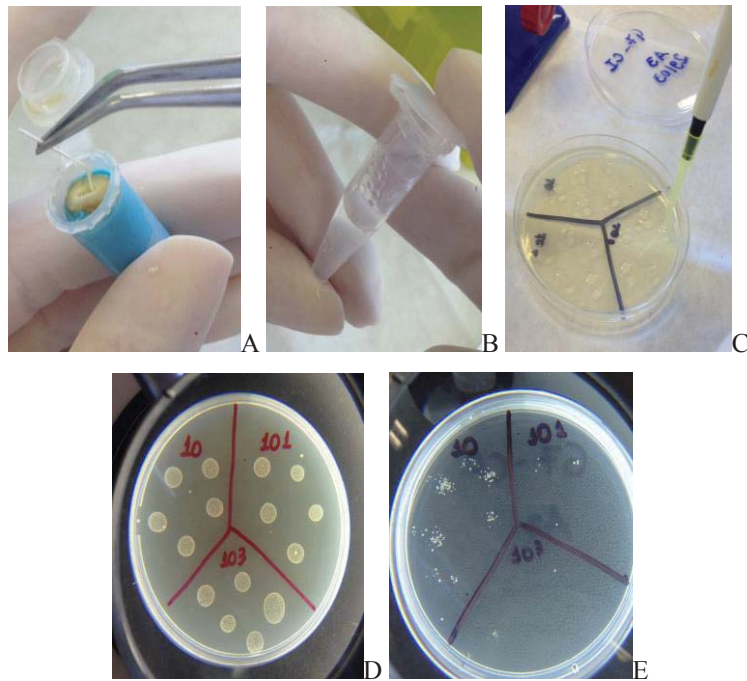


Figura 9 – Realização das coletas e análise microbiológica. A – Ponta de papel absorvente no interior do canal radicular, B- Homogeinização, C – técnica de gotas, D - E – placas com PCA após incubação.

Microscopia eletrônica de varredura

A MEV foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálises da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil). Após colhidas as amostras microbiológicas, duas raízes de cada grupo foram fixadas durante 7 dias em glutaraldeído 2% (Figura 10A) e lavadas três vezes durante 30 minutos em uma proporção de 0,2 M de tampão de fosfato de 1:1 e água destilada (Figura 10B). Após a desidratação, as raízes foram seccionadas longitudinalmente, proporcionando quatro metades por grupo. As amostras foram colocadas em bases metálicas (*stubs*) com a porção do canal radicular posicionada para cima e revestidas com ouro-paládio para a condução de elétrons (Figura 10C e D). A aquisição de imagens foi realizada por microscópio eletrônico de varredura (Philips XL 30, Eindhoven, Holanda), utilizando o recurso de retroespalhamento (BSE) (Figura 10E e F). Os registros de imagens foram feitos em 5000x nas paredes do canal radicular principal. O recurso de MEV foi usado apenas para ilustrar os resultados da análise microbiológica (Figura 10G).

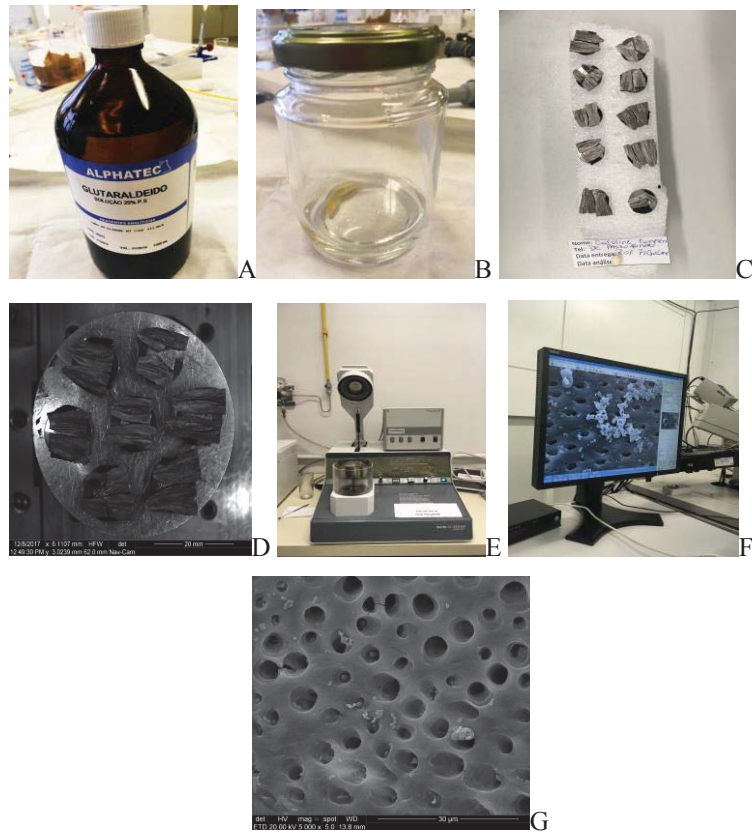


Figura 10 – MEV. A- B - duas raízes de cada grupo fixadas glutaraldeído 2% e lavadas três vezes durante 30 minutos em uma proporção de 0,2 M de tampão de fosfato de 1:1 e água destilada, C - D - amostras colocadas em bases metálicas (stubs) com a porção do canal radicular posicionada para cima e revestidas com ouro-paládio, E – F - microscópio eletrônico de varredura (Philips XL 30, Eindhoven, Holanda), G - imagens em 5000x nas paredes do canal radicular principal.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada calculando o percentual de redução de *E. faecalis* a partir da contagem inicial e final de unidades formadoras de colônias nos diferentes grupos de protocolos de descontaminação, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de redução} = 100 - [(\text{Valor final}/\text{Valor inicial}) \times 100].$$

ANOVA foi aplicado na avaliação microbiológica, seguido pelo teste complementar de Tukey, a 5% de nível de significância. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

A média e o desvio padrão da redução percentual de *E. faecalis* pelos procedimentos de descontaminação testados são apresentados na Tabela 2.

Nenhum grupo foi capaz de promover uma eliminação completa de *E. faecalis* a partir dos canais radiculares. A maior capacidade de promover a redução bacteriana foi observada nos grupos 7 (1% de NaOCl + R40 + PDT), 8 (2,5% de NaOCl + R40 + PDT), 9 (1% Ca [OCl]₂ + R40 + PDT) e 10 (2,5% Ca [OCl]₂ + R40 + PDT), sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0,05$). Além disso, o grupo 5 (2,5% de Ca [OCl]₂ + R40) apresentou maior redução bacteriana quando comparado com todos os grupos onde a PDT não foi realizada, com diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0,05$). Finalmente, o grupo 6 (PDT) foi incapaz de promover apenas uma redução bacteriana efetiva ($p < 0,05$).

A Figura 11 através da MEV mostra uma ilustração da eficácia dos procedimentos de descontaminação final, iniciando pelo G1 (A) até o G10 (J).

Tabela 2 - Média \pm desvio padrão da porcentagem de redução de *E. faecalis* (%) dos procedimentos de descontaminação testados.

Group	N	Bacterial reduction (%)
1. DW + R40	10	10.33 \pm 0.88 ^a
2. 1% <u>NaOCl</u> + R40	10	19.36 \pm 2.87 ^b
3. 2.5% <u>NaOCl</u> + R40	10	40.91 \pm 4.46 ^c
4. 1 % <u>Ca(OCl)₂</u> + R40	10	43.68 \pm 5.43 ^c
5. 2.5% <u>Ca(OCl)₂</u> + R40	10	88.97 \pm 6.57 ^d
6. PDT	10	45.96 \pm 5.01 ^c
7. 1% <u>NaOCl</u> + R40 + PDT	10	96.64 \pm 3.21 ^e
8. 2.5% <u>NaOCl</u> + R40 + PDT	10	98.14 \pm 2.47 ^e
9. 1% <u>Ca(OCl)₂</u> + R40 + PDT	10	99.52 \pm 0.98 ^e
10. 2.5% <u>Ca(OCl)₂</u> + R40 + PDT	10	99.79 \pm 0.70 ^e

* Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas no procedimento post hoc (teste de Tukey).

** DW = água destilada; R40 = lima Reciproc R40; NaOCl = hipoclorito de sódio; Ca(OCl)₂ = hipoclorito de cálcio; PDT = terapia fotodinâmica.

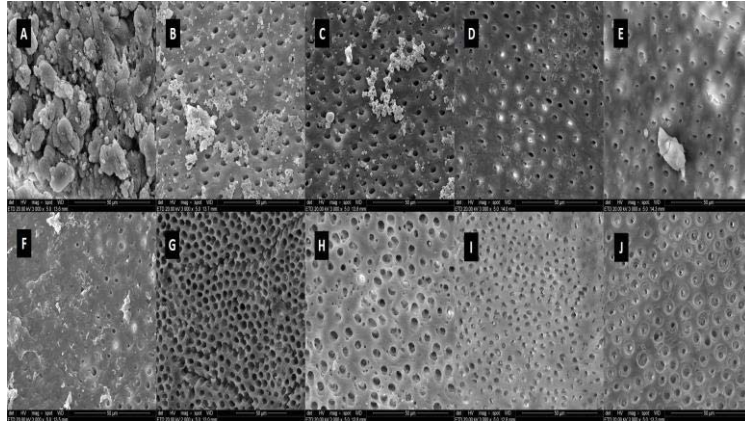


Figura 11 – MEV- eficácia dos procedimentos de descontaminação final, iniciando pelo G1 (A) até o G10 (J).

6. DISCUSSÃO

O modelo de crescimento bacteriano do presente estudo baseou-se em um estudo anterior que se concentrou em estratégias antimicrobianas usando soluções de hipoclorito de sódio e cálcio contra *E.faecalis* (de Almeida *et al.*, 2014). Este microorganismo foi escolhido devido à sua capacidade de penetrar nos túbulos dentinários (Ran *et al.*, 2015) e colonizar o sistema radicular em formato de biofilme (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013). No entanto, não há consenso na literatura sobre o tempo necessário para que este crescimento bacteriano ocorra para testar a eficácia dos protocolos de descontaminação, variando até 50 dias (Grundling *et al.*, 2011). De acordo com um estudo anterior, 14 dias é um período suficiente para a formação do biofilme de *E.faecalis* na dentina (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013). Por esse motivo, um período de cultura de 14 dias foi adotado no presente estudo, permitindo o crescimento bacteriano e garantindo que os protocolos de descontaminação possam ser adequadamente testados.

Hoje em dia, diferentes testes microbiológicos são utilizados para avaliar a descontaminação fornecida por protocolos químicos e mecânicos na terapia endodôntica. No presente estudo, foi utilizada a contagem de UFC para avaliar a eficácia das soluções de hipoclorito em diferentes concentrações associadas à instrumentação alternada em canais radicais infectados com *E.faecalis*. Este método foi escolhido com base em estudos anteriores (de Almeida *et al.*, 2014; Grundling *et al.*, 2011) e porque permite a quantificação bacteriana dos canais radiculares de forma aceitável (Peters *et al.*, 1995). No entanto, as amostras

microbiológicas foram coletadas somente do canal principal. Portanto, não foi possível avaliar a presença de *E.faecalis* na profundidade dos túbulos dentinários e a viabilidade deste microorganismo, conforme descrito em um estudo prévio em que essas variáveis foram medidas por microscopia confocal laser (Böttcher *et al.*, 2015).

De acordo com os resultados do presente estudo, nenhum dos protocolos de descontaminação foi capaz de promover a eliminação completa de *E.faecalis* a partir de canais radiculares. Esses achados estão de acordo com estudos prévios em que *E.faecalis* não foi completamente eliminada dos canais radiculares usando estratégias antimicrobianas para sua descontaminação (de Almeida *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2017). *E.faecalis* é um microorganismo anaeróbico facultativo que é altamente resistente às estratégias antimicrobianas e geralmente é encontrado em casos de falha na terapia endodôntica (Pinheiro *et al.*, 2003). Ele mostrou vários fatores de virulência e uma capacidade de persistir por longos períodos de tempo em ambientes com limitação de nutrientes e fome de sobrevivência (Figdor *et al.*, 2003). Essas características podem ajudar a explicar a sobrevivência de *E.faecalis* nos canais radiculares no presente estudo.

Os instrumentos rotatórios de níquel-titânio (NiTi) possuem flexibilidade superior em relação aos arquivos de aço inoxidável. Isso permite a manutenção da forma original do canal e a preparação rápida dos canais radiculares (Hwang *et al.*, 2014). No entanto, os arquivos NiTi ainda correm risco de fratura através de fadiga de flexão e tensões de torção (Sattapan *et al.*, 2000). Recentemente, o sistema de reciprocidade foi desenvolvido para reduzir a possibilidade de fraturas de arquivos inesperadas, facilitar a preparação e reduzir o tempo clínico

(Yared, 2008). No entanto, juntamente com a redução do tempo de instrumentação clínica, as soluções de hipoclorito tendem a manter contato com as paredes do canal radicular por um período mais curto. Isso pode reduzir a eficácia dessas substâncias químicas contra microorganismos durante a terapia endodôntica. Este fato foi observado no presente estudo, uma vez que o uso de instrumentação reciprocante associada a soluções de hipoclorito de sódio e cálcio em diferentes concentrações resultou em baixa efetividade quanto à redução de *E.faecalis* nos canais radiculares. Resultados semelhantes foram encontrados por Souza *et al.*, 2017, onde o uso de instrumentação alternada resultou na redução de propriedades antimicrobianas de substâncias auxiliares químicas. Portanto, o presente estudo sugere o uso de recursos antimicrobianos auxiliares quando a preparação do canal radicular é realizada por instrumentação alternativa.

A curta exposição a irrigants, como NaOCl, pode permitir a sobrevivência de *E.faecalis* em canais radiculares, uma vez que o tempo e a concentração desempenham um papel essencial na capacidade de um irrigante para eliminar microorganismos (Retamozo *et al.*, 2010; Abdullah *et al.*, 2005). Isto foi observado no presente estudo, onde o uso de soluções de NaOCl em associação com instrumentação alternativa sem PDT nos grupos 2 e 3 resultou em baixa efetividade da redução de *E.faecalis* nos canais radiculares. Além da atividade antimicrobiana limitada nestes casos, o NaOCl é citotóxico (Blattes *et al.*, 2017) e quimicamente instável (Leonardo *et al.*, 2016) e interfere na adesão do material restaurador à superfície dentinária (Santos *et al.*, 2006). Além disso, sabe-se que NaOCl promove uma modificação significativa da estrutura dentinária (John *et al.*, 2013) e a redução das propriedades

mecânicas da dentina, tais como resistência à flexão, resistência à tração e resistência à fratura (Cecchin *et al.*, 2017). Assim, esses fatores podem comprometer o sucesso da terapia endodôntica.

O uso de 2,5% de Ca(OCl)_2 em associação com instrumentação alternada sem PDT no grupo 5 resultou em uma redução significativa de *E.faecalis* nos canais radiculares. O Ca(OCl)_2 está disponível em grânulos e a liberação de duas moléculas de ácido hipocloroso ocorre quando esta substância é dissolvida em solução aquosa (de Almeida *et al.*, 2014). Portanto, uma maior quantidade de cloro é liberada quando comparada a NaOCl , onde apenas uma molécula de ácido hipocloroso é liberada. O ácido hipocloroso é o principal componente responsável pela atividade antimicrobiana das soluções de hipoclorito (de Almeida *et al.*, 2014). Pode ajudar a explicar a melhor atividade antimicrobiana de 2,5% de Ca(OCl)_2 contra *E.faecalis* no presente estudo, mesmo durante um curto período de exposição a este irrigante.

PDT é uma técnica não-invasiva que não induz ao dano nos tecidos adjacentes. Além disso, as complexidades anatômicas não são consideradas barreiras à penetração da fonte de luz no processo de descontaminação (Rios *et al.*, 2011). No entanto, não há consenso na literatura sobre um padrão para a aplicação desta modalidade terapêutica. Variáveis como fotosensibilizadores, tempos de pré-irradiação, comprimentos de onda, potência, dose e densidade de energia são mencionadas em vários estudos. O protocolo PDT do presente estudo baseou-se em um estudo anterior (Souza *et al.*, 2017), onde o potencial de descontaminação da TFD foi considerado elevado. No entanto, de acordo com os resultados do presente estudo, o uso de PDT sozinho (grupo 6) não resultou em uma redução significativa de *E.faecalis* a

partir de canais radiculares. Esses achados estão de acordo com estudos prévios, que também encontraram baixa efetividade da redução microbiana ao usar PDT sozinho (Rios *et al.*, 2011; Ghinzelli *et al.*, 2014). A ausência de um protocolo padronizado para o desempenho da PDT pode ser o motivo das diferentes conclusões na literatura.

De acordo com os resultados do presente estudo, o uso de PDT após a preparação quimiomecânica com soluções de hipoclorito e instrumentação reciprocante melhorou a atividade antimicrobiana contra *E.faecalis*. Esses achados confirmam a hipótese do presente estudo, uma vez que foi observada maior descontaminação nos grupos onde a TFD foi realizada. Estudos anteriores mostraram resultados semelhantes, revelando que a PDT tem potencial para neutralizar patógenos endodônticos quando associada a procedimentos convencionais de descontaminação (Rios *et al.*, 2011; Hecker *et al.*, 2013). Durante o PDT, a luz laser de baixa intensidade estimula o fotossensibilizador e reage com o oxigênio molecular. Os radicais livres e as espécies reativas ao oxigênio são liberados dessa interação, atuando sobre componentes da parede celular bacteriana através de reações de oxidação ou redução (Souza *et al.*, 2017). Este mecanismo de ação da PDT induz a morte de microorganismos, o que pode explicar os resultados do presente estudo. Assim, o presente estudo sugere o uso de PDT como procedimento antimicrobiano adjunto na terapia endodôntica.

A maior porcentagem média de redução de *E.faecalis* foi obtida nos grupos 9 e 10, onde os canais radiculares foram tratados com soluções de Ca(OCl)_2 em associação com instrumentação alternada e PDT. Além de uma atividade antimicrobiana efetiva, o Ca(OCl)_2 também possui capacidade para promover a dissolução do tecido (Dutta

& Saunders, 2012). Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos 7 (1% de NaOCl + R40 + PDT) e 8 (2,5% de NaOCl + R40 + PDT), as soluções de Ca(OCl)_2 apresentam algumas vantagens em relação às soluções de NaOCl. O Ca(OCl)_2 é uma solução não citotóxica (Blattes *et al.*, 2017), tende a ser quimicamente estável após o armazenamento (Leonardo *et al.*, 2016), e não afeta negativamente as propriedades mecânicas da dentina, como a resistência à flexão, a resistência à ruptura final e a resistência à fratura (Cecchin *et al.*, 2017). Por estes motivos, o presente estudo sugere o uso de Ca(OCl)_2 como solução irrigante quando os canais radiculares são preparados por técnica alternativa em associação com a PDT, a fim de promover um protocolo de descontaminação eficaz contra *E.faecalis*.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados da presente dissertação, é possível concluir que:

- o uso de soluções de NaOCl e $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ com instrumentação alternativa não forneceu um protocolo efetivo de descontaminação nos canais radicais infectados por *E.faecalis*.

- a associação de PDT com soluções de hipoclorito e instrumentação alternativa proporcionou um protocolo efetivo de descontaminação contra *E.faecalis*.

7. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M.N.G.Y.; GULABIVALA, K.; MOLES, D.; SPRATT, D. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod*, v. 31, n.1, p. 30–36, 2005.

ALBINO SOUZA, M.; DALLA LANA, D.L.; GABRIELLI, E.S.; RIBEIRO, M.B.; MIYAGAKI, D.C.; CECCHIN, D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 17, n. 1, p. 92–97, 2017.

ALVES, F.R.; RÔÇAS, I.N.; ALMEIDA, B.M.; NEVES, M.A.; ZOFFOLI, J.; SIQUEIRA, J.F. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J*, v. 45, n. 9, p. 871-877, 2012.

ARIAS-MOLIZ, M. T; ORDINOLA-ZAPATA, R; BACA, P; RUIZ-LINARES, M; GARCÍA, E; HUNGARO, M. A. D; MONTEIRO, B; FERRER-LUQUE, C. M. Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J*, v. 48, n. 12, p. 1188-1193, 2015.

BAUMGARTNER, J. C; JOHAL, S; MARSHALL, J. G. Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation. *J Endod*, v. 33, n. 1, p. 48-51, 2007.

BASMACI, F.; OZTAN, M.D.; KIYAN, M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. *Int Endod J*, v. 46, n. 9, p. 823-830, 2013.

BLATTES, G.B.F.; MESTIERI, L.B.; BÖTTCHER, D.E.; FOSSATI, A.C.M.; MONTAGNER, F.; GRECCA, F.S. Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study. *Arch Oral Biol*, v. 73, n.1, p. 34–39, 2017.

BORSATTO, M.C.; CORREA, A.A.M.; LUCISANO, M.P.; SILVA, R.A.B.; SILVA, P.F.W.; NELSON FILHO, P.; SILVA, B.L.A. One-session root canal treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): an in vivo study. *Int Endod J*, v. 49, n. 6, p. 511-518, 2016.

BÖTTCHER, D.E.; SEHNEM, N.T.; MONTAGNER, F.; FATTURI PAROLO, C.C.; GRECCA, F.S. Evaluation of the effect of *Enterococcus faecalis* biofilm on the 2% chlorhexidine substantivity: An in vitro study. *J Endod*, v. 41, n. 8, p. 1364–1370, 2015.

BUKHARY, S.; BALTO, H. Antibacterial efficacy of octenisept, alexidine, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*, v. 43, n. 4, p. 643-647, 2017.

CECCHIN, D.; GIARETTA, V.S.; CADORIN, B.G.; SOUZA, M.A.; VIDAL, C.M.P.; FARINA, A.P. Effect of synthetic and natural derived novel endodontic irrigant solutions on mechanical properties of human dentin. *J Mater Sci Mater Med*, 2017 [Epub ahead of print].

CHÁVEZ DE PAZ, L.E. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *J Endod*, v. 38, n. 3, p 318-23, 2012.

CHIVATXARANUKUL, P.; DASHPER, S.G.; MESSER, H.H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, v. 41, n. 10, p. 873-82, 2008.

CHREPA, V.; KOTSAKIS, G. A.; PAGONIS, T.C.; HARGREAVES, K.M. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *J Endod*, v. 40, n. 7, p. 891-898, 2014.

COGULU, D.; UZEL, A.; ONCAG, O.; ERONAT, C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 106, n. 3, p. 443-9, 2008.

D'AMATO-PALUMBO, S.; KAPLAN, A.A.; FEINN, R.S.; LALLA, R.V. Retrospective study of microorganisms associated with vascular access infections in hemodialysis patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, v. 115, n. 1, p. 56-61, 2013.

DAVIS, J. M; MAKI, J; BAHCALL, J. K. An in vitro comparison of the antimicrobial effects of various endodontic medicaments on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, v. 33, n. 05, p. 567-569, 2007.

DE ALMEIDA, A.P.; SOUZA, M.A.; MIYAGAKI, D.C.; DAL BELLO, Y.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *J Endod*, v. 40, n. 12, p. 1953-1957, 2014.

DE OLIVEIRA, R. R.; NOVAES Jr, A. B.; GARLET, G. P. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers MedSci*, v. 26, n. 3, p. 359-367, 2011.

DUTTA, A; SAUNDERS, WP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on soft-tissue dissolution. *J Endod*, v. 38, n. 10, p. 1395-1398, 2012.

DU, T.; WANG, Z.; SHEN, Y.; *et al.* Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod*, v. 40, n. 4, p. 509-514, 2014.

FARINA, A.P.; CECCHIN, D.; BARBIZAM, J.V.; CARLINI-JÚNIOR, B. Influence of endodontic irrigants on bond strength of a self-etching adhesive. *Aust Endod J*, v. 37, n. 1, p. 26-30, 2011.

FERREIRA, M.B.; CARLINI Jr, B.; GALAFASSI, D.; GOBBI, D.L.
Calcium hypochlorite as a dentin deproteinization agent: Microleakage, scanning electron microscopy and elemental analysis. *Microsc Res Tech*, v. 78, n. 8, p. 676-681, 2015.

FIGDOR, D.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Molec Oral Microb*, v. 18, n. 4, p. 234-239, 2003.

FIMPLE, J.L.; FONTANA, C.R.; FOSCHI, F.; RUGGIERO, K.; PAGONIS, T.C.; TANNER, A.C.R.; KENT, R.; DOUKAS, A.G.; STASHENKO, P.P.; SOUKOS, N.S. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. *J Endod*, v. 34, n. 6, p. 728-734, 2008.

FONSECA, M.B. et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg*, v. 26, n. 3, p. 209-213, 2008.

FOUAD, A.F.; ZERELLA, J.; BARRY, J.; SPÅNGBERG, L.S. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 99, n. 1, p. 112-8, 2005.

GANDHI, M; MATTHEWS, K, R. Efficacy of chlorine and calcinated calcium treatment of alfalfa eeds and sprouts to eliminate Salmonella. *International Journal of Food Microbiology*, v. 87, n. 3, p. 301-306, 2003.

GARCEZ, A.S.; NUÑES, S.C.; HAMBLIN, M.R.; RIBEIRO, M.S. Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy on Patients with Necrotic Pulp and Periapical Lesion. *J Endod*, v. 34, n. 2, p. 138-142, 2008.

GARCEZ, A.S.; NUÑES, S.C.; HAMBLIM, M.R.; SUZUKI, H.; RIBEIRO, M.S. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod*, v. 36, n. 9, p. 1463-1466, 2010.

GHINZELLI, G.C.; SOUZA, M.A.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P.; DE FIGUEIREDO, J.A. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis*--an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 11, n. 4, p. 472-478, 2014.

GOMES, B.P.; PINHEIRO, E.T.; SOUSA, E.L.; JACINTO, R.C.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; DE SOUZA-FILHO, F.J. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 102, n. 2, p. 247-253, 2006.

GOMES-FILHO, J.E.; SIVIERI-ARAÚJO, G.; SIPERT, C.R.; DA SILVA SANTOS, L.M.; DE AZEVEDO QUEIROZ, I.O.; MARTINS, C. *et al.* Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 13, n. 48, p. 97-100, 2016.

GÖRDÜYSUS, M.; KÜÇÜKKAYA, S.; BAYRAMGİL, N.P.; GÖRDÜYSUS, M.O. Evaluation of the effects of two novel irrigants on intraradicular dentine erosion, debris and smear layer removal. *Restor Dent Endod*, v. 40, n.3, p. 216-222, 2015.

GRUNDLING, G.L.; ZECHIN, J.G.; JARDIM, W.M. *et al.* Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*, v.37, n. 8, p. 1128-1133, 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M; MORGENTAL, R. D; FARIA-JUNIOR, N. B; BERBERT, F. L. C. V; TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial effectiveness of peracetic acid and conventional endodontic irrigants. *Braz Dent J*, v. 22, n. 4, p. 285-287, 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; DE FARIA-JÚNIOR, N.B.; DUARTE, M.A.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; GRAEFF, M.S.; TANOMARU-FILHO, M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod*, v. 39, n. 3, p. 346-50, 2013.

HWANG, Y.H.; BAE, K.S.; BAEK, S.H.; KUM, K.Y.; LEE, W.; SHON, W.J.; CHANG, S.W. Shaping ability of the conventional nickel-titanium and reciprocating nickel-titanium file systems: a comparative study using micro-computed tomography. *J Endod*, v. 40, n. 8, p. 1186–1189, 2014.

HECKER, S.; HILLER, K.A.; GALLER, K.M.; MADER, T.; SCHMALZ, G. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. *Int Endod J*, v. 46, n. 5, p. 449-457, 2013.

JOHN, C.; LÖST, C.; ELAYOUTI, A. Ultrasonic monitoring of the effect of sodium hypochlorite on the elasticity of dentine. *Int Endod J*, v. 46, n. 1, p. 477–482, 2013.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KRAUZE, T.A.; LIEWEHR, F.R.; HAHN, C.L. The antimicrobial effect of MTAD, sodium hypochlorite, doxycycline, and citric acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, v. 33, n. 1, p. 28-30, 2007.

LANG, M.M.; INGHAM, B. H.; INGHAM, S. C. Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating *Escherichia coli* O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting. *Int J of Food Microbiol*, v. 58, n. 1, p. 73-82, Mar, 2000.

LEONARDO, N.G.; CARLOTTO, I.B.; LUISI, S.B.; KOPPER, P.M.; GRECCA, F.S.; MONTAGNER, F. Calcium Hypochlorite Solutions: Evaluation of Surface Tension and Effect of Different Storage Conditions and Time Periods over pH and Available Chlorine Content. *J Endod*, v. 42, n. 4, p. 641-645, 2016.

MACHADO, N.E.; NABESHIMA, C.K.; LEONARDO, M.F.; REIS, F.A.; BRITTO, M.L.; CAI, S. Influence of reciprocating single-file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J*, v. 46, n.11, p. 1083-1087, 2013.

MARINHO, A.C.; MARTINHO, F.C.; GONÇALVES, L.M.; RABANG, H.R.; GOMES, B.P. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multife rotary systems? *Int Endod J*, v. 48, n. 6, p. 542-548, 2015.

MARINS, J.S.; SASSONE, L.M.; FIDEL, S.R.; RIBEIRO, D.A. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Braz Dent J*, v. 23, n. 5, p. 527-533, 2012.

MARTINHO, F.C.; GOMES, A.P.; FERNANDES, A.M.; FERREIRA, N.S.; ENDO, M.S.; FREITAS, L.F.; CAMÕES, I.C. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod*, v. 40, n. 5, p. 625-629, 2014.

MARTINHO, F.C.; FREITAS, L.F.; NASCIMENTO, G.G.; FERNANDES, A.M.; LEITE, F.R.; GOMES, A.P.; CAMÕES, I.C. Endodontic retreatment: clinical comparison of reciprocating systems versus rotary system in disinfecting root canals. *Clin Oral Investig*, v. 19, n. 6, p. 1411-1417, 2015.

MEIRE, M.A.; COENVE, T.; NELIS, H.J.; DE MOOR, R.J. Evaluation of Nd: YAG and Er: YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J*, v. 45, n. 5, p. 482-491, 2012.

MIRANDA, R.G.; SANTOS, E.B.; SOUTO, R.M.; GUSMAN, H.; COLOMBO, A.P. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*, v. 46, n. 6, p. 499-505, 2013.

MORGENTAL, R. D; SINGH, A.; SAPPAL, H; KOPPER, P. M. P; VIER-PELISSER, F. V; PETERS, O. A. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod*, v.39, n. 3, p. 406-410, 2013.

MURAD, C.F.; SASSONE, L.M.; FAVERI, M.; HIRATA, R.JR.; FIGUEIREDO, L.; FERES, M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod*, v. 40, n. 7, p. 899-906, 2014.

NAKAMURA, V.C.; CANDEIRO, G.T.; GAVINI, G. Ex vivo evaluation of three instrumentation techniques on *E. faecalis* biofilm within oval shaped root canals. *Braz Oral Res*, v. 29, n. 1, *In Press*, 2015.

NEVES, M.A.; PROVENZANO, J.C.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA Jr, J.F. Clinical Antibacterial Effectiveness of Root Canal Preparation with Reciprocating Single-instrument or Continuously Rotating Multi-instrument Systems. *J Endod*, v. 42, n. 1, p. 25-29, 2016.

OKINO, LA; SIQUEIRA, EL; SANTOS, M; BOMBANA, AC; FIGUEIREDO, JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*, v.37, n. 1, p. 38-41, 2004.

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

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; SOUSA, E. L.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PLOTINO, G.; PAMEIJER, C.; GRANDE, N.M.; SOMMA, F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. *J Endod*, v. 33, n. 2, p. 81-95, 2007.

RAN, S.; WANG, J.; JIANG, W.; ZHU, C.; LIANG, J. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions *ex vivo*. *Int Endod J*, v. 48, n. 4, p. 362-72, 2015.

RAYMOND, N.G.; SINGH F.; PAPAMANOU, D.A.; SONG, X.; PATEL, C.; HOLEWA, C.; PATEL, N.; KLEPAC-CERAJ, V.; FONTANA, C.R.; KENT, R.; PAGONIS, T.C.; STASHENKO, P.P.; SOUKOS, N.S. Endodontic photodynamic therapy *ex vivo*. *J Endod*, v. 37, n. 2, p. 217-222, 2012.

RETAMOZO, B; SHABAHANG, S; JOHNSON, N; APRECIO, R, M; TORABINEJAD, M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, v. 36, n. 3, p. 520-523, 2010.

RIOS, A.; HE, J.; GLICKMAN, G.N.; SPEARS, R.; SCHNEIDERMAN, E.D.; HONEYMAN, A.L. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod*, v. 37, n. 6, p. 856-859, 2011.

SANTOS, J.N.; CARRILHOMR, D.E.; GOES, M.F.; ZAIA, A.A.; GOMES, B.P.A.F.; SOUZA-FILHO, F.J. *et al.* Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. *J Endod*, v. 32, n. 11, p. 1088–1090, 2006.

SASSONE, L.M.; FIDEL, R.; FAVERI, M.; FIDEL, S.; FIGUEIREDO, L.; FERES, M. Microbiological evaluation of primary endodontic infections in teeth with and without sinus tract. *Int Endod J*, v. 41, n. 6, p. 508-15, 2008.

SATTAPAN, B.; NERVO, G.J.; PALAMARA, J.E.; MESSER, H.H. Defects in rotary nickel-titanium files after clinical use. *J Endod*, v. 26, n. 3, p. 161–165, 2000.

SENA, N. T.; GOMES, B. P.; VIANNA, M. E.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J*, v. 39, n. 11, p. 878-885, 2006.

SILVA, L.; FINER, Y.; FRIEDMAN, S.; BASRANI, B.; KISHEN, A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod*, v. 39, n. 2, p. 249-253, 2013.

SIQUEIRA, J.F.; ALVES, F.R.; VERSIANI, M.A.; RÔÇAS, I.N.; ALMEIDA, B.M.; NEVES, M.A.; SOUSA-NETO, M.D. Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. *J Endod*, v. 39, n. 8, p. 1044-1050, 2013.

SOARES, J.A.; JÚNIOR PIRES, D.R. Influence of sodium hypochlorite based irrigants on the susceptibility of intracanal microbiota to biomechanical preparation. *Braz Dent J*, v. 17, n. 4, p. 310-316, 2006

SOUZA, L.C.; BRITO, P.R.; ALVES, F.R.; MOREIRA, E.J.; SAMPAIO-FILHO, H.R.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA Jr, J.F. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, v. 36, n. 2, p. 292-296, 2010.

SOUZA, M.A.; MENON, C.Z.; NERY, L.F.; BERTOL, C.D.; ROSSATO-GRANDO, L.G.; CECCHIN, D. Effect of root canal preparation techniques on chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *Clin Oral Investig*, 2017 [Epub ahead of print].

SOUZA, M.A.; LIMA, G.; PAZINATTO B², BISCHOFF, K.F.; PALHANO, H.S.; CECCHIN, D. Evaluation of antimicrobial activity of association of chlorhexidine to photosensitizer used in photodynamic therapy in root canals infected by *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, v. 19, n. 1, p. 170-174, 2017.

STOJICIC, S.; SHEN, Y.; JOHSON, B.; HAAPASALO, M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J*, v. 45, n. 4, p. 363–371, 2012.

STOJICIC, S.; AMORIM, H.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *Int Endod J*, v. 46, n.7, p. 649-659, 2013.

TEIXEIRA, J.M.; CUNHA, F.M.; JESUS, R.O.; SILVA, E.J.; FIDEL, S.R.; SASSONE, L.M. Influence of working length and apical preparation size on apical bacterial extrusion during reciprocating instrumentation. *Int Endod J*, v. 48, n. 7, p. 648-653, 2015.

TENNERT, C.; FUHRMANN, M.; WITTMER, A.; KARYGIANNI, L.; ALTENBURGER, M.J.; PELZ, K.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*, v. 40, n. 5, p. 670-7, 2014.

TINOCO, J.M.; DE-DEUS, G.; TINOCO, E.M.; SAAVEDRA, F.; FIDEL, R.A.; SASSONE, L.M. Apical extrusion of bacteria when using reciprocating single-file and rotary multifile instrumentation systems. *Int Endod J*, v. 47, n. 6, p. 560-566, 2014.

VAUDT, J.; BITTER, K.; NEUMANN, K.; KIELBASSA, A.M. Ex vivo study on root canal instrumentation of two rotary nickel-titanium systems in comparison to stainless steel hand instruments. *Int Endod J*, v. 42, n. 1, p. 22–33, 2009.

VENGERFELDT, V.; ŠPILKA, K.; SAAG, M.; PREEM, J.K.; OOPKAUP, K.; TRUU, J.; MÄNDAR, R. Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing). *J Endod*, v. 40, n. 11, p. 1778-83, 2014.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WANG, Q; KNIEL, K.E. Effectiveness of calcium hypochlorite on viral and bacterial contamination of alfalfa seeds. *Foodborne Pathog Dis*, v. 11, n. 10, p. 759-768, 2014.

WANG, Z; SHEN, Y; HAAPSALO, M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod*, v. 38, n. 10, p. 1376-9, 2012.

WHITTAKER, H.A.; MOHLER, B.M. The sterilization of milk bottles with calcium hypochlorite. *Am J Public Health (NY)*, v. 2, n. 1, p. 282–287, 1912.

WONG, D. T. S; CHEUNG, G. S. P. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. *J Endod*, v. 40, n. 6, p. 825-829, 2014.

YARED, G. Canal preparation using only one Ni-Ti rotary instrument: Preliminary observations. *Int Endod J*, v. 41, n. 4, p. 339–344, 2008.

ZHU, X.; WANG, Q.; ZHANG, C.; CHEUNG, G.S.; SHEN, Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *J Endod*, v. 36, n. 12, p. 1950-5, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA TERAPIA FOTODINÂMICA NO PROCESSO DE DESCONTAMINAÇÃO DE CANAIS RADICULARES PREPARADOS COM BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO E SISTEMA RECÍPROCANTE -ESTUDO IN VITRO

Pesquisador: Caroline Tumelero Dias

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70739317.9.0000.5342

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.195.955

Apresentação do Projeto:

O projeto foi apresentado na íntegra para apreciação do CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, in vitro, a influência da terapia fotodinâmica (PDT) no processo de descontaminação de canais radiculares preparados com baixas concentrações de soluções de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) e Hipoclorito de Cálcio (Ca(OCl)₂) e sistema recíprocante.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos, pois serão utilizados dentes extraídos do banco de dentes

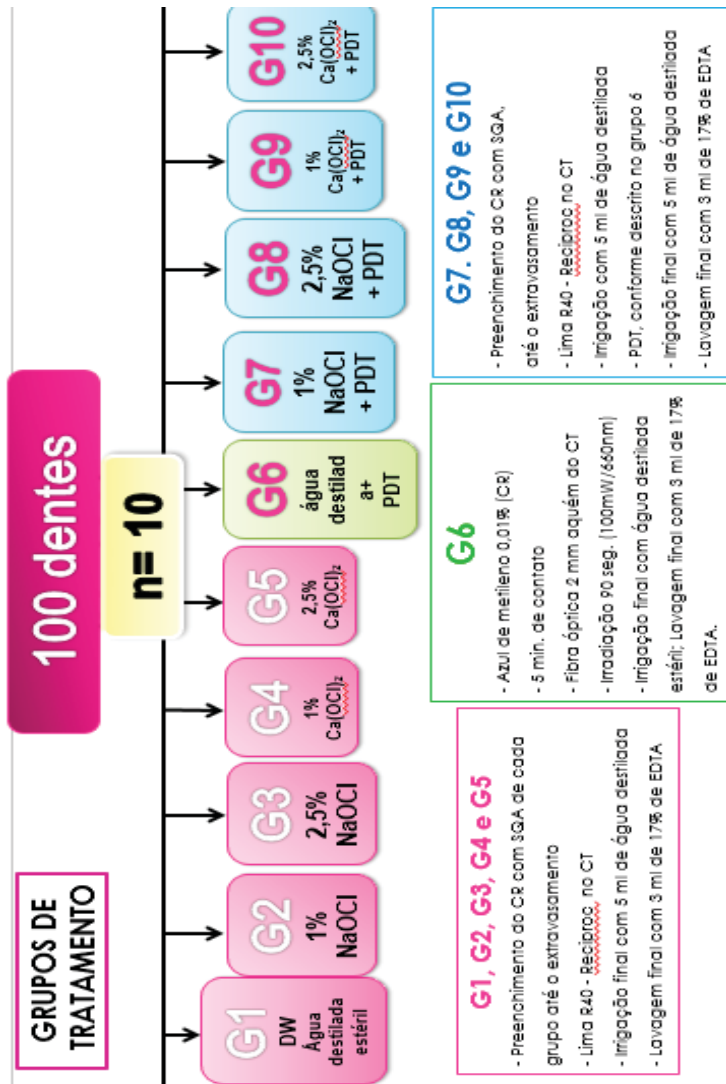
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa não apresenta conflitos éticos.

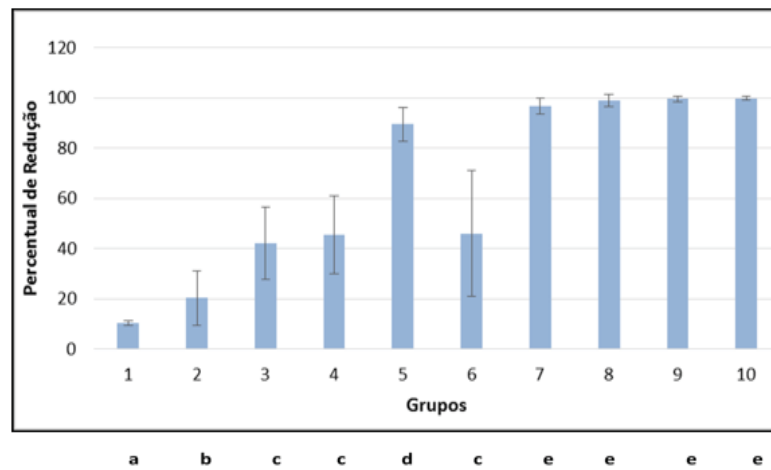
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do (a)

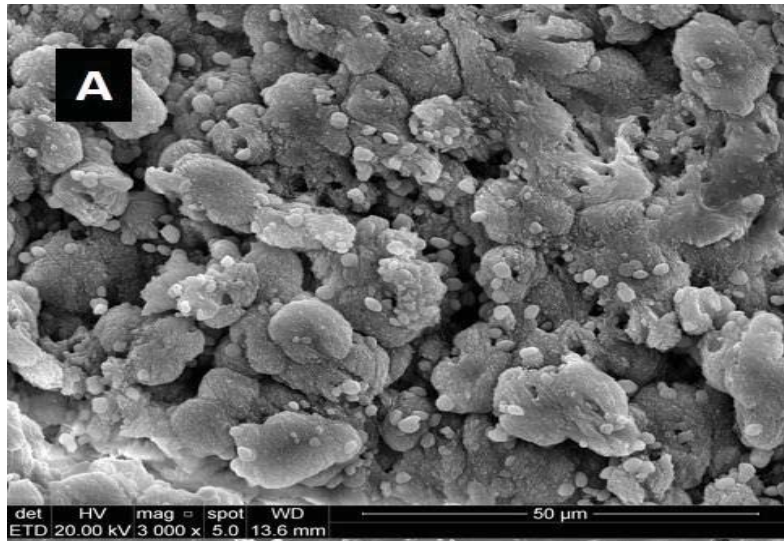
ANEXO 2 – Divisão dos grupos



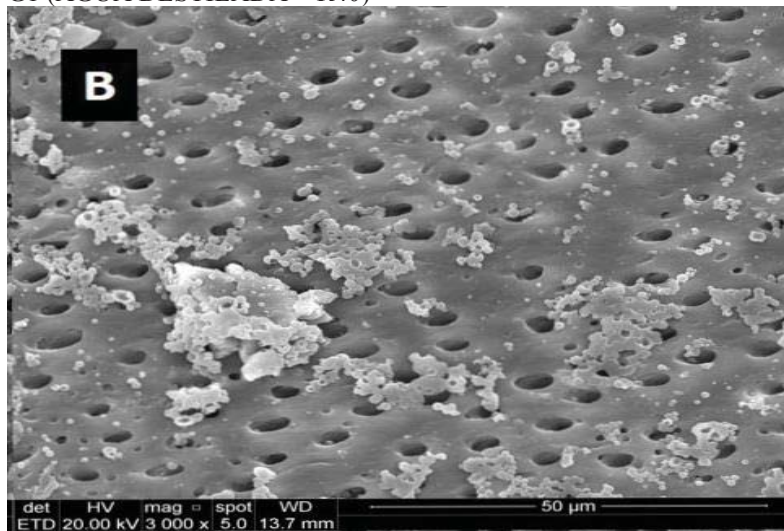
ANEXO 3 - Médias do percentual de redução de *E. faecalis* dos diferentes protocolos de descontaminação. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0.05$).



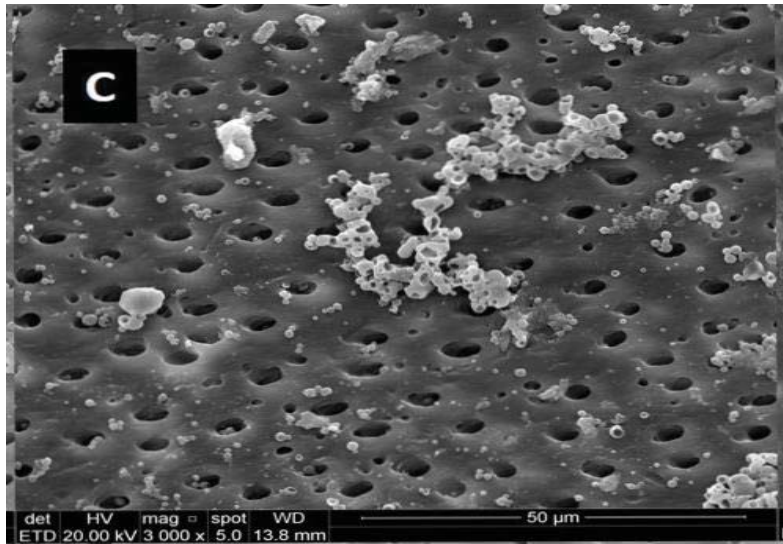
ANEXO 4 – MEV - imagens que ilustram a eficácia dos procedimentos de descontaminação



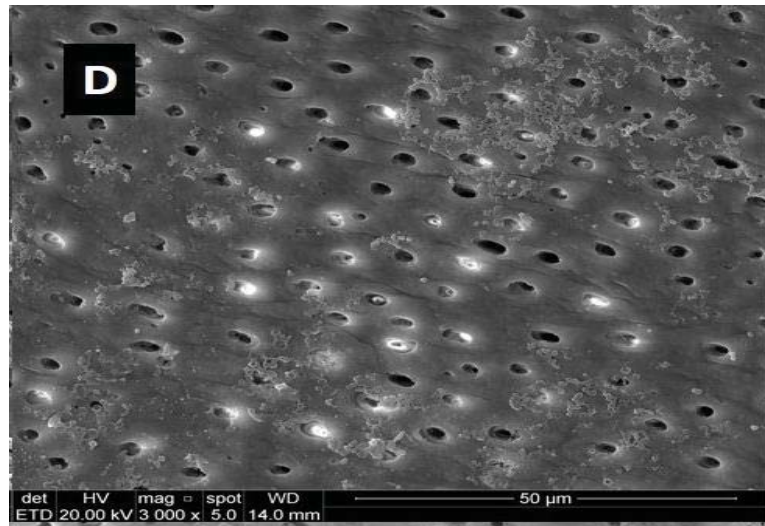
G1 (ÁGUA DESTILADA + R40)



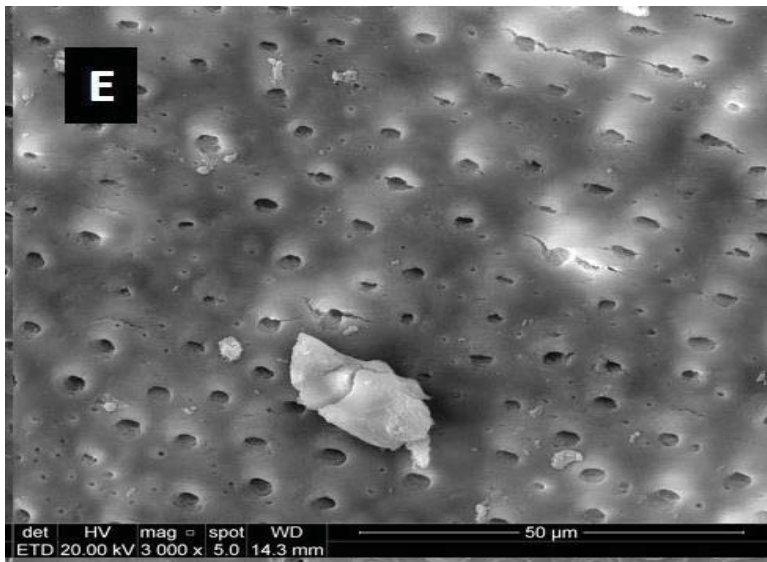
G2 (1% de NaOCl + R40)



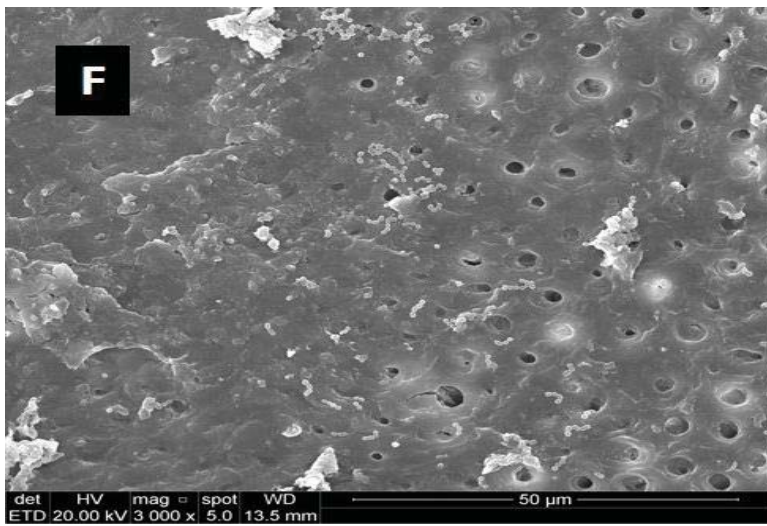
G3 (2,5% de NaOCl + R40)



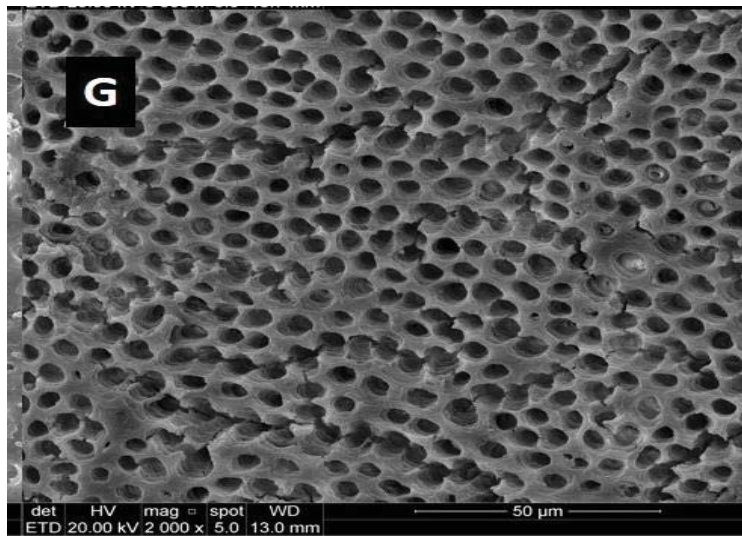
G4 (1% Ca [OCl]₂ + R40)



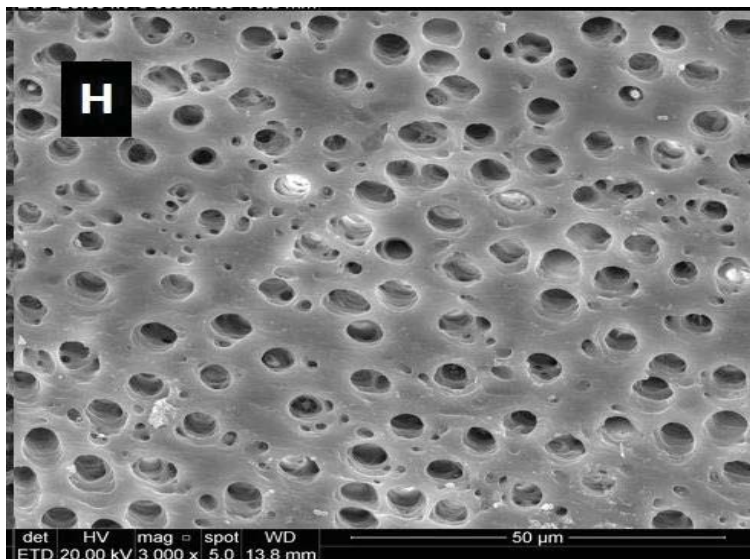
G5 (2,5% Ca [OCl]₂ + R40)



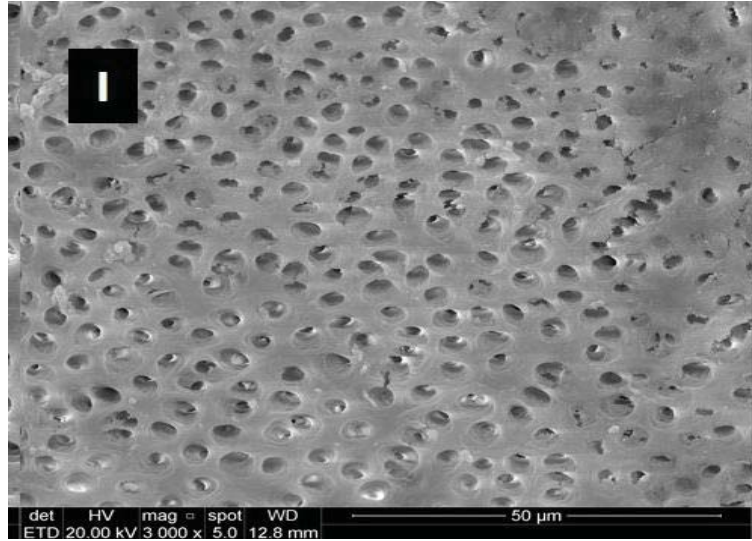
G6 (PDT)



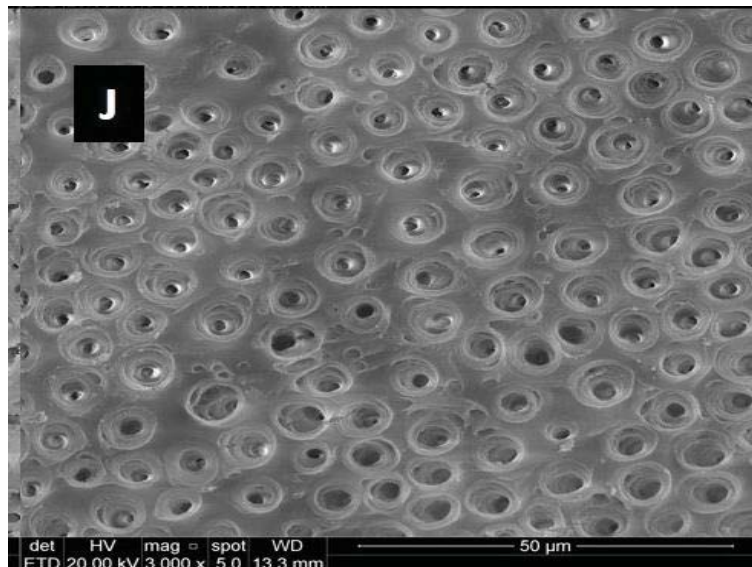
G7 (1% de NaOCl + R40 + PDT)



(2,5% de NaOCl + R40 + PDT)



G9 (1% Ca[OCl]₂+ R40 + PDT)



G10 (2,5% Ca [OCl]₂ + R40 + PDT)

ANEXO 3 – Comprovante de submissão do artigo

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of
Endodontics
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis*

Article Type: Clinical Research

Keywords: calcium hypochlorite, *Enterococcus faecalis*, photodynamic therapy, sodium hypochlorite.

Corresponding Author: Dr. Matheus Souza, PhD

Corresponding Author's Institution: School of Dentistry of University of Passo Fundo

First Author: Caroline T Dias

Order of Authors: Caroline T Dias; Julia Zandoná; Huriel S Palhano; Charise D Bertol; Luciana G Rossato-Grando; Douglas Cecchin; José Antônio P Figueiredo; Matheus Souza, PhD

Manuscript Region of Origin: Latin & South America

Abstract: Introduction: The main goal of endodontic therapy is to perform adequate shaping and cleaning by using instruments and antibacterial protocols. Thus, the aim of this study is to evaluate the antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy (PDT). Methods: One hundred and twenty root canals were enlarged up to #35 K-file and inoculated with *E. faecalis* for 14 days. One hundred samples were randomly divided into ten groups (n = 10) and subjected to the following protocols: G1-distilled water + Reciproc R40 (control), G2-1% sodium hypochlorite (NaOCl) + Reciproc R40, G3-2.5% NaOCl + Reciproc R40; G4-1% calcium hypochlorite (Ca(OCl)₂) + Reciproc R40, G5-2.5% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40; G6-PDT; G7-1% NaOCl + Reciproc R40 + PDT, G8-2.5% NaOCl + Reciproc R40 + PDT; G9-1% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT, G10-2.5% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT. The percentage bacterial reduction was checked by counting the colony-forming units (CFUs). The remaining 20 samples were subjected to the same decontamination protocols (n = 2) and submitted to scanning electronic microscopy (SEM) to illustrate the effectiveness of the proposed treatments. Data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($\alpha = 0.05$). Results: The greatest ability to promote bacterial reduction was observed in groups 7 (1% NaOCl + R40 + PDT), 8 (2.5% NaOCl + R40 + PDT), 9 (1% Ca(OCl)₂ + R40 + PDT), and 10 (2.5% Ca(OCl)₂ + R40 + PDT), with no significant difference between them (p < 0.05). Conclusions: The association of PDT with hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation provides effective elimination of *E. faecalis*.

ANEXO 4 – E-mail de submissão do artigo



ANEXO 5 – Artigo

Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis*

Caroline Tumelero Dias¹, Julia Zandoná¹, Huriel Scartazzini Palhano¹, Charise Dallazem Bertol², Luciana Grazziotin Rossato-Grando², Douglas Cecchin¹, José Antônio Poli de Figueiredo³, Matheus Albino Souza¹

¹ School of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

² School of Pharmacy, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil

³ School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

** The authors have no conflicts of interest to declare.

** We have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements, or honoraria) or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years.

Address to correspondence: Matheus Albino Souza. Post-Graduate Program in Dentistry. University of Passo Fundo. BR 285/São José, Building A7, suite 2. Zip code: 99052-900. Passo Fundo-RS-Brazil. Telephone: +55 54 3316-8402 E-mail: matheus292@yahoo.com.br/matheussouza@upf.br

ABSTRACT

Introduction: The main goal of endodontic therapy is to perform adequate shaping and cleaning by using instruments and antibacterial protocols. Thus, the aim of this study is to evaluate the antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy (PDT). **Methods:** One hundred and twenty root canals were enlarged up to #35 K-file and inoculated with *E. faecalis* for 14 days. One hundred samples were randomly divided into ten groups (n = 10) and subjected to the following protocols: G1-distilled water + Reciproc R40 (control), G2-1% sodium hypochlorite (NaOCl) + Reciproc R40, G3-2.5% NaOCl + Reciproc R40; G4-1% calcium hypochlorite (Ca[OCl]₂) + Reciproc R40, G5-2.5% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40; G6-PDT; G7-1% NaOCl + Reciproc R40 + PDT, G8-2.5% NaOCl + Reciproc R40 + PDT; G9-1% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT, G10-2.5% Ca(OCl)₂ + Reciproc R40 + PDT. The percentage bacterial reduction was checked by counting the colony-forming units (CFUs). The remaining 20 samples were subjected to the same decontamination protocols (n = 2) and submitted to scanning electronic microscopy (SEM) to illustrate the effectiveness of the proposed treatments. Data were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test ($\alpha = 0.05$). **Results:** The greatest ability to promote bacterial reduction was observed in groups 7 (1% NaOCl + R40 + PDT), 8 (2.5% NaOCl + R40 + PDT), 9 (1% Ca[OCl]₂ + R40 + PDT), and 10 (2.5% Ca[OCl]₂ + R40 + PDT), with no significant difference between them ($p < 0.05$). **Conclusions:** The association of PDT with

hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation provides effective elimination of *E. faecalis*.

Key words: calcium hypochlorite, *Enterococcus faecalis*, photodynamic therapy, sodium hypochlorite.

INTRODUCTION

The presence of microorganisms is the most prevalent cause of pulp and periapical pathologies (1). Thus, the use of irrigant solutions and instrumentation is necessary to promote adequate cleaning, creating conditions to allow successful endodontic therapy. Sodium hypochlorite (NaOCl) is the most commonly used irrigant solution in endodontics, presenting broad-spectrum antimicrobial activity, among other properties (2). However, high concentration and long exposure to NaOCl are needed for the elimination of persistent bacteria (3). In addition, NaOCl presents cytotoxic potential, inducing high levels of inflammatory response, even when used in low concentration (4). In view of its limitations, new alternative resources have been researched in endodontics in order to aid the decontamination of the root canal system.

Calcium hypochlorite ($\text{Ca}[\text{OCl}]_2$) is an alkaline white powder that was initially used for water treatment and industrial sterilization (5). Nowadays, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ has been researched in endodontics, showing antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (6) and biocompatibility (4). In the other hand, the use of a single file in the reciprocating instrumentation has demonstrated a considerable reduction

in the time required to perform the instrumentation (7). However, it is known that some areas of the main root canal are not touched by endodontic instruments (8). At the same time, there is less contact time between the irrigant solution and the root canal walls when using this technique, which can compromise some antimicrobial properties of these substances, even with a greater agility in the instrumentation (9).

Due to complex anatomy, some resources are necessary to provide a complement for the decontamination process. Photodynamic therapy (PDT) is an effective support for conventional chemomechanical preparation. This therapeutic modality involves a light source generated by a low-power laser and a non-toxic photosensitizer, showing ability to neutralize endodontic pathogens by the formation of reactive oxygen species (10). Moreover, PDT induces insignificant levels of cytotoxicity (11). However, there are no studies in the literature relating the use of Ca(OCl)_2 and reciprocating instrumentation associated with PDT in order to evaluate its effectiveness in the decontamination of root canals infected by *E.faecalis*.

Thus, the aim of present study is to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with PDT in root canals infected with *E.faecalis*. We tested the hypothesis that the association of PDT with hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation provides a greater decontamination of *E.faecalis*.

MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Ethics Commission of the University of Passo Fundo (Passo Fundo, RS, Brazil) (protocol 2.195.955).

Sample collection and preparation

One hundred and twenty single-rooted extracted human teeth were used in the present study. All teeth were obtained from the biobank of the School of Dentistry of the University of Passo Fundo (Passo Fundo, RS, Brazil). Dental crowns were sectioned with a rotary diamond disc (#911H, Brasseler, Savannah, GA, United States) so that all roots retained a length of 15 mm.

All roots were prepared using the same protocol in order to remove pulp tissue and to standardize the canal diameter. The cervical third was prepared using a Largo drill #2 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). The working length was established by introducing a K-file #10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the canal until its tip was visualized at the apical foramen. From this measure, 1 mm was subtracted to obtain the working length. The roots were enlarged at the working length using manual K-files (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and serial instrumentation, following the sequence #15, #20, #25, #30, and #35. Distilled water (DW) (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) was used as irrigant solution and renewed at each change of instrument. After standardization with manual files, the root canals were filled with EDTA 17% (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil), which remained in the root canals for 1 minute to smear layer removal. Final irrigation with 5 mL of DW (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) was performed and the root canals were dried

with suction cannula and absorbent paper points (Tanari, Manacapuru, AM, Brazil).

Culture and inoculum preparation

The 120 roots were fixed with Putty-C Silicone for Impression (Silon2APS, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brazil) in plastic micro-tubes (Axygen Inc, Union City, CA, USA), so that they remained upright with the cervical portion facing upwards. The roots were randomly divided into ten groups (n=12) and each group was placed in a polypropylene box (Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, United States). The roots were sterilized at 120 °C in an autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) for 30 minutes.

The reference strain was *E.faecalis* (ATCC 19433). The bacteria were cultivated in brain-heart infusion (BHI) broth for 18 to 24 h at 37 °C in a bacteriological incubator. A 100-µL aliquot of the culture of *E.faecalis* was inoculated into the root canal of each sample. The remaining volume of the root canal was filled with sterile BHI. The culture of *E.faecalis* was maintained for 14 days in order to promote bacterial growth, replacing the BHI every 48 hours. All procedures were performed under aseptic conditions in a laminar flow hood.

Classification of treatment groups

After the contamination, the 120 samples were irrigated with 5 mL of DW and randomly distributed into ten groups (n=12) according to the decontamination procedures, as showed in Table 1.

The NaOCl and Ca(OCl)₂ solutions were prepared and titrated in the Chemistry Laboratory of the School of Pharmacy of the University of Passo Fundo (Passo Fundo, RS, Brazil).

All groups except for group 5 were prepared by reciprocating technique of instrumentation. The Reciproc R40 file (tip size 40, taper 0.06) (Dentsply Sirona Endodontics, Tulsa, OK, USA) was inserted into the cervical third with an in-and-out pecking motion with low amplitude. After three in-and-out movements, when more pressure was needed to make the instrument advance further into the canal, the file was removed to clean the flutes. Then, the file was reused in the same manner along the middle third, followed by irrigation. This protocol was repeated until the Reciproc R40 file reached the working length. Lastly, the file was inserted up to the full extension of the root canal with a brushing motion against the lateral walls of the root canal. The Reciproc R40 file was activated in a reciprocating movement by a VDW-Silver electric engine (Dentsply Sirona Endodontics, Tulsa, OK, EUA) as recommended by the manufacturer.

Regarding the irrigation regimen, the root canals were filled with tested irrigant solution until extravasation using a 5-mL syringe with a 19-G needle before progression in each third in the reciprocating instrumentation. After the progression, irrigation with 5.0 mL of tested irrigant solution was performed with a 5-mL syringe and a 19-G needle and the tested irrigant solution was renewed in the root canal.

In group 5, only PDT was performed. In groups 6 to 10, PDT was performed after chemomechanical preparation. The root canals were filled with 0.01% (0.1 mg/mL) methylene blue (Chimio Lux DMC, São Carlos, SP, Brazil) until extravasation to the root canal entrance. Then,

the substance remained in the root canal for 5 min (pre-irradiation time). After that, a low-intensity laser (Therapy XT® DMC, São Carlos, SP, Brazil) was used, with 100 mW of power and continuous emission in the red part of the spectrum (660–690 nm wavelength), using an intra-canal fibre with a diameter of 600 µm attached 3 mm short to the working length. The root canals were irradiated for 90s, delivering a total dose of 9J and energy density of 320 J/cm², while the intra-canal fibre remained in a static position, as recommended by the manufacturer. After PDT, the root canals were irrigated with 5 mL of DW.

After the decontamination procedures, all root canals were filled with EDTA 17% (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil), remaining in the root canals for 1 minute for smear layer removal. Final irrigation with 5 mL of DW (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) was performed and the root canals were dried with suction cannula and absorbent paper points (Tanari, Manacapuru, AM, Brazil).

Microbiological analysis

After the decontamination procedures, 10 samples were used for microbiological analysis, while the remaining two samples of each group were used for scanning electronic microscopy (SEM).

The microbiological analysis was performed in two stages. The sample collected immediately after contamination with *E.faecalis* and before the decontamination protocols was called the initial sample (S1), while the sample collected after the decontamination procedures was called the final sample (S2).

The root canal of each sample was filled with sterile saline solution in both stages. Then, a sterile K-file #40 (Dentsply-Maillefer) was inserted into the root canal, promoting agitation of the solution and contact with the root canal walls for 30 seconds. A #40 sterile absorbent paper point was inserted into the root canal space and agitated in a circumferential way with intentional contact with the walls for 30 seconds. Then, the absorbent paper point was transferred to a tube containing 450 μL of sterile saline solution at 0.85%. The material was homogenized and diluted to 10^{-3} . Aliquots of 100 μL of solution and each of the dilutions were cultivated on the surface of blood agar in duplicate; these samples were incubated for 18–24 h at 37 °C. After the incubation period, the number of colony-forming units (CFUs) was counted on the plates.

The effectiveness of each decontamination procedure was analysed by calculating the percentage reduction of *E.faecalis* from the initial (S1) and final (S2) CFU counts, establishing a percentage reduction value for each sample in the various groups.

SEM preparation and analysis

The remaining two roots of each group were fixed for 7 days in 2% glutaraldehyde and washed three times for 30 min in a 1:1 ratio of 0.2 M phosphate buffer and distilled water. After dehydration, the roots were longitudinally sectioned, providing two halves of each sample. The four samples of each group were placed on stubs and coated with gold-palladium. Image acquisition was performed by SEM (Philips XL 30, Eindhoven, Netherlands) using the backscattering resource (BSE). The

image records were made at 3000× magnification of the main canal. The SEM images were used to illustrate the microbiological analysis.

Statistical analysis

The normal distribution of bacterial reduction data was confirmed by Kolmogorov-Smirnov test. Bacterial reduction was evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's HSD *post-hoc* tests ($\alpha = 0.05$). Data were analysed using Stat Plus AnalystSoft Inc. version 6.0 (Vancouver, BC, Canada).

RESULTS

The mean and standard deviation of the percentage reduction of *E. faecalis* by the tested decontamination procedures are presented in Table 1.

Neither group was able to promote a complete elimination of *E. faecalis* from the root canals. The greatest ability to promote bacterial reduction was observed in groups 7 (1% NaOCl + R40 + PDT), 8 (2.5% NaOCl + R40 + PDT), 9 (1% Ca[OCl]₂ + R40 + PDT), and 10 (2.5% Ca[OCl]₂ + R40 + PDT), with no statistically significant difference between them ($p < 0.05$). In addition, group 5 (2.5% Ca[OCl]₂ + R40) showed higher bacterial reduction when compared with all groups where PDT was not performed, with a statistically significant difference between them ($p < 0.05$). Finally, group 6 (PDT) was unable to promote an effective bacterial reduction alone ($p < 0.05$).

Figure 1 shows an illustration of the effectiveness of the final decontamination procedures.

DISCUSSION

The bacterial growth model of the present study was based on a previous study that focused on antimicrobial strategies by using sodium and calcium hypochlorite solutions against *E.faecalis* (6). This microorganism was chosen because of its ability to penetrate dentinal tubules (12) and colonize the root canal system in a biofilm format (13). However, there is no consensus in the literature on the time required for this bacterial growth to occur in order to test the effectiveness of the decontamination protocols, ranging up to 50 days (14). According to a previous study, 14 days is a sufficient period for the formation of *E.faecalis* biofilm on dentin (13). For this reason, a 14-day culture period was adopted in the present study, allowing the bacterial growth and ensuring that the decontamination protocols could be adequately tested.

Nowadays, different microbiological tests are used to evaluate the decontamination provided by chemical and mechanical protocols in endodontic therapy. In the present study, counting of CFUs was used to evaluate the effectiveness of hypochlorite solutions in different concentrations associated with reciprocating instrumentation in root canals infected with *E.faecalis*. This method was chosen on the basis of previous studies (6, 14) and because it allows bacterial quantification from the root canals in an acceptable way (15). However, the microbiological samples were only collected from the main canal. Therefore, it was not possible to assess the presence of *E.faecalis* in the

depth of dentinal tubules and the viability of this microorganism, as described in a previous study where these variables were measured by confocal laser microscopy (16).

According to the results of the present study, neither of the decontamination protocols was able to promote the complete elimination of *E.faecalis* from root canals. These findings are in accordance with previous studies where *E.faecalis* was not completely eliminated from the root canals by using antimicrobial strategies for their decontamination (6,10). *E.faecalis* is a facultative anaerobic microorganism that is highly resistant to antimicrobial strategies and is usually found in cases of failure of endodontic therapy (17). It has shown several virulence factors and an ability to persist for long periods of time in environments with nutrient limitation and survival starvation (18). These characteristics can help to explain the survival of *E.faecalis* in the root canals in the present study.

The nickel-titanium (NiTi) rotary instruments have superior flexibility compared with stainless steel files. This allows maintenance of the original canal shape and quick preparation of the root canals (19). However, NiTi files are still at risk of fracture through flexural fatigue and torsional stresses (20). Recently, the reciprocating system was developed to reduce the possibility of unexpected file fractures, ease preparation, and reduce clinical time (7). However, together with the reduction in the clinical instrumentation time, the hypochlorite solutions tend to stay in contact with the root canal walls for a shorter time. This can reduce the effectiveness of these chemical substances against microorganisms during endodontic therapy. This fact was observed in the present study, as the use of reciprocating instrumentation associated

with sodium and calcium hypochlorite solutions in different concentrations resulted in low effectiveness regarding the reduction of *E.faecalis* in the root canals. Similar results were found by Souza et al. (21), where the use of reciprocating instrumentation resulted in the reduction of antimicrobial properties of chemical auxiliary substances. Therefore, the present study suggests the use of auxiliary antimicrobial resources when root canal preparation is performed by reciprocating instrumentation.

The short exposure to irrigants such as NaOCl can allow survival of *E.faecalis* in root canals, since the time and concentration play an essential role in the ability of an irrigant to eliminate microorganisms (3, 22). This was observed in the present study, where the use of NaOCl solutions in association with reciprocating instrumentation with no PDT in groups 2 and 3 resulted in low effectiveness of *E.faecalis* reduction in root canals. In addition to the limited antimicrobial activity in these cases, NaOCl is cytotoxic (4) and chemically unstable (23) and interferes in the adhesion of restorative material to the dentinal surface (24). Moreover, it is known that NaOCl promotes a significant modification of the dentinal structure (25) and reduction of the mechanical properties of dentin, such as flexural strength, tensile strength, and fracture strength (26). Thus, these factors can compromise the success of endodontic therapy.

The use of 2.5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ in association with reciprocating instrumentation with no PDT in group 5 resulted in a significant reduction of *E.faecalis* in the root canals. $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ is available in granules and the release of two molecules of hypochlorous acid occurs when this substance is dissolved in aqueous solution (6). Therefore, a

higher amount of chlorine is released when compared to NaOCl, where only one molecule of hypochlorous acid is released. The hypochlorous acid is the main component responsible for the antimicrobial activity of hypochlorite solutions (6). It can help to explain the better antimicrobial activity of 2.5% Ca(OCl)₂ against *E.faecalis* in the present study, even during a short period of exposure to this irrigant.

PDT is a non-invasive technique which does not induce damage in the adjacent tissues. Moreover, anatomical complexities are not considered barriers to the light source penetration in the decontamination process (27). However, there is no consensus in the literature regarding a standard for the application of this therapeutic modality. Variables such as photosensitizers, pre-irradiation times, wavelengths, power, dose, and energy density are mentioned in several studies. The PDT protocol of the present study was based on a previous study (10), where the decontamination potential of PDT was considered elevated. However, according to the results of the present study, the use of PDT alone (group 6) did not result in a significant reduction of *E.faecalis* from root canals. These findings are in accordance with previous studies, which also found a low effectiveness of microbial reduction when using PDT alone (27–29). The absence of a standardized protocol for the performance of PDT can be the reason for the different conclusions in the literature.

According to the results of the present study, the use of PDT after chemomechanical preparation with hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation improved the antimicrobial activity against *E.faecalis*. These findings confirm the hypothesis of the present study, as greater decontamination was observed in the groups where PDT was performed. Previous studies showed similar results, revealing that PDT

has the potential to neutralize endodontic pathogens when associated with conventional decontamination procedures (27, 28). During the PDT, the low-intensity laser light stimulates the photosensitizer and reacts with molecular oxygen. Free radicals and oxygen reactive species are released from this interaction, acting on components of the bacterial cell wall through oxidation or reduction reactions (10). This mechanism of action of PDT induces the death of microorganisms, which can explain the results of the present study. Thus, the present study suggests the use of PDT as an adjunctive antimicrobial procedure in the endodontic therapy.

The highest mean percentage reduction of *E.faecalis* was obtained in groups 9 and 10, where the root canals were treated with $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ solutions in association with reciprocating instrumentation and PDT. In addition to an effective antimicrobial activity, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ also has the ability to promote tissue dissolution (30). Despite the fact that there was no statistically significant difference when compared to groups 7 (1% NaOCl + R40 + PDT) and 8 (2.5% NaOCl + R40 + PDT), $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ solutions have some advantages over NaOCl solutions. $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ is a non-cytotoxic solution (4), tends to be chemically stable after storage (23), and does not negatively affect the dentin mechanical properties, such as flexural strength, ultimate tensile strength, and fracture resistance (26). For these reasons, the present study suggests the use of $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ as irrigant solution when the root canals are prepared by reciprocating technique in association with PDT in order to promote an effective decontamination protocol against *E.faecalis*.

In conclusion, within the limitations of the present study, it appears that the use of NaOCl and $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ solutions with reciprocating

instrumentation did not provide an effective decontamination protocol in root canals infected by *E.faecalis*. In addition, the association of PDT with hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation did provide an effective decontamination protocol against *E.faecalis*.

REFERENCES

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340–349.
2. Bukhary S, Balto H. Antibacterial efficacy of octenisept, alexidine, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2017;43:643–647.
3. Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36:520–523.
4. Blattes GBF, Mestieri LB, Böttcher DE, Fossati ACM, Montagner F, Grecca FS. Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study. *Arch Oral Biol* 2017;73:34–39.
5. Whittaker HA, Mohler BM. THE sterilization of milk bottles with calcium hypochlorite. *Am J Public Health (NY)* 1912;2:282–287.
6. de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Bello YD, Cecchin D, Farina AP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with

Enterococcus faecalis: an in vitro study. J Endod. 2014;40:1953–1957.

7. Yared G. Canal preparation using only one Ni-Ti rotary instrument: Preliminary observations. Int Endod J 2008;41:339–344.

8. Vaudt J, Bitter K, Neumann K, Kielbassa AM. Ex vivo study on root canal instrumentation of two rotary nickel-titanium systems in comparison to stainless steel hand instruments. Int Endod J 2009;42:22–33.

9. Souza MA, Menon CZ, Nery LF, Bertol CD, Rossato-Grando LG, Cecchin D. Effect of root canal preparation techniques on chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. Clin Oral Investig 2017 [Epub ahead of print].

10. Souza MA, Dalla Lana DL, Gabrielli ES, Ribeiro MB, Miyagaki DC, Cecchin D. Effectiveness of final decontamination protocols against *Enterococcus faecalis* and its influence on bond strength of filling material to root canal dentin, Photodiagnosis Photodyn Ther 2017;17:92–97.

11. Gomes-Filho JE, Sivieri-Araujo G, Sipert CR, da Silva Santos LM, de Azevedo Queiroz IO, Men Martins C, et al. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016 Mar;13:97–100.

12. Ran S, Wang J, Jiang W, Zhu C, Liang J. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions ex vivo. *Int Endod J*. 2015;48:362–372.
13. Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod*. 2013;39:346–350.
14. Grundling GL, Zechin JG, Jarduim WM, et al. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod*. 2011;37:1128–1133.
15. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J*. 1995;28:95–99.
16. Böttcher DE, Sehnem NT, Montagner F, Fatturi Parolo CC, Grecca FS. Evaluation of the effect of *Enterococcus faecalis* biofilm on the 2% chlorhexidine substantivity: An in vitro study. *J Endod*. 2015;41:1364–1370.
17. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003;36:1–11.
18. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Molec Oral*

Microb. 2003;18:234–239.

19. Hwang YH, Bae KS, Baek SH, Kum KY, Lee W, Shon WJ, Chang SW. Shaping ability of the conventional nickel-titanium and reciprocating nickel-titanium file systems: a comparative study using micro-computed tomography. *J Endod.* 2014;40:1186–1189.

20. Sattapan B, Nervo GJ, Palamara JE, Messer HH. Defects in rotary nickel-titanium files after clinical use. *J Endod.* 2000;26:161–165.

21. Souza MA, Menon CZ, Nery LF, Bertol CD, Rossato-Grando LG, Cecchin D. Effect of root canal preparation techniques on chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *Clin Oral Investig.* 2017 [Epub ahead of print].

22. Abdullah M, Ng Y, Gulabivala K, Moles D, Spratt D. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005;31:30–36.

23. Leonardo NG, Carlotto IB, Luisi SB, Kopper PMP, Grecca FS, Montagner F. Calcium hypochlorite solutions: evaluation of surface tension and effect of different storage conditions and time periods over pH and available chlorine content. *J Endod.* 2016;42:641–645.

24. Santos JN, Carrilho MR, De Goes MF, Zaia AA, Gomes BPAF, Souza-Filho FJ, et al. Effect of chemical irrigants on the bond

strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. J Endod. 2006;32:1088–1090.

25. John C, Löst C, Elayouti A. Ultrasonic monitoring of the effect of sodium hypochlorite on the elasticity of dentine. Int Endod J 2013;46:477–482.

26. Cecchin D, Giaretta VS, Cadorin BG, Souza MA, Vidal CMP, Farina AP. Effect of synthetic and natural derived novel endodontic irrigant solutions on mechanical properties of human dentin. J Mater Sci Mater Med. 2017 [Epub ahead of print].

27. Rios A, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. J Endod. 2011;37:856–859.

28. Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S, Mader T, Schmalz G. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. Int Endod J. 2013;46:449–457.

29. Ghinzelli GC, Souza MA, Cecchin D, Farina AP, Figueiredo JAP. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis* – an in vitro study. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014;11:472–478.

30. Dutta A, Saunders WP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on soft-tissue dissolution. *J Endod.* 2012;38(10):1395–1398.

Table 1: Mean \pm standard deviation of percentage *E. faecalis* reduction (%) of tested decontamination procedures.

Group	N	Bacterial reduction (%)
1. DW + R40	10	10.33 \pm 0.88 ^a
2. 1% NaOCl + R40	10	19.36 \pm 2.87 ^b
3. 2.5% NaOCl + R40	10	40.91 \pm 4.46 ^c
4. 1 % Ca(OCl) ₂ + R40	10	43.68 \pm 5.43 ^c
5. 2.5% Ca(OCl) ₂ + R40	10	88.97 \pm 6.57 ^d
6. PDT	10	45.96 \pm 5.01 ^c
7. 1% NaOCl + R40 + PDT	10	96.64 \pm 3.21 ^e
8. 2.5% NaOCl + R40 + PDT	10	98.14 \pm 2.47 ^e
9. 1% Ca(OCl) ₂ + R40 + PDT	10	99.52 \pm 0.98 ^e
10. 2.5% Ca(OCl) ₂ + R40 + PDT	10	99.79 \pm 0.70 ^e

* Data are presented as mean \pm standard deviation. Different index letters represent statistically significant differences in the post hoc procedure (Tukey test).

** DW = distilled water; R40 = Reciproc R40 file; NaOCl = sodium hypochlorite; Ca(OCl)₂ = calcium hypochlorite; PDT = photodynamic therapy.

