

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO AZUL DE METILENO
EM DIFERENTES FORMULAÇÕES UTILIZADOS
NA TERAPIA FOTODINÂMICA NA
ENDODONTIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline de Moraes Londero

Santa Maria, 2014

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DO AZUL DE METILENO EM DIFERENTES
FORMULAÇÕES UTILIZADOS NA TERAPIA
FOTODINÂMICA NA ENDODONTIA**

Aline de Moraes Londero

Dissertação de Mestrado apresentado ao curso de mestrado do Programa de pós Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Santa Maria, Área de Concentração em Odontologia com ênfase em Endodontia, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas.**

Orientadora: Prof. Marcia da Silva Schmitz

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal De Santa Maria
Centro De Ciências Da Saúde
Programa De Pós Graduação Em Ciências Odontológicas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
AZUL DE METILENO EM DIFERENTES FORMULAÇÕES
UTILIZADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ENDODONTIA**

elaborada por
Aline de Moraes Londero

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcia da Silva Schmitz, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Rosmari Horner, Dra. (UFSM)

Francisco Montagner, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 20 de agosto de 2014.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus anjos da guarda por me darem força, segurança e esperança para traçar meu caminho com muita serenidade, luz e amor no coração.

Aos meus pais por todas as palavras de apoio, gestos de carinho e pelo maior exemplo de dignidade que eu poderia ter. Vocês são minha base, meu maior suporte. Sem vocês eu nada seria.

Ao meu noivo por toda a paciência despendida nesses dois anos de muito trabalho, pelo carinho e amor inigualáveis, pela sabedoria passada de que o amanhã sempre será melhor.

À minha orientadora, uma amiga, uma confidente, com um caráter que levarei como aprendizado desse mestrado.

À professora Rosmari que não mediu esforços para que esse trabalho se realizasse, sempre prestativa, atenciosa e humana. Obrigada pela parceria.

Às meninas do laboratório de bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas em especialidade à Tatiana Wagner pelas tardes e noites de trabalho, sempre com um sorriso no rosto e com um trabalho minucioso e competente.

Às minhas colegas do mestrado pelo incentivo diário, palavras, carinho e amizade.

“Chorar é lindo
Chorar é lindo, pois cada lágrima na face
são palavras ditas de um sentimento calado.
Pessoas que mais amamos, são as que mais magoamos
porque queremos que sejam perfeitas,
e esquecemos que são apenas seres humanos.
Nunca diga que esqueceu alguma pessoa, ou um amor.
Diga apenas que consegue falar neles sem chorar,
porque qualquer amor por mais simples que seja,
será sempre inesquecível...
As lágrimas não doem...
O que dói são os motivos que as fazem caírem!
Não deixe de acreditar no amor,
mas certifique-se de estar entregando seu coração
para alguém que dê valor
aos mesmos sentimentos que você dá,
manifeste suas ideias e planos,
para saber se vocês combinam,
e certifique-se de que quando estão juntos
aquele abraço vale mais que qualquer palavra...”

(Mário Quintana)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO AZUL DE METILENO EM DIFERENTES FORMULAÇÕES UTILIZADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ENDODONTIA

AUTORA: ALINE DE MORAES LONDERO

ORIENTADORA: MARCIA DA SILVA SCHMITZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de agosto de 2014.

A permanência dos microrganismos no sistema de canais radiculares após o preparo químico-mecânico desempenha um importante papel na taxa de sucesso do tratamento endodôntico. A Terapia Fotodinâmica surgiu na endodontia para ser um suplemento à desinfecção dos canais radiculares visando dirimir essa persistência. Ao questionarmos qual o real efeito antibacteriano desse tratamento na clínica de endodontia, nos deparamos com inúmeras formulações e concentrações usadas do fotossensibilizador, bem como inúmeras metodologias para testar sua atividade antimicrobiana, oferecendo resultados confusos e não conclusivos. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana, frente a duas cepas de *Enterococcus faecalis* ATCCs 29212 e 51299, do agente fotossensibilizador (FS) azul de metileno em diferentes concentrações e formulações citadas na literatura. O método empregado para avaliar a atividade antibacteriana do fotossensibilizador foi a microdiluição em caldo com a determinação da concentração inibitória mínima. As 18 substâncias-teste, citadas na literatura, foram deixadas em contato por cinco minutos em cada poço e então, seguiu-se a aplicação do laser (660nm, Kondortech®, São Carlos, SP, Brazil) por três minutos. Os testes foram realizados de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). Após o período de incubação de 18-24hs a 35±2°C, foi realizada a leitura visual observando o crescimento bacteriano, sendo consideradas inibitórias as substâncias onde os poços estavam sem turbidez e/ou depósito de sedimentos no fundo. O FS dissolvido numa mistura de H₂O₂ e clorexidina 2% (substância 15) e numa mistura de glicerol, etanol, água, peróxido de hidrogênio e detergente Triton X100 (substância 10) inibiram o crescimento do *Enterococcus faecalis* 29212. Para o microrganismo resistente além destas, a mistura do FS em glicerol, etanol e água (substância 13) também apresentou poder inibitório. Nenhuma concentração de azul de metileno dissolvido em água (300 a 7,5 µmol/L) apresentou poder de inibir o crescimento das cepas estudadas. Diante da literatura pesquisada e dos resultados do estudo, para predizer a eficácia da TFD frente ao microrganismo problema na endodontia, ainda é necessário uma padronização da formulação ideal do FS, seu tempo de contato e ainda, de parâmetros importantes do laser, como potência total, fluência e tempo de irradiação.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica Antimicrobiana. Fotossensibilizador. Endodontia. *Enterococcus faecalis*. Laser.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Dental Science Post Graduation Program
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF METHYLENE BLUE IN DIFFERENT FORMULATIONS USED IN PHOTODYNAMICTHERAPY

AUTHOR: ALINE DE MORAES LONDERO

ADVISER: MARCIA SCHMITZ

Defense Place and Date: Santa Maria, August 20th, 2014.

The persistence of microorganisms in the root canal system after chemical-mechanical preparation plays an important role in the success rate of endodontic treatment. Photodynamic Therapy in endodontics appeared to be a supplement to the disinfection of root canals aiming resolve this persistence. When questioning what the actual antibacterial effect of this treatment in clinical endodontics, we face numerous formulations and concentrations of the photosensitizer used, as well as numerous methodologies to test its antimicrobial activity, offering confusing and inconclusive results. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity against two strains of *Enterococcus faecalis* ATCCs 29212 and 51299, of the methylene blue photosensitizer (PS) in different formulations and concentrations cited in the literature. The method used to evaluate the antibacterial activity of the photosensitizer was the microdilution to determine the minimum inhibitory concentration. The 18 test substances, in the literature, were left in contact for five minutes in each well and then followed by the application of the laser (660 nm, Kondortech®, São Carlos, SP, Brazil) for three minutes. The tests were performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). After the incubation period at $35 \pm 2^\circ \text{C}$ 18-24hs, read visually observing the bacterial growth and is considered where the inhibitory substances were wells without turbidity and / or deposition of sediments at the bottom was carried out. Dissolved in a mixture of 2% chlorhexidine and H_2O_2 (substance 15), and a mixture of glycerol, ethanol, water, hydrogen peroxide and Triton X100 detergent (substance 10) PS inhibited the growth of *Enterococcus faecalis* resistant microorganism 29212. For the addition of these the mixture PS glycerol, ethanol, and water (substance 13) also showed an inhibitory power. No concentration of methylene blue dissolved in water (300 to $7.5 \mu\text{mol} / \text{L}$) had able to inhibit the growth of the strains analyzed. Given the literature reviewed and the results of the study to predict the efficacy of PDT against microorganism problem in endodontics, a standardization of the optimal formulation of PS, its contact time and also of important laser parameters is still necessary, as full power , creep and irradiation time.

Keywords: Antimicrobial Photodynamic Therapy. Endodontics. *Enterococcus faecalis*. Laser. Methylene Blue. Photosensitizing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Placas n. 1 e n. 2 com os fotossensibilizadores em contato com as cepas, por cinco minutos, previamente à irradiação (Irradiada).....	25
Figura 2- Placas n. 1 e n. 2 com os controles (positivo, negativo, padrão e da substância), com os fotossensibilizadores em contato com as bactérias, por cinco minutos, previamente à irradiação (Placa Irradiada).....	26
Figura 3- Atividade antibacteriana dos diferentes FS sem a aplicação do laser após 24 horas de incubação contra <i>E. faecalis</i> VRE.....	28
Figura 4- Atividade antibacteriana dos diferentes FS com aplicação do laser após 24 horas de incubação contra <i>E. faecalis</i> VRE.....	29
Figura 5- Atividade antibacteriana dos diferentes FS sem aplicação do laser após 24 horas de incubação contra <i>E. faecalis</i>	29
Figura 6- Atividade antibacteriana dos diferentes FS com aplicação do laser após 24 horas de incubação contra <i>E. faecalis</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Revisão de literatura mostrando as divergências metodológicas nos estudos.....	19
Tabela 2- Substâncias-teste.....	24

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Normas para publicação no International Endodontic Journal.....	44
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 OBJETIVOS	14
3 ARTIGO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO AZUL DE METILENO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E FORMULAÇÕES NA TERAPIA FOTODINÂMICA	15
Página de Rosto.....	16
Resumo.....	17
Introdução	18
Materiais e Métodos.....	23
Análise de Dados.....	27
Resultados.....	28
Discussão.....	31
Conclusão.....	35
Referências Bibliográficas.....	36
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO GERAL

KAKEHASHI et al.(1965) relatavam a relação direta de causa-e-efeito entre microrganismos e lesões perirradiculares. Em função da complexidade do sistema de canais radiculares e da impossibilidade em se eliminar os microrganismos ali presentes pelas técnicas empregadas de preparo químico-mecânico até então existentes, falhas no processo de limpeza e desinfecção poderão levar a um fracasso do tratamento a longo prazo (SIQUEIRA & RÔÇAS 2008; LOPES et al., 2004a).

Dentre os microrganismos com maior prevalência e resistência bacteriana, principalmente em infecções secundárias assintomáticas, está o *Enterococcus faecalis* (RÔÇAS et al., 2004). Esta bactéria Gram + anaeróbia facultativa destaca-se por conseguir sobreviver e se aderir dentro dos túbulos dentinários como monoinfecção (VIVACQUA GOMES et al., 2005) e ainda capacidade de formação de biofilme (STUART et al., 2006). Desempenha também um importante papel na etiologia de lesões perirradiculares persistentes (STUART et al., 2006) podendo sobreviver a meios extremamente alcalinos e com altas concentrações de sais (ROÇAS et al., 2004). Estudos mostram que este gênero é capaz de se deslocar do sistema de canais radiculares para os linfonodos submandibulares sugerindo que esta via de infecção pode acarretar a patogênese de infecções oportunistas (RIBEIRO SOBRINHO et al., 1998)

Com o intuito de aumentar a eficácia antibacteriana durante o preparo químico-mecânico, diversos suplementos têm sido empregados dentre, eles o laser. Os efeitos produzidos pelo laser em células vivas podem acontecer devido a ações fototérmicas, fotoquímicas ou fotomecânicas. A terapia fotodinâmica (TFD ou PDT) tem sido amplamente utilizada na medicina como tratamento de tumores e também para a desinfecção de plasma sanguíneo na inativação de vírus dentre eles HIV e hepatites B e C (WAINWRIGHT, 2000). Ela surgiu da necessidade para o desenvolvimento de abordagens inovadoras e eficazes para combater as doenças de origem microbianas. Recentes descobertas apoiam fortemente a hipótese de que a TFD pode representar uma alternativa viável, uma vez que o modo de ação dos fotossensibilizadores em células microbianas é marcadamente diferente do típico da maioria dos antibióticos.

Seu mecanismo de ação é dado pelo uso de lasers de baixa potência para conduzir reações fotoquímicas, a partir do corante fotossensibilizador juntamente na presença do oxigênio. A molécula do fotossensibilizador, ao ser irradiada com um comprimento de onda adequado, é levada a um estado de alta energia (estado tripleto) que pode reagir ou transferir a sua energia para uma molécula de oxigênio, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio, superóxidos, radicais livres e oxigênio singleto, este último é apontado como o principal responsável pelo efeito antimicrobiano da TFD (WALSH, 1997).

Um agente fotossensibilizador ideal deve ter, além de um estado tripleto de longa duração e espécies reativas de oxigênio singleto tóxicas, uma grande afinidade pelas células microbianas com um amplo espectro de ação, a fim de atuar de forma eficiente em infecções envolvendo uma flora de patógenos heterogêneos. Também é necessário um mecanismo de inativação de células com mínimo risco de gerar estirpes resistentes ou promover o desenvolvimento de processos mutagênicos (JORI et al., 2006). Os fotossensibilizadores fenotiazínicos, como o azul de metileno (AM) possuem carga positiva em pH fisiológico, conferindo-lhes o poder de promover a fotoinativação de bactérias G⁻ e G⁺ (Wilson et al. 1995), ao contrário do que se relata com fotossensibilizadores com carga negativa (aniônicos) que só possuem ação contra bactérias G⁺ (JORI et al., 2006).

A molécula do azul de metileno é estável, o que permite que seja submetida a um rearranjo eletrônico e alcance, assim, um estado tripleto ideal para o uso na Terapia Fotodinâmica. Se no estado tripleto o oxigênio molecular reagir com as moléculas adjacentes envolvidas na manutenção e estrutura da membrana celular (fosfolípidos e peptídeos), ocorre a reação do Tipo I, com a formação de hidroperóxidos lipídicos (ROS), causando danos irreparáveis às células microbianas. Entretanto, se a molécula do estado tripleto transferir sua energia ao oxigênio molecular, ocorre uma inversão de spin eletrônico causando a formação de oxigênio singleto, que funciona como um agente oxidante reagindo com as proteínas e ácidos nucleicos bacteriano, ocasionando a reação do Tipo II, considerada a principal via de dano foto-oxidativo às células microbianas (WAINWRIGHT, 2000).

Os relatos na literatura endodôntica mostram que a Terapia Fotodinâmica, adjunta ao preparo quimicomecânico, pode proporcionar uma morte microbiana suplementar ao tratamento endodôntico (USACHEVA et al., 2001; SOUKOS et al., 2006; GEORGE e KISHEN, 2007; FOSCHI et al., 2007; BERGMANS et al., 2008; FIMPLE et al., 2008;

FONSECA et al., 2008; LIM et al., 2009; RIOS et al., 2011; NG et al., 2011; RAHIMI et al., 2011; MIRANDA et al., 2012). Entretanto, há diversos estudos que mostram que a TFD não mostrou nenhum ou pouco efeito antibacteriano aditivo (SEAL et al., 2002; MULLER et al., 2007; MEIRE et al., 2009; SOUZA et al., 2010; NUNES et al., 2011; MEIRE et al., 2012; HECKER et al., 2012; STOJICIC et al., 2012).

No entanto, a eficácia da TFD é dependente de vários fatores, entre eles a composição físico-química do fotossensibilizador. Parâmetros importantes devem ser observados, dentre eles: lipofilicidade, comprimento de onda máximo de absorção, eficiência de formação do estado excitado tripleto ou produção de oxigênio singleto (WAINWRIGHT, 2000). Tendo em vista isto, na endodontia podem-se encontrar diversas divergências, principalmente sobre qual fotossensibilizador ideal. Percebe-se, através da Tabela 1, que os estudos a respeito da TFD, na literatura endodôntica, não seguem nenhum tipo de padronização quanto à substância fotossensibilizadora utilizada, seu tempo de contato, tipo de laser, tempo de irradiação entre outros. Numa Revisão Sistemática recente (FRASSON et al., 2012) os autores não puderam concluir nenhum grau de evidência quanto a eficácia do laser usado adjunto ao preparo químico-mecânico e concluíram que os itens supracitados podem ser motivos desta limitação.

Alguns estudos ainda questionam o papel antimicrobiano que o corante pode assumir de forma isolada. Seja na forma pura (USACHEVA et al., 2001; PELOI, 2007), dissolvido numa solução salina tamponada com fosfato (FIMPLE et al., 2008), dissolvido em BHI (FOSCHI et al., 2007; SOUKOS et al., 2006) os trabalhos têm confirmado a toxicidade do fotossensibilizador aos microrganismos na ausência da luz.

Para avaliar a capacidade antibacteriana que uma substância possui existem diversos testes, dentre eles, a microdiluição realizada com placas de 96 poços onde se avalia a Concentração Inibitória Mínima, considerado referência pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). É um teste que fornece resultados qualitativos e quantitativos que vão demonstrar a menor concentração da substância que inibiu o crescimento de determinada bactéria.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar/ investigar a atividade antibacteriana do fotossensibilizador azul de metileno (AM) em diluições e concentrações citadas na literatura, frente a espécies bacterianas comumente envolvidas em infecções endodônticas.

2.2 Específicos:

Verificar a atividade antibacteriana da TFD frente a diferentes cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis* ATCCs 29212 e 51299 com uma metodologia *in vitro*.

Observar se houve diferença na ação da TFD nas duas cepas testadas.

3. ARTIGO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO AZUL DE METILENO EM DIFERENTES FORMULAÇÕES UTILIZADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ENDODONTIA

Este artigo será submetido à publicação no periódico International Endodontic Journal. As normas para publicação estão descritas no Anexo A.

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
AZUL DE METILENO EM DIFERENTES FORMULAÇÕES
UTILIZADOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA NA ENDODONTIA**

Aline Londero ¹, Rosmari Honer², Marcia Schmitz³,

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

³Departamento de Odontologia Restauradora, Disciplinas de Endodontia I, II e Clínica Integrada, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Autor correspondente

Marcia da Silva Schmitz – PPGCO UFSM

Endereço: Rua Marechal Floriano Peixoto, 1184

Prédio Antiga Reitoria – Sala 312

Bairro Centro

Santa Maria- RS

CEP: 97015-372

55 (55) 3220-9210

mendo@terra.com.br

Resumo

Objetivos: O objetivo foi avaliar, *in vitro*, o papel antibacteriano do FS azul de metileno (AM) em diluições e concentrações citadas na literatura, além do efeito da Terapia Fotodinâmica (TFD) frente a duas cepas de *Enterococcus faecalis*.

Metodologia: A avaliação da atividade antimicrobiana do FS foi efetuada contra *Enterococcus faecalis* ATCCs 29212 e 51299 (resistente à Vancomicina) utilizando o método de microdiluição em caldo Muller-Hinton. Para testar a atividade da TFD, o laser utilizado foi de 660nm (Kondortech® SP, Brazil) com 30mW de potência, aplicado por três minutos em cada poço. Após o período de incubação foi feita a leitura visual observando o crescimento bacteriano, do qual era efetivo quando havia a presença de turvação nos poços.

Resultados: FS dissolvido numa mistura de H₂O₂ e clorexidina 2% (substância 15) e numa mistura de glicerol, etanol, água, peróxido de hidrogênio e detergente Triton (substância 10) inibiram o crescimento da bactéria sensível (ATCC 29212). Para a resistente à vancomicina, além destas, a mistura do FS em glicerol, etanol e água (substância 13) também foi eficaz. Nenhuma concentração de AM dissolvido em água (300 a 7,5 µmol/L) foi inibitória. Os resultados obtidos foram iguais tanto na presença quanto na ausência da aplicação do laser.

Conclusão: Diante da metodologia utilizada e da divergência metodológica encontrada, o AM só apresentou poder inibitório quando dissolvido em outras substâncias, sendo ineficaz isoladamente. Além disso, TFD não foi eficaz em inibir o crescimento dos microrganismos utilizados.

Palavras-chave: Endodontia. *Enterococcus faecalis*. Fotossensibilizador. Laser. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

As técnicas atuais de preparo dos canais radiculares juntamente com as soluções irrigadoras e medicamentos intracanaís (Sathorn et al. 2007), além dos meios suplementares já estudados, como ultrassom (Huque et al. 2013), ainda sucumbem frente à complexa anatomia desse sistema de canais radiculares e à variada flora microbiana ali presente.

A literatura endodôntica cita o *Enterococcus faecalis* entre os microrganismos com maior prevalência e resistência bacteriana, com destaque em infecções secundárias assintomáticas (Gomes et al. 2006, Rôças et al. 2004, Tennert et al. 2014). Sua peculiaridade está justamente, na sua capacidade em sobreviver em meios extremamente alcalinos e da alta capacidade de invasão e aderência aos túbulos dentinários (Gomes et al. 2003, Saleh et al. 2004, Vivaqua-Gomes et al. 2005, Dunavant et al. 2006).

Visando dirimir esse problema, surge a Terapia Fotodinâmica, cujo mecanismo de ação se baseia na interação entre lasers de baixa potência, fotossensibilizador (FS) e oxigênio. O fotossensibilizador excitado pela energia laser de determinado comprimento de onda reage com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio e oxigênio singleto que promovem danos ou até mesmo a morte bacteriana (Plaetzer et al. 2003).

Entretanto, ao questionarmos qual o real efeito antibacteriano da terapia fotodinâmica na clínica de endodontia, nos deparamos com inúmeras concentrações e formulações de fotossensibilizadores, diferentes tempos de contato entre FS e microrganismo, diferentes lasers e tempo de irradiação, bem como inúmeras metodologias, oferecendo resultados confusos e não conclusivos, como mostrados na Tabela 1.

Este estudo, após uma revisão de literatura, selecionou as soluções químicas mais utilizadas citadas em artigos de revistas de maior impacto. O fotossensibilizador azul de metileno foi o mais encontrado, justamente por ser uma molécula estável, permitindo que alcance um estado tripleto ideal e, ao transferir sua energia ao oxigênio molecular, produza oxigênio singleto que poderá causar danos irreversíveis no DNA bacteriano. Entretanto, os estudos mais recentes têm demonstrado que a substância utilizada para dissolver o FS pode influenciar na sua reatividade, poder antioxidante e capacidade antibacteriana (Usacheva et al. 2003, George e Kishen 2007, Stojic et al. 2012).

Outros estudos ainda mostram que baixas concentrações do FS são mais eficazes no tratamento, pois aumentariam a formação do componente monômero no FS, do qual aumentam a produção de oxigênio singleto (Wainwright 2000). Por outro lado, Usacheva et al. 2003 encontraram que altas concentrações do FS apresentam maior poder antibacteriano.

Seguiu-se a procura de qual a metodologia *in vitro* seria mais eficaz e indicada para avaliar a atividade antimicrobiana do fotossensibilizador. De acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013) o Teste de microdiluição em poços é considerado referência para avaliar a capacidade antibacteriana que uma substância possui. O objetivo deste trabalho é avaliar, *in vitro*, a capacidade antibacteriana do fotossensibilizador azul de metileno em suas diferentes concentrações e dissolvido em diferentes formulações citadas na literatura e observar os efeitos da TFD frente a duas cepas de *Enterococcus faecalis*, uma sensível à vancomicina e outra resistente (VRE).

Tabela 1 - Revisão de literatura (Base de Dados: PUBMED, período de busca 2000 a 2013).

Autor/Ano	Metodologia	Laser	FS	Resultado
Meire et al. 2012	Biofilme de <i>E. faecalis</i> em discos de dentina. <u>Controle:</u> NaOCl 2,5% em 1,5,10 ou 30 min. Triplicata	Soft laser (660nm, 75 mW) <u>Tempo:</u> 2 min Laser Diodo (635nm, 100mw) <u>Tempo:</u> 150s	AM na concentração 10mg/mL <u>Contato:</u> 3 minutos	Através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) Grupo NaOCl : houve completa erradicação em tempos superiores a 5 min. <u>TFD: teve baixa redução.</u>
Miranda et al. 2012	125 PM extraídos contaminados com <i>E. faecalis</i> <u>Controle:</u> 5,25% NaOCl	Laser Diodo (660nm, 40mW) <u>Tempo:</u> 5 min	AM : 25 µg/mL <u>Contato:</u> 5 minutos	Dado pela contagem de UFC. Coletados com cones de papel. <u>TFD: nenhum efeito antibacteriano adicional ao PQM</u>
Stojicic et al. 2012	Suspensão de <i>E. faecalis</i> , Suspensão de placa mista e biofilme (discos de hidroxiapatita). <u>Macrodiluição em Tubo.</u>	Laser Diodo (660nm, 40nW) <u>Tempos:</u> 30s, 1 min e 3 min	0,096g de AM em 100 mL de água (3000µmol/L) Conc. Testes: 150, 100, 50, 30, 15 e 7,5 µmol/L <u>TFD Modificado:</u> 30 µmol/L somado à: Clorexidina- 0,1% e 2% EDTA- 0,1% Peróx hidrog 0,1% <u>Contato:</u> 5 min	Diluições seriadas de 10 vezes em placas para contagem de UFC <u>TFD convencional:</u> não foi eficaz . <u>TFD modificado:</u> mais efetivo, entretanto todos os tradicionais irrigantes foram os mais eficazes.
Nunes et al. 2011 Photomedic ine and	60 dentes humanos monorradiculares extraídos infectados com <i>E. faecalis</i> em	Diodo (660nm) 35 e 100mW) <u>Tempo:</u> 1 min 30s e 3 min (2	AM: dissolvido em água deionizada conc. 0,01% ou 100 µg por 1mL de água destilada	Obtidos por cones de papel e após 24 hs, contagem de UFC. <u>99,99% de redução de E.</u>

Laser Surgery	suspensão. <u>Controle:</u> 1% NaOCl	repetições de 1min 30s)	<u>Contato:</u> 5 min	<u>faecalis no grupo com 1% NaOCl</u> 99,41 e 99,65% de redução nos grupos TFD
Ng et al. 2011 Journal of Endodontics	52 dentes (incisivos, PM e M) com necrose pulpar e evidência radiográfica <u>Controle:</u> 6% NaOCl	Diodo (665nm, 1W, 30J/cm2 <u>Tempo:</u> 2,5 min, pausa de 2,5 min e nova aplicação de 2,5 min.	AM- dissolvido em sol. estéril salina tamponada com fosfato (PBS) (50 µg/mL - 134 µmol/L) <u>Contato:</u> 5 minutos	Dados obtidos com raspas de dentina e analisados num ensaio genômico e contagem de UFC. <u>Melhor performance PQM+TFD.</u> Incompleta eliminação bacteriana.
Souza et al. 2010 Journal of Endodontics	70 dentes humanos unirradiculares infectados com espécie selvagem de E. faecalis <u>Controle:</u> 2,5%NaOCl	Diodo laser (660 nm) <u>Tempo:</u> 4min	AM (15 µg/mL) <u>Contato:</u> 2 minutos	Dados obtidos com cones de papel e então feita a contagem de UFC. <u>TFD não pode exercer um efeito suplementar significativo.</u>
Upadya, M.H. & Kishen 2010 International Journal of Endodontics	Suspensão bacteriana e biofilme de E.faecalis, P. aeruginosa e A. israelii. <u>Teste de Macrodiluição</u> - Tubos de Ependorf com 500µL de suspensão bacteriana, 500µL de AM, 500µL de PBS. Realizado em triplicata.	660nm (15J/cm ²)	AM dissolvido em água deionizada (100µmol/L) AM + glicerol: etanol: água (30:20:50) (MIX). AM + MIX +perox. De H + detergente Triton) (75:24,5: 0,5) Tempo de contato: 15 minutos	Amostras tratadas foram diluídas 10 vezes e colocadas em placas de Agar com BHI por toda à noite e então realizado a contagem de UFC. FS sozinho e laser sozinho tiveram efeito insignificante. <u>TFD: sem eliminação completa dos MOs.</u> Menos efetiva: AM Mais efetiva: AM+MIX+Emulsão FS e laser sozinhos podem reduzir um pouco a viabilidade bact. mas não afetam significativamente a estrutura do biofilme
Lim et al. 2009 Australian Dental Association	85 dentes humanos unirradiculares infectados com biofilme de 4 dias ou de 4 semanas. <u>Controle:</u> 5,25% NaOCl por 20 min. Procedimento realizado em triplicata.	Diodo (664nm, 30mW). <u>Tempo:</u> 20 minutos	AM dissolvido em água e mistura de glicerol:etanol:água (30:20:50) – MIX <u>Contato:</u> 20 minutos	Bactérias coletadas com raspas de dentina de duas profundidades diferentes. Diluição seriada em 10 vezes, 100µL foram pipetados e colocados em placas de Agar após 12 hs de incubação. Resultados obtidos pela contagem de UFC. <u>TFD convencional pode não ser efetivo em inativar biofilme bact. completamente.</u>

<p>Fimple et al. 2008</p> <p>Journal of Endodontics</p>	<p>100 dentes humanos unirradiculares extraídos e infectados com multiespécies de biofilme.</p> <p><u>Controle:</u> 6%NaOCl</p>	<p>Diodo (665nm) Fluência:30J/cm²</p> <p><u>Tempo:</u> 2,5 min seguidos de pausa de 2,5min e nova exposição de 2,5min</p>	<p>AM dissolvido em BHI (25 µg / mL)</p> <p>AM dissolvido em sol. salina tamponada com fosfato (PBS) (25 µg / mL)</p> <p><u>Contato:</u> 10min</p>	<p>Sol. bacteriana coletada com tubos de microcentrífuga posicionado abaixo do forame apical. Foram realizadas diluições seriadas e 100µL foram inoculadas em placas petri com Agar e incubados anaerobicamente por 7 dias e então realizada a contagem.</p> <p>TFD mostraram as menores contagens de células bacterianas (80% de redução).</p> <p><u>AM+BHI:</u> Luz sozinha e AM sozinhos diminuiram a contagem mas não foi significativa</p> <p><u>AM+PBS:</u> AM diminuiu a contagem em 66%.</p>
<p>Foschi et al. 2007</p> <p>Lasers in Surgery And Medicine</p>	<p>60 dentes humanos unirradiculares infectados com E. faecalis</p> <p><u>Controle:</u> 6%NaOCl.</p>	<p>Diodo laser (665nm / 1W)</p> <p><u>Tempo:</u> 10min</p>	<p>AM (dissolvido em caldo BHI em condições estéreis, para se obter uma concentração de 6,25 µg / ml (16,75 µM).</p> <p><u>Contato:</u> 5 minutos</p>	<p>Suspensão bacteriana coletada com tubos de microcentrífuga e 100µL desta foram colocados em placa de Agar e foi realizado a contagem de UFC..</p> <p>TFD mostrou redução de 77% de bactérias</p>
<p>George & Kishen 2007</p> <p>Journal of Biomedical Optics</p>	<p><u>Experimento in vitro:</u> <u>Suspensão bacteriana:</u> testadas diferentes formulações de AM por <u>30min.</u></p> <p><u>Biofilme bacteriano</u> (múltiplas placas de poços): Passo1: testadas as diferentes formulações de AM por <u>10min.</u> Passo2: 200µ L de solução carreadora de oxigênio (perfluordecáhidronaftaleno) foi irradiada por <u>10 min.</u></p> <p><u>Experimentos ex vivo:</u> 72 dentes humanos extraídos infectados com biofilme de E. faecalis e A. actinomycetemcomitans</p>	<p>Diodo laser (664nm, 30mW)</p> <p><u>Tempo:</u></p>	<p>100 µM de AM em 4 diferentes formulações:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. água desionizada 2. 70% de glicerol em água 3. 70% polietileno-glicol em água 4. mistura de glicerol: etanol: água 30:20:50 (MIX) 	<p><u>AM na formulação MIX</u> mostrou a penetração máxima em todas as regiões</p> <p><u>Experimentos ex vivo:</u> Raspas de dentina foram coletadas e adicionado BHI e incubados a 37 C por 6 horas. Foram preparadas diluições seriadas e 100µL de cada diluição foram semeadas em placas com Agar. A contagem de UFC foi realizada após 16 hs com incubação a 37 C</p> <p>A exposição <u>somente a luz</u> resultou em redução significativa de bactérias.</p> <p><u>Laser + MIX = 100% morte bacteriana.</u></p>

	S. <u>Controle:</u> 1%NaOCl 100 µM de AM por 30 minutos.			
Muller et al. 2007 European Journal of Oral Sciences	Discos de dentina infectados com diferentes bactérias e fungo em biofilme. <u>Controle:</u> 5%NaOCl Realizado em triplicata	Helbo laser (665 nm, 75 mW) <u>Tempo:</u> 60s	AM (não diz concentração) <u>tempo:</u> 60s	Diluições seriadas foram realizadas e após 72h foi feito a contagem de UFC. <u>NaOCl 5%: eliminou todas as bactérias.</u> Clorexidina a 2% e NaOCl 0,5% mostraram um potencial antibacteriano melhor do que os grupos de TFD.
Soukos et al. 2006 Journal of endodontics	<u>In vitro:</u> Alíquotas de suspensões bacterianas foram colocadas em tubos de microcentrífuga. Adicionado o FS em poços de placas de 24 poços (Diluição) Logo após foram feitas as diluições seriadas e então CFU. <u>Ex vivo:</u> 60 dentes unirradiculares extraídos infectados com patógenos endodônticos na fase planctônica e biofilme de E. faecalis	Diodo laser (665nm) – 30J/cm2 <u>Tempo:</u> 5 min	AM dissolvido em BHI – 67 µmol/L <u>Contato:</u> 5 minutos	<u>In vitro:</u> Todos os MO . foram totalmente eliminados após TFD com exceção do E. faecalis, que foi reduzido em 53%. <u>Ex vivo:</u> solução de dentro do canal foi coletada com tubos de Ependorfe a partir do forame apical. Redução de 97% de biofilme de E. faecalis Só com AM: 83,2% Só com luz: 56,6%
Usacheva, Teichert & Biel 2001 Lasers in Surgery and Medicine	Suspensões bacterianas de diferentes espécies. Foram realizados 4 experimentos diferentes em tubos de ensaio com a suspensão bacteriana.	Argon laser (630nm) Diodo laser (664nm) Tempo:	AM (87%) Contato:	Foi realizada a diluição e posteriormente semeadas em placas com Agar. Após 24 hs em 37C foi realizada a contagem de UFC. <u>Todos os microrganismos irradiados foram erradicados pela TFD.</u>

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos clínicos foram executados por um único operador calibrado no projeto piloto para análise microbiológica. O teste realizado é o de microdiluição em caldo Mueller-Hinton seguindo-se o método padrão de microdiluição em caldo, recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013).

As cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) utilizadas nesse estudo serão duas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e ATCC 51299 (resistente à vancomicina-VRE). Elas foram adquiridas liofilizadas e estavam armazenadas em glicerol 15%, a -80°C, para realização dos experimentos. Foram reativadas em *Tryptycase Soy Agar*, 35 ± 2 °C/24 h e colocadas em Caldo de Mueller-Hinton como meio de cultura para determinação da atividade antibacteriana. Os inóculos bacterianos foram preparados a partir dos microrganismos ATCCs (sendo Placas 1: *E. faecalis* sensível à vancomicina e Placa 2: *E. faecalis* resistente) ajustando até atingir a concentração equivalente a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) confirmado através de um espectrofotômetro com absorvância de 625nm. Foi adicionado em cada poço 100µL de Caldo Muller-Hinton, 80µL das concentrações e formulações das soluções previamente preparadas conforme os estudos. Houve a homogeneização, sendo dispensados 100µL e posteriormente os inóculos foram adicionados em cada poço (100µL) (**Fig. 1 e 2**).

A substância referência foi o azul de metileno (C₁₆H₁₈N₃SCl) com a concentração de 3000µmol/L e a partir desta foram feitas as outras concentrações e formulações referenciadas nos artigos conforme **Tabela 2**. As substâncias ficaram em contato com as bactérias por cinco minutos previamente à irradiação (Stojic et al. 2012, Miranda et al. 2012).

Tabela 2- Substâncias-teste

SUBSTÂNCIA	FORMULAÇÃO	CONCENTRAÇÃO	REFERÊNCIA
Substância Referência (SR)	0,096g de AM pó em 100mL de água de MiliQ	3000µmol/L	Stojicic et al/ 2012
1	SR dissolvido em água de MiliQ	150 µmol/L	Stojicic et al/ 2012
2	SR dissolvido em água de MiliQ	100 µmol/L	Stojicic et al/ 2012
3	SR dissolvido em água de MiliQ	50 µmol/L	Stojicic et al/ 2012
4	SR dissolvido em água de MiliQ	30 µmol/L	Stojicic et al/ 2012
5	SR dissolvido em água de MiliQ	15 µmol/L	Stojicic et al/ 2012
6	SR dissolvido em água de MiliQ	7,5 µmol/L	Stojicic et al/ 2012
7	SR dissolvida em PBS	67 µmol/L	Ng et al. 2011
8	SR dissolvida em PBS	134 µmol/L	Fimple et al. 2008
9	SR numa mistura de 70 % PEG 200	100 µmol/L	George e Kishen 2007
10	SR numa mistura de MIX + peróxido de hidrogênio e detergente Triton X100	75:24,5:0,5	Updya e Kishen 2010
11	SR dissolvida em caldo BHI	16,75 µmol/L	Foschi et al 2007 Soukos et al. 2006
12	SR numa mistura de 70% de glicerol	100 µmol/L	George e Kishen 2007
13	SR numa mistura de glicerol:etanol:água (MIX)	30:20:50	Lim et al. 2009 Updya e Kishen 2010
14	SR numa mistura de H ₂ O ₂ e clorexidina 0,1%	0,1% : 0,1%	Stojic et al. 2012
15	SR numa mistura de H ₂ O ₂ e clorexidina 2%	0,1%: 2%	Stojic et al. 2012
16	SR numa mistura de H ₂ O ₂ e	0,1%:0,1%	Stojic et al. 2012

EDTA			
17	SR numa mistura de EDTA e clorexidina 0,1%	0,1%:0,1%	Stojic et al. 2012
18	SR numa mistura de EDTA e clorexidina 2%	0,1%:2%	Stojic et al. 2012

Legenda: AM- Azul de Metileno / PBS: Solução salina tamponada com fosfato / BHI: Brain Heart Infusion (Infusão cérebro coração) / PEG- Polietilenoglicol / H2O2 – água oxigenada / EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético

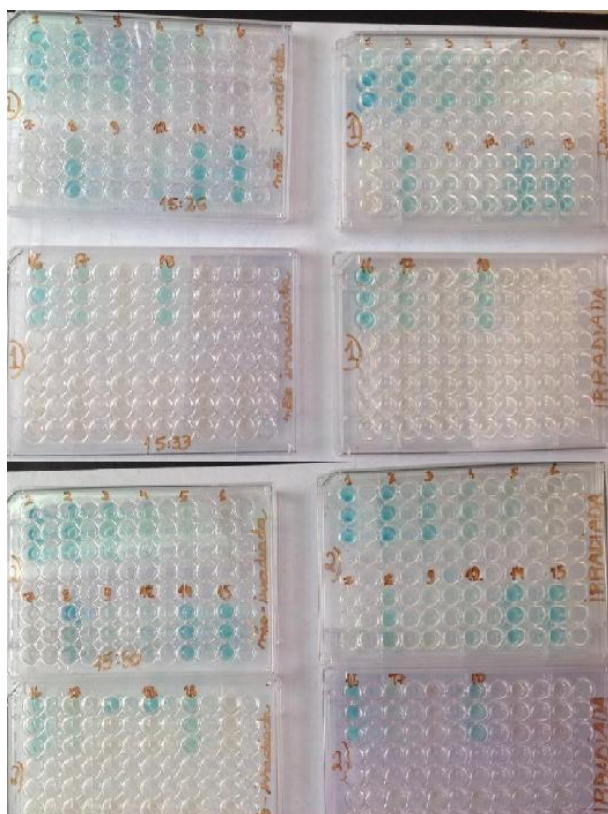


Figura 1. Placas n. 1 e n. 2 com os fotossensibilizadores em contato com as cepas, por cinco minutos, previamente à irradiação (Irradiada).

Os testes foram realizados em triplicata. O laser (660nm, Kondortech®, São Carlos, SP, Brasil) utilizado é de baixa potência, ativado por três minutos em cada poço (Placas Irradiadas), com 30mW de potência total e fluência de 28J/cm³ (Stojic et al. 2012). Os controles utilizados foram: controle negativo (sem bactéria, somente com o meio), controle

positivo (com meio e bactéria), controle da precipitação da substância teste (só substância e meio) e controle padrão com hipoclorito de sódio a 5,25%.

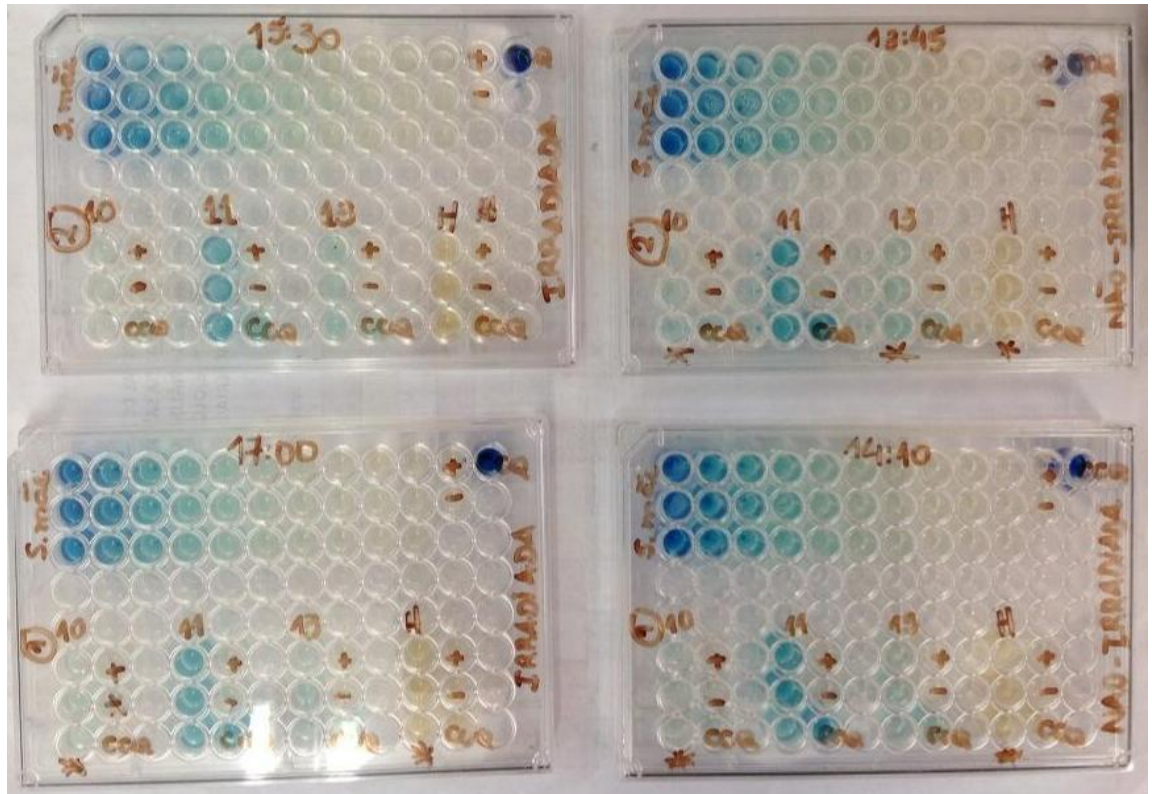


Figura 2. Placas n. 1 e n. 2 com os controles (positivo, negativo, padrão e da substância), com os fotossensibilizadores em contato com as bactérias, por cinco minutos, previamente à irradiação (Placa Irradiada).

Após o período de incubação de 16-24hs a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, foi realizada a leitura visual observando o crescimento bacteriano segundo as normas do CLSI 2013. Só foram consideradas substâncias que inibiram o crescimento bacteriano quando os poços estavam sem turbidez e/ou depósito de sedimentos no fundo.

ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Teste Exato de Fisher, através do programa de computador SPSS Inc. Released 2007 (SPSS for Windows, Version 17.0. Chicago, SPSS Inc.), para comparar se os quatro grupos testados (Grupo laser em *E. faecalis*, Grupo sem laser em *E. faecalis*, Grupo laser em *E. faecalis* VRE, Grupo sem laser em *E. faecalis* VRE) se comportaram de forma semelhante e assim, podermos aceitar ou rejeitar a hipótese nula de que a TFD não é eficaz contra as cepas utilizadas na metodologia do estudo. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p=0,05$). Para a substância, aquela que alcançou inibição do crescimento bacteriano (100%) foi considerada eficaz.

RESULTADOS

Após o período de 24 horas cada placa foi analisada individualmente por dois examinadores calibrados e experientes. Se houvesse divergência nos resultados, um terceiro examinador calibrado decidiria. Entretanto, não houve nenhuma divergência. As substâncias que inibiram o crescimento do *Enterococcus faecalis* sensível (fig.5 e 6) foram: número 15 (AM numa mistura de H₂O₂ + clorexidina 2%) e 10 (AM numa mistura de glicerol, etanol, água + peróxido de hidrogênio + detergente Triton X100). Para o microrganismo resistente à vancomicina (VRE) além dessas substâncias, a número 13 (AM numa mistura glicerol, etanol, água) também apresentou poder inibitório (fig. 3 e 4).

Os resultados mostraram que nenhuma concentração de azul de metileno dissolvido em água (300 a 7,5µmol/L) sozinha ou com o laser apresentou poder de inibir o crescimento da bactéria. O teste estatístico mostrou que a TFD não foi eficaz contra as duas cepas pesquisadas, dentro da metodologia do estudo (p=0,705).

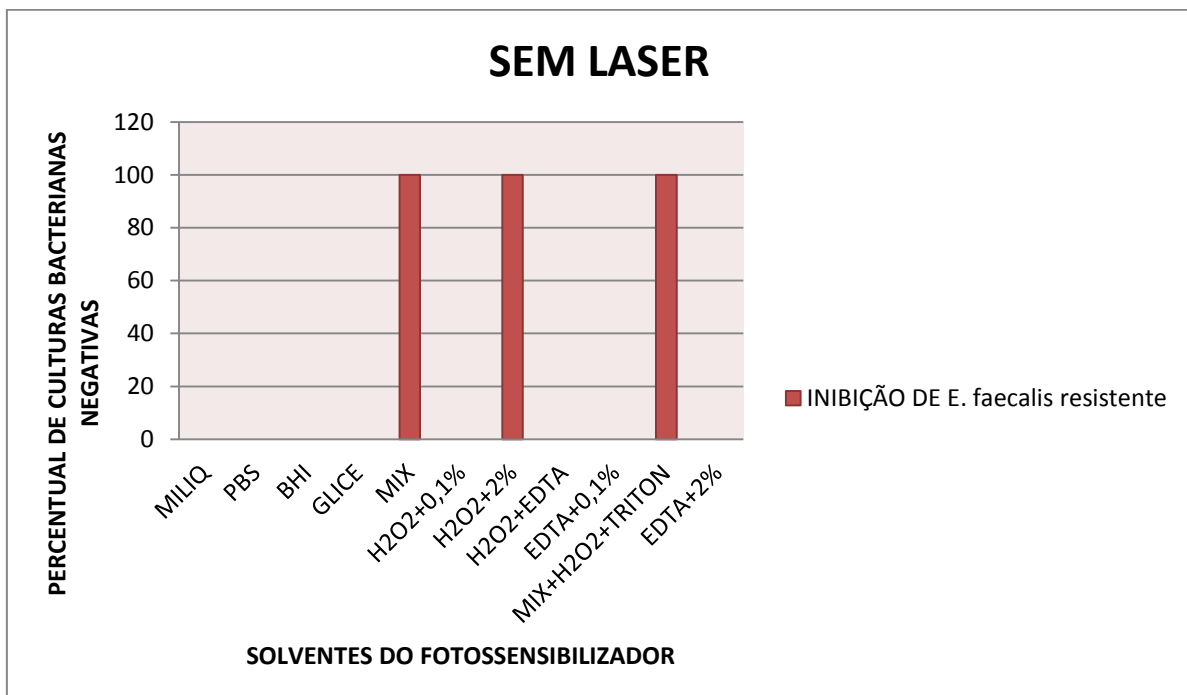


Figura 3: Atividade antibacteriana dos diferentes FS sem a aplicação do laser após 24 horas de incubação contra *E. faecalis* VRE. As formulações de AM dissolvidas em etanol, glicerol e água (MIX), a segunda em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 2% de clorexidina e a última formulação etanol, glicerol, água (MIX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e detergente Triton mostraram-se eficazes na inibição.

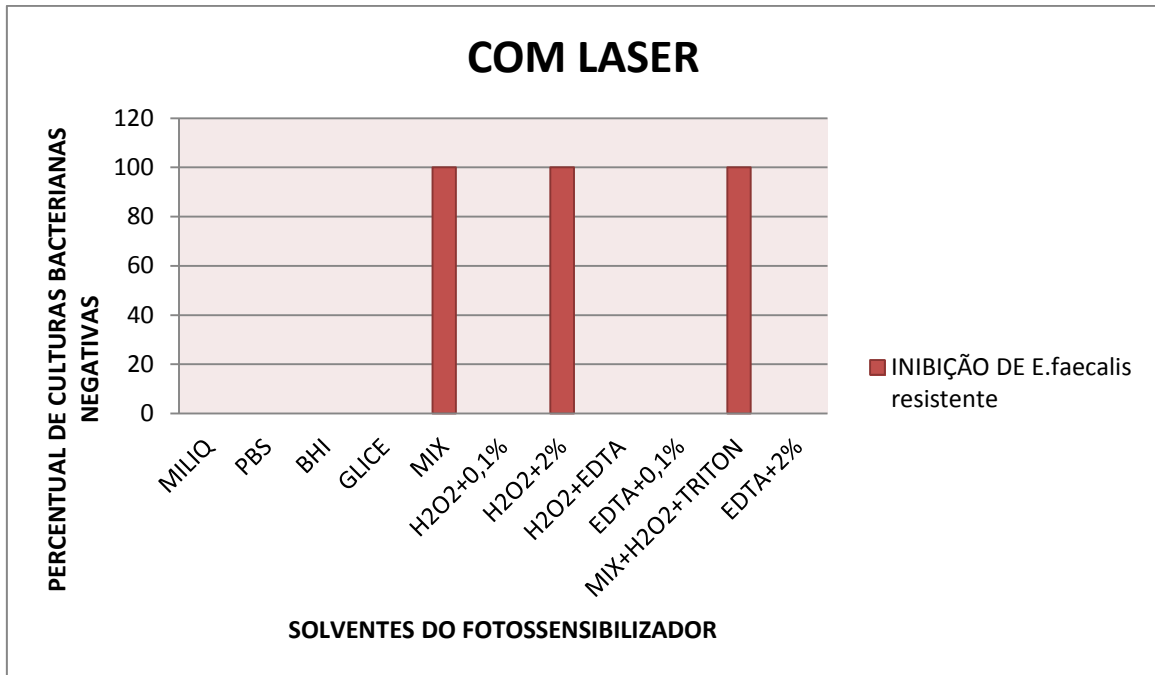


Figura 4: Atividade antibacteriana dos diferentes FS com aplicação do laser após 24 horas de incubação contra *E. faecalis* VRE. As formulações de AM dissolvidas em etanol, glicerol e água (MIX), a segunda em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 2% de clorexidina e a última formulação etanol, glicerol, água (MIX), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e detergente Triton mostraram-se eficazes na inibição.

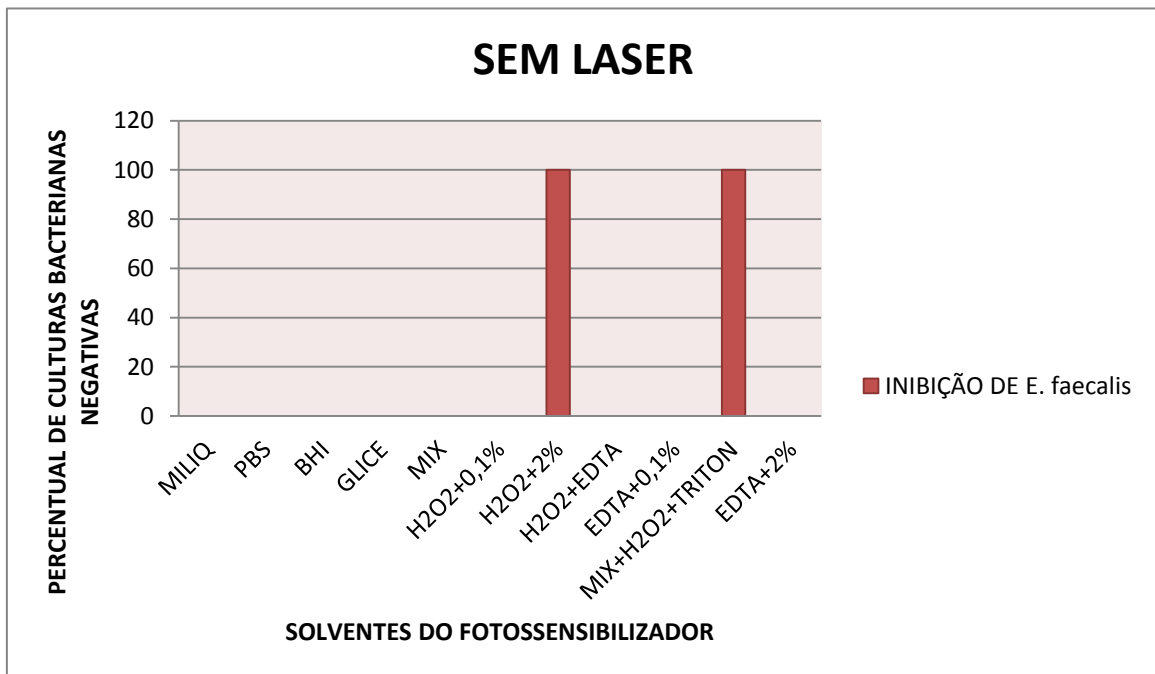


Figura 5: Atividade antibacteriana dos diferentes FS sem aplicação do laser após 24 horas de incubação contra *E. faecalis*. Somente as formulações de AM dissolvidas em peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) e 2% de clorexidina e a formulação etanol, glicerol, água (MIX), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e detergente Triton mostraram-se eficazes na inibição.

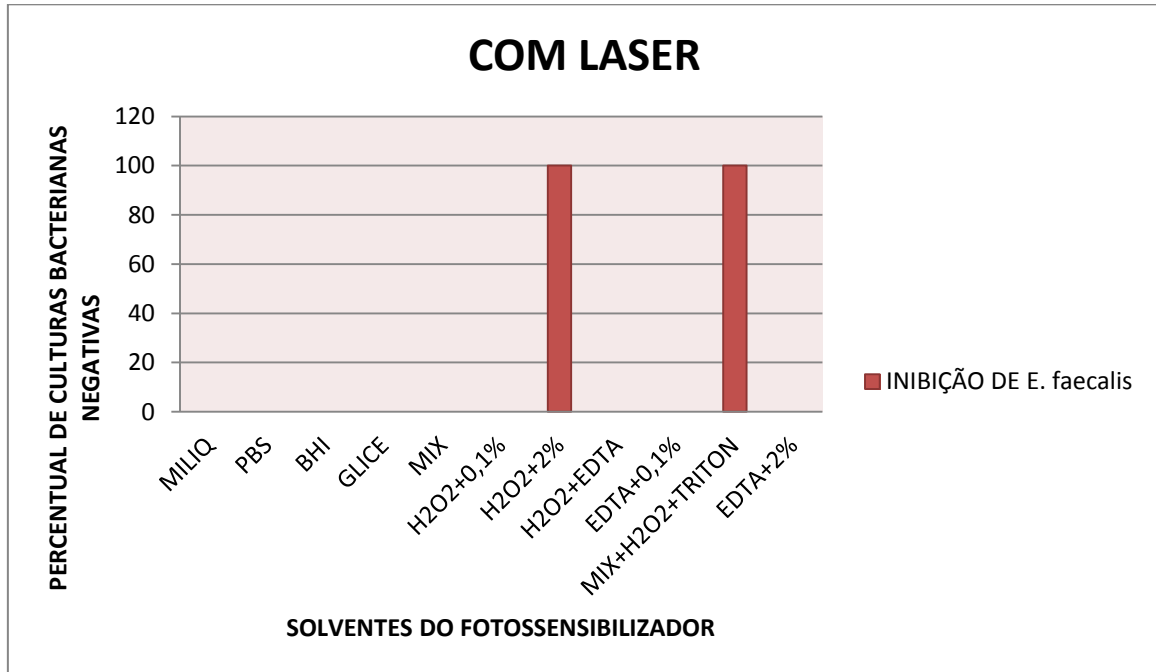


Figura 6: Atividade antibacteriana dos diferentes FS com aplicação do laser após 24 horas de incubação contra *E. faecalis*. Somente as formulações de AM dissolvidas em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 2% de clorexidina e a formulação etano, glicerol, água (MIX), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e detergente Triton mostraram-se eficazes na inibição.

DISCUSSÃO

1. Metodologia:

Em relação ao *Enterococcus faecalis*, a literatura endodôntica mostra diversos estudos demonstrando sua forte associação aos fracassos do tratamento endodôntico, referente à sua capacidade de sobrevivência em condições de escassez nutricional, bem como por sua capacidade de penetração nos túbulos dentinários e de resistência a procedimentos e medicamentos intracanáis (Siqueira et al. 1997, Haapasalo et al. 2005). Foi demonstrada que a bactéria testada produz, ela mesma, espécies reativas de oxigênio, o que pode limitar o efeito da TFD contra essa espécie (Huycke et al, 2002). Fora isso, numa revisão sistemática, Siddiquist et al. (2013) concluíram que a capacidade da TFD em eliminar este microrganismo permanece ainda questionável. No presente estudo foi utilizada uma cepa resistente à vancomicina (VRE) uma bactéria não muito comum, responsável por infecções sistêmicas, especialmente em pacientes debilitados (Horner et al. 2005). Seu uso se deu, especialmente, por ser uma bactéria isolada da região do estudo e por ter poucos estudos do efeito da TFD nessa cepa (Usacheva, Teichert e Biel, 2003).

Para se realizar experimentos que testam a atividade antimicrobiana de qualquer substância é necessário um rigor e padronização das etapas. Com esse intuito, todo o presente experimento foi realizado de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013).

A Tabela 1 mostra claramente que não há um consenso entre qual melhor metodologia *in vitro* a ser estudada. O teste optado de microdiluição em caldo é considerado padrão pela CLSI e é extremamente vantajoso, uma vez que são necessárias mínimas quantidades das substâncias-teste, apresenta baixo custo, é de simples execução, apresenta rápido resultado e é até 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura. Entretanto, há um consumo de muito tempo para preparo e execução e seu resultado é dado através da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. Um problema dessa técnica é a possível presença de precipitados do composto-teste, que pode interferir na avaliação dos resultados. Para dirimir tal inconveniente, cada substância teve seu controle, onde foi colocado num poço só o meio e a substância para visualizar se ela apresentava alguma precipitação sozinha (OSTROSKY et al., 2008). Nenhum composto-teste apresentou precipitação.

2. Tempo de Contato, Composição e Concentração do fotossensibilizador:

O azul de metileno possui pronunciada carga catiônica podendo rapidamente se ligar e penetrar nas células bacterianas, principalmente nas paredes das bactérias G+, como o *Enterococcus faecalis* (Garcez, 2006 e 2008). Entretanto o presente estudo demonstrou que o fotossensibilizador, na formulação simples (dissolvido em água), não apresentou o poder de inibir o crescimento bacteriano, tanto no microrganismo sensível quanto no resistente. Diferentemente de Pelloi (2007), que utilizando o teste de diluição seguido da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), verificou que a presença de AM (dissolvido em água) por 30 minutos, mesmo sozinho, inibiu o crescimento das células, sendo este proporcional às concentrações utilizadas. Vale ressaltar que o tempo de contato do microrganismo com a substância, no presente estudo, foi de cinco minutos, de acordo com a maioria da literatura (Miranda et al. 2012, Stojic et al. 2012, Nunes et al. 2011, Ng et al. 2011, Foschi et al. 2007, Soukos et al. 2006).

Dissolvendo o AM num MIX de glicerol, etanol e água podemos observar que houve a presença de inibição do crescimento bacteriano.

A diluição do AM em clorexidina e peróxido de hidrogênio também apresentou resultado favorável em nosso estudo, assim como para Stojic et al. (2012). Entretanto, sabe-se que a clorexidina 2% é uma molécula com carga positiva, lipofílica e hidrofóbica que interage com os fosfolipídeos e polissacarídeos da membrana celular das bactérias, ocasionando seu efeito antibacteriano (Gomes et al. 2003a). Fora isso, pode ocorrer o efeito sinérgico com o peróxido de hidrogênio, onde a clorexidina atua na parede bacteriana e o peróxido de hidrogênio, nas organelas intracelulares como DNA (Steinberg et al. 1999).

Os estudos divergem também em relação à concentração de azul de metileno utilizada para que ocorra sua maior absorção. Testamos todas as diluições citadas, que variaram de 300 a 7,5µmol/L e com a aplicação do laser de comprimento de onda de sua máxima absorção, 600 a 660nm (Wainwright, 2000), não encontramos nenhuma concentração eficaz em inibir o crescimento bacteriano quando comparados com a substância padrão (5,25%NaOCl). Esses resultados assemelham-se aos de outros autores com metodologias semelhantes (Meire et al. 2012, Miranda et al. 2012, Stojic et al. 2012, Upadya e Kishen 2010, George e Kishen 2007, Muller et al. 2007)

3. Tempo de irradiação, potência e comprimento de onda do laser para eficácia da TFD

O laser escolhido para o estudo apresentou características semelhantes às de estudos anteriores, como comprimento de onda de 660nm e 30mW de potência total (Miranda et al. 2012, Stojic et al. 2012, Nunes et al. 2011, Upadya e Kishen 2010). Em relação a estes estudos, somente Nunes et al. 2011 obtiveram resultados diferentes dos obtidos pelo presente trabalho, entretanto sua metodologia foi *ex vivo*, impedindo uma comparação real dos resultados. Os outros estudos, *in vitro*, também obtiveram como resultado que a TFD não foi eficaz. Em relação aos outros estudos citados na Tabela 1, fica inviável uma comparação dos resultados pela falta de padronização da metodologia.

Não termos encontrado uma eficácia antibacteriana da TFD, neste estudo, pode ter sido causado pelo comprimento de onda do laser não ter sido o ideal. Os estudos vêm demonstrando uma contrariedade entre qual o comprimento de onda ideal para que a atividade antibacteriana seja eficaz. Wainwright (2005) acredita que o comprimento ideal para máxima produção de oxigênio singlete é 656nm. George e Kishen (2007) por outro lado, acreditam que o ideal é 664nm. Garcez et al. (2011) através de experimentos com espectroscopia encontraram que a TFD se expressa melhor quando o FS é ativado pelo comprimento de onda de 660nm.

4. Estudos ex vivo e método de coleta.

Alguns estudos, que utilizaram dentes extraídos para verificar o efeito adicional da TFD ao PQM convencional, apresentaram grandes divergências quanto à eficácia desta terapia. Miranda et al. (2012) não observaram um efeito adicional da TFD, com tempo de irradiação e contato do FS de cinco minutos. Assim como Souza et al. (2010) utilizando uma TFD com dois minutos de contato da substância e quatro minutos de aplicação de laser. Lim et al. (2009), mesmo com tempo de aplicação de laser por 20 minutos encontraram que a TFD convencional pode não ser efetiva em inativar as bactérias endodônticas.

Contrariamente, Nunes et al. (2011) observaram que a TFD, com azul de metileno dissolvido em água e com tempo de irradiação de três minutos, obteve estatisticamente a mesma redução de *Enterococcus faecalis* que o grupo 1% NaOCl (99,65% e 99,99% respectivamente). Ng et al. (2011) concluíram que a TFD, com azul de metileno dissolvido

em PBS e com 7,5 minutos de aplicação do laser (2,5 minutos de intervalo) aprimorou a desinfecção, não eliminando, entretanto, todas as bactérias. Resultado semelhante foi encontrado por Soukos et al. (2006), onde houve 97% de redução bacteriana após a TFD com FS dissolvido em BHI e aplicação do laser por cinco minutos. Fimple et al. (2008) encontraram redução de 80 % das bactérias após a TFD utilizando FS dissolvido em PBS por 10 minutos de contato e com tempo de irradiação de 7,5 minutos (2,5 minutos de repouso) e, na presença somente do FS em PBS houve 66% de redução. Foschi et al. (2007) encontraram 77 % menos bactérias após o uso da TFD com aplicação do laser por 10 minutos. Por outro lado, Muller et al. (2007) concluíram que clorexidina 2% e 0,5% NaOCl foram mais eficazes que o grupo TFD.

Concluindo, nessa miscelânea de tempo de irradiação, tipo de solvente, tempo de contato com o FS, a TFD ainda não pode ser considerada um suplemento eficaz ao PQM convencional na endodontia, uma vez que não foi demonstrado ser mais eficiente que a substância referência (5,25%NaOCl).

A morte bacteriana incompleta pode ocorrer devido: à inabilidade do FS de penetrar no sistema de canais radiculares (Soukos et al. 2006, Lim et al. 2007; Ng et al. 2011, Nunes et al. 2011), à oxigenação insuficiente dentro do SCR (Ng et al. 2011, Nunes et al. 2011), às doses de energia do laser muito altas podem causar rápido consumo de oxigênio molecular (Soukos et al. 2006; Nunes et al. 2011).

Deve-se ressaltar que testes que utilizam coleta dos microrganismos com cones de papel são pouco sensíveis, uma vez que a presença de cultura negativa não significa que o canal está livre de bactérias, já que este teste microbiológico traduz apenas as condições microbiológicas da luz do canal principal (Siqueira et al., 2004a, Berber et al. 2006).

CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho *in vitro* demonstraram que o fotossensibilizador azul de metileno não foi eficaz contra *Enterococcus faecalis* (sensível e resistente à vancomicina), como o irrigante padrão utilizado (5,25%NaOCl). Entretanto, quando dissolvido em diferentes misturas (H₂O₂ + clorexidina 2%, em glicerol, etanol, água + peróxido de hidrogênio + detergente Triton X100 e somente glicerol, etanol, água) obteve-se inibição do crescimento bacteriano. Além disso, o teste estatístico mostrou que a TFD também não foi eficaz na metodologia avaliada tanto na bactéria sensível como na resistente à vancomicina. Como todo experimento laboratorial deve-se tomar cuidado ao extrapolar os resultados para a clínica, justamente por não haver todas as intempéries de anatomia interna do SCR, microbiota variada, formação de biofilme entre outras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International Endodontic Journal* **39**: 10-17.
- Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2008). Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *International endodontic journal* **41**, 227-39.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- Eldeniz AU, Ozer F, Hadimli HH, Erganis O (2007). Bactericidal efficacy of Er Cr YSGG laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with NaOCl irrigation: an ex vivo pilot study. *International endodontic journal* **40**, 112-119.
- Fimple J et al. (2008). Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *Journal of endodontics* **34**, 728-34.
- Fonseca MB, Júnior POT, Pallota RC et al. (2008). Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomedicine and laser surgery* **26**, 209-13.
- Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K et al. (2007). Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers in surgery and medicine* **39**, 782-7.
- Frasson H, Larsson KM, Wolf E (2012). Efficacy of lasers as an adjunct to chemo-mechanical disinfection of infected root canals: a systematic review. *International endodontic journal* **1-12**.
- Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS (2006). Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**: e93-e98.
- Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR (2007). Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* **39**: 59-66.
- Garcez AS, Nunez SC, Baptista MS et al. (2011) Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochemical and Photobiological Sciences* **10**, 483–90.
- George S e Kishen A (2007). Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *Journal of biomedical optics* **12**, 034029(1)-(10).

- Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR et al. (2003a) Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *International Endodontic Journal* **36**, 267–75.
- Gomes BPFA et al (2006). Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Oral Endodontology* **102**, 247-253.
- Grossman LI, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents (1982). *Journal of endodontics* **8**: S10-S12.
- Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S, Mader T, Schmalz G (2012). Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. *International endodontic journal* 1-9.
- Horner R. et al (2005) Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria Antimicrobial susceptibility among isolates of Enterococcus from Hospital Universitário de Santa Maria. *Bras Patol Med Lab* **41**, 391-395.
- Huque J, Kota K, Yamaga M, et al (1998). Bacterial eradication from root dentine by ultrasonic irrigation with sodium hypochlorite. *International Endodontic Journal* **31**, 242–50.
- Huycke MM, Abrams V, Moore DR (2002) *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* **23**, 529–36.
- Jori G et al. (2006). Photodynamic Therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine* **38** 468-481.
- Lim Z, Cheng J L, Lim T W, Teo E G, Wong J, George S, Kishen A (2009). Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Australian Dental Journal* **54**, 108-14.
- Lopes HP, Siqueira JF Jr, Elias CN (2004a). Preparo químico-mecânico dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. Endodontia: biologia e técnica. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi 419-480.
- Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A et al. (2011). Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *Journal of oral science* **53**, 355-60.
- Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG (2009). Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. *International endodontic Journal* **42**, 351-9.
- Meire MA, Coenye T, Nelis H J, De Moor RJG (2012). Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *International endodontic journal* **45**, 482-91.

Miranda RG, Santos EB, Souto RM, Gusman H, Colombo APV (2012). Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal* **46**, 499-505.

Mohammadi, Z e Abbott P (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International endodontic journal* **42**, 288-302.

Muller P, Guggenheim B, Schmidlin PR (2007). Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *European Journal of Oral Sciences* **115**, 77-80.

NCCLS (2003). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Ng R, Singh F, Papamanou D et al. (2011). Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *Journal of endodontics* **37**, 217-22.

Nunes MR, Mello I, Franco GCN et al. (2011). Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. *Photomedicine and laser surgery* **29**, 803-8.

Peloi LS (2007). Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica (Dissertação Mestrado). Maringá, PR, Brasil: Universidade Estadual de Maringá.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT (2003). Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p

Plaetzer K, Kiesslich T, Verwanger T, Krammer B (2003). The modes of cell death induced by PDT: an overview. *Medical laser application* **18**, 7–19.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi Ret al. (2004). Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* **37**, 438–46

Rahimi S, Shahi S, Gholizadeh S et al. (2012). Bactericidal effects of Nd:YAG laser irradiation and sodium hypochlorite solution on *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photomedicine and laser surgery* **30**, 637-41.

Ribeiro Sobrinho AP, Barros MHM, Nicoli JR (2006). Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *Journal of endodontics* **32**, 93-98.

Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL (2011). Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *Journal of endodontics* **37**, 856-9.

Rôças IN, Siqueira JR, Santos KRN (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics* **30**, 315-20.

Sathorn C, Parashos P e Messer H (2007). Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *International endodontic Journal* **40**, 2-10.

Seal GJ, Ng YL, Spratt D, Bhatti M, Gulabivala K(2002). An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *International endodontic journal* **35**, 268-274.

Siddiqui SH, Awan KH e Javed F (2013). Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in infected root canals: a systematic literature review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy* **10**, 632-43.

Siqueira JF Jr, Lopes HP, Elias CN (2004a). Obturação do sistema de canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia: biologia e técnica*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi, 645-691.

Siqueira JF e Rôças IN (2008). Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *Journal of endodontics* **34**, 1291-1301.e3.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997). Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal* **30**, 297-306.

Stojicic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M (2012). Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *International endodontic journal*, 1-11.

Soukos NS, Chen PSY, Morris JT et al. (2006). Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of endodontics* **32**, 979-84.

Souza LC, Brito PRR, de Oliveira JCM et al. (2010). Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* **36**, 292-6.

Steinberg D, Heling I, Daniel I, Ginsburg I (1999) Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus faecalis* and *Staph- ylococcus aureus*. *Journal of Oral Rehabilitation* **26**,151–6.

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics* **32**, 93-8.

Tennert et al. (2014). New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *Journal of endodontics* **40**, 670-677.

Upadya MH e Kishen A (2010). Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *International endodontic journal* **43**, 978-87.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA (2001). Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers in surgery and medicine* **29**, 165-73.

Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA (2003). The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **71**, 87-98.

Vivacqua-Gomes N, Gurgel-Filho ED, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA Souza-FilhoFJ (2005). Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *International endodontic journal* **38**, 697-704.

Wainwright M (2000). Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? *International journal of antimicrobial agents* **16**, 381-94.

Wainwright M (2005). The development of phenothiazinium photosensitisers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 263—272.

Walsh LJ (1997). The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Australian Dental Journal* **42**, 247-54.

Wilson M, Burns T, Prattern J, Pearson GJ (1995). Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low power laser light in the presence of a photosensitiser. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 569-574.

Yavari HR, Rahimi S, Shahi S et al. (2010). Effect of Er, Cr: YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Photomedicine and laser surgery* **28**, S91-6.

REFERÊNCIAS

- BERGMANS, L. et al. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. **International endodontic journal** v. 41, p. 227-39, 2008.
- FIMPLE, J. et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. **Journal of endodontics**, v.34, p. 728-34, 2008.
- FOSCHI, F. et al. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. **Lasers in surgery and medicine**, v. 39, p.782-7, 2007.
- FONSECA, M. B. et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. **Photomedicine and laser surgery**, v. 26, p. 209-13, 2008.
- FRASSON, H.; LARSSON, K. M.; WOLF, E. Efficacy of lasers as an adjunct to chemo-mechanical disinfection of infected root canals: a systematic review. **International endodontic journal**, p. 1-12, 2012.
- GEORGE, S.; KISHEN, A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. **Journal of biomedical optics**, 12, p. 034029(1)-(10), 2007.
- HECKER, S. et al. Establishment of an optimized ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. **International endodontic journal**, p. 1-9, 2012.
- JORI, G. et al. Photodynamic Therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, p. 468-481, 2006.
- 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, p. 340-349, 1965.
- LOPES, H. P.; SIQUEIRA, J. F. JR; ELIAS, C. N. Preparo químico-mecânico dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr. Endodontia: biologia e técnica. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi 419-480, 2004a.
- MEIRE, M. A. et al. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and in an infected tooth model. **International endodontic Journal**, v. 42, p. 351-9, 2009.
- MEIRE, M. A. Evaluation of Nd:YAG and Er:YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. **International endodontic journal**, v. 45, p. 482-91, 2012.
- MIRANDA, R. G. et al. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. **International endodontic journal**, v. 46, p. 499-505, 2012.

MULLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P. R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. **European Journal of Oral Sciences**, v. 115, p. 77-80, 2007.

NG, R. et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. **Journal of endodontics**, v. 37, p. 217-22, 2011.

NUNES, M. R. et al. Effectiveness of photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*, with and without the use of an intracanal optical fiber: an in vitro study. **Photomedicine and laser surgery**, v. 29, p. 803-8, 2011.

PELOI, L. S. Estudos da aplicação do corante azul de metileno em terapia fotodinâmica. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá Maringá, PR, Brasil, 2007.

RAHIMI, S. et al. Bactericidal effects of Nd:YAG laser irradiation and sodium hypochlorite solution on *Enterococcus faecalis* biofilm. **Photomedicine and laser surgery**, v. 30, p. 637-41, 2012.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P.; BARROS, M. H. M.; NICOLI, J. R. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. **Journal of endodontics**, v. 32, p. 93-98, 2006.

RIOS, A. et al. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. **Journal of endodontics**, v. 37, p. 856-9, 2011.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. R.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of endodontics**, v. 30, p. 315-20, 2004.

SEAL, G. J. et al. An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. **International endodontic journal**, v. 35, p. 268-274, 2002.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **Journal of endodontics**, v. 34, p. 1291-1301.e3, 2008.

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **Journal of endodontics**, v. 32, p. 979-84, 2006.

SOUZA L. C. et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **Journal of endodontics**, v. 36, p. 292-6, 2010.

STOJICIC, S. et al. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. **International endodontic journal**, p. 1-11, 2012.

STUART, C. H. et al. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of endodontics**, v. 32, p. 93-8, 2006.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. **Lasers in surgery and medicine**, v. 29, p. 165-73, 2001.

USACHEVA, M. N.; TEICHERT, M. C.; BIEL, M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 71, p. 87-98, 2003.

VIVACQUA-GOMES, N. et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single- or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. **International endodontic journal**, v. 38, p. 697-704, 2005.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International journal of antimicrobial agents**, v. 16, p. 381-94, 2000.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Australian Dental Journal**, v. 42, p. 247-54, 1997.

WAYNE, P. A. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. **CLSI document M100-S23: Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013.

WILSON, M. et al. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low power laser light in the presence of a photosensitizer. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 569-574, 1995.

Anexo A– Normas para publicação – International Endodontic Journal

Disponível em: <onlinelibrary.wiley.com/journal>. Acesso em: 04 dez. 2013.

International Endodontic Journal

The Official Journal of the British Endodontic Society, the European Society of Endodontology, the Flemish Society of Endodontology, the Irish Endodontic Society and the Portuguese Society of Endodontology

Edited By: PMH Dummer

Impact Factor: 2.051

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2012: 21/83 (Dentistry Oral Surgery & Medicine)

Online ISSN: 1365-2591

Top Author Guidelines

Structure

All manuscripts submitted to International Endodontic Journal should include Title Page, Abstract, Main Text, References and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate

Title Page

The title page should bear:

- (i) Title, which should be concise as well as descriptive;
- (ii) Initial(s) and last (family) name of each author;
- (iii) Name and address of department, hospital or institution to which work should be attributed;
- (iv) Running title (no more than 30 letters and spaces);
- (v) No more than six keywords (in alphabetical order);
- (vi) Name, full postal address, telephone, fax number and e-mail address of author responsible for correspondence.

Abstract

Original Scientific Articles should be no more than 250 words giving details of what was done using the following structure:

Aim: Give a clear statement of the main aim of the study and the main hypothesis tested, if any.

Methodology: Describe the methods adopted including, as appropriate, the design of the study, the setting, entry requirements for subjects, use of materials, outcome measures and statistical tests.

Results: Give the main results of the study, including the outcome of any statistical analysis.

Conclusions: State the primary conclusions of the study and their implications. Suggest areas for further research, if appropriate.

Main Text

Original Scientific Article

Introduction: should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and gaps in knowledge. Exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation, or hypothesis to be tested.

Material and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced.

Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (Company, town/city, state, country) included.

Results: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Data should not be duplicated in Tables and Figures.

Discussion: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The Discussion section should progress with a review of the methodology before discussing the results in light of previous work in the field. The Discussion should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Conclusion: should contain a summary of the findings.

Acknowledgements: International Endodontic Journal requires that all sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Grant or contribution numbers may be acknowledged, and principal grant holders should be listed. Acknowledgments should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. See also above under Ethical Guidelines.

References: It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum.

In the text: single or double authors should be acknowledged together with the year of publication, e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990). If more than two authors the first author followed by et al. is sufficient, e.g. (Tobias et al. 1991). If more than 1 paper is cited the references should be in year order and separated by "," e.g. (Pitt Ford & Roberts 1990, Tobias et al. 1991).

Reference list: All references should be brought together at the end of the paper in alphabetical order and should be in the following form.

- (i) Names and initials of up to six authors. When there are seven or more, list the first three and add et al.
- (ii) Year of publication in parentheses
- (iii) Full title of paper followed by a full stop (.)
- (iv) Title of journal in full (in italics)
- (v) Volume number (bold) followed by a comma (,)
- (vi) First and last pages

Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title.

Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction, symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified.

Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible.

Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size.

Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by a thin space (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

Figure legends: Figure legends should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods.

Permissions: If all or part of previously published illustrations are to be used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. This is the responsibility of the authors before submission.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Abbreviations

The International Endodontic Journal adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. When non-standard terms appearing 3 or more times in the manuscript are to be abbreviated, they should be written out completely in the text when first used with the abbreviation in parenthesis.

Permissions

If all or part of previously published illustrations are to be used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. This is the responsibility of the authors before submission.

