

## Estudo piloto da análise comparativa da atividade antimicrobiana da PDT e agentes irrigantes em canais radiculares inoculados com *Enterococcus faecalis* “in vitro”

Caroline Christine Santa-Rosa<sup>1</sup>, Christiane Valente Araújo<sup>2</sup>, Monize Ferreira Figueiredo de Carvalho<sup>3</sup>, Patrícia Valente Araújo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Odontologia, Faculdade São Leopoldo Mandic de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Odontologia, Faculdade de Sete Lagoas, Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

**Objetivo:** O presente estudo piloto “in vitro” avaliou o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio, clorexidina, terapia fotodinâmica e do óleo de girassol ozonizado utilizados como agentes irrigantes na eliminação do *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes humanos extraídos.

**Métodos:** Sessenta raízes de dentes unirradiculares (n = 60) foram selecionadas e autoclavadas para realização do experimento em fluxo laminar. Para a realização do teste de infiltração, confeccionou-se um dispositivo para cada dente que permitiu a contaminação por *Enterococcus faecalis* e posterior preparo químico-mecânico. As amostras foram submetidas ao preparo biomecânico com diâmetro cirúrgico correspondente à lima #45 e mesma conicidade nos terços médio e cervical e receberam protocolo de desinfecção com hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl), Clorexidina a 2% (CHX), óleo de girassol ozonizado a 2400ppm (OGO), PDT após irrigação com soro fisiológico (PDT+S) e PDT após irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5% (PDT+H). As dez raízes restantes constituíram os controles positivo e negativo, sendo cinco dentes para cada grupo. Os controles positivos foram infectados e não foi utilizado nenhum agente irrigante. Os controles negativos foram compostos por dentes não contaminados pelo *E. faecalis*.

**Resultados:** Os resultados da contagem de UFC/mL total e análise descritiva foram realizados. NaOCl e PDT+H apresentaram crescimento bacteriano inferiores aos valores de referência e foi considerado nulo. CHX e PDT+S apresentaram crescimento bacteriano baixo e OGO apresentou crescimento bacteriano moderado.

**Conclusão:** NaOCl e PDT+H apresentaram melhor desempenho em relação aos demais protocolos de desinfecção utilizados. OGO apresentou crescimento bacteriano moderado sugerindo inviabilidade de sua utilização isolada em protocolos de desinfecção em endodontia

**Descritores:** Fotoquimioterapia. Endodontia. Desinfecção.

Submetido: 22/10/2018

Aceito: 09/01/2019

### INTRODUÇÃO

O sucesso da terapia endodôntica depende do desbridamento químico-mecânico

completo do tecido pulpar, de restos de dentina e microrganismos infecciosos e da completa obturação do sistema de canais radiculares (SCR)<sup>1</sup>. A ação de lavagem das soluções

#### Autor para correspondência:

Caroline Christine Santa Rosa

Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Odontologia Restauradora, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP.: 31.270.901.

E-mail: carolinesantarosa@yahoo.com

irrigadoras auxilia na remoção de detritos e material orgânico do interior dos canais radiculares, além de ajudar a lubrificar os instrumentos endodônticos<sup>2</sup>.

Embora a terapia endodôntica nos dias atuais apresente um elevado índice de sucesso, a persistência da infecção nos canais radiculares é a principal causa de insucesso, impedindo o reparo da região apical<sup>2,3</sup>. Muitos casos de insucessos são causados por problemas técnicos, porém existem também lesões refratárias ao tratamento tecnicamente bem realizado<sup>4</sup>. Além de bactérias anaeróbias estritas, espécies aeróbias e anaeróbias facultativas também têm sido encontradas em canais radiculares, muitas vezes associadas a infecções persistentes ou refratárias<sup>2,3</sup>. Destas espécies destacam-se *Streptococcus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de fungos, principalmente do gênero *Candida*<sup>2,5</sup>.

Durante o preparo biomecânico, diversas substâncias químicas são utilizadas como irrigantes<sup>2,5</sup>. Devido a uma série de propriedades como a capacidade de dissolver a matéria orgânica, ação antimicrobiana, lubrificação e neutralização de conteúdos tóxicos, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é atualmente o agente mais utilizado<sup>3,6</sup>. A clorexidina (CHX) tem sido usada na Endodontia como solução irrigadora e medicação intacanal<sup>7</sup>. Sua ação como irrigante endodôntico, como alternativa ao hipoclorito de sódio, é devida às suas propriedades de inibir o crescimento de bactérias comumente encontradas nas infecções endodônticas, grande substantividade e relativa ausência de citotoxicidade<sup>5,7</sup>. O óleo de girassol ozonizado (OGO) produz oxidação letal no protoplasma bacteriano, por alteração nos ácidos graxos poliinsaturados da parede bacteriana, tornando-se microbicida, bactericida, fungicida e parasiticida e também possui ação antiinflamatória e analgésica, com alívio da sintomatologia dolorosa, por regular o metabolismo celular, os mecanismos oxidativos celulares, favorecer a oxigenação tecidual e por ser imunomodulador<sup>8</sup>.

A terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy* - PDT) tem sido utilizada como coadjuvante ao tratamento endodôntico convencional nos últimos anos<sup>9</sup>. A PDT consiste em um tratamento que engloba a ação simultânea de uma fonte de luz e de um agente fotossensibilizante (PS) na presença do oxigênio dos tecidos. Individualmente, cada uma destas substâncias é inócua e quando interagem são capazes de originar espécies citotóxicas que levam à morte celular<sup>10</sup>.

O objetivo do presente estudo piloto “*in vitro*” foi avaliar o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio, clorexidina, terapia fotodinâmica e do óleo de girassol ozonizado utilizados em protocolo de desinfecção na eliminação do *Enterococcus faecalis* em canais radiculares de dentes humanos extraídos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo piloto, foram utilizados 60 dentes humanos (n = 60) unirradiculares hígidos extraídos por razões ortodônticas ou problema periodontal, nas Clínicas de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG), obtidos após autorização dos pacientes pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram observados os aspectos éticos da Resolução 196/96, sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 0458.0.203.000-11).

## SELEÇÃO E PREPARO DOS DENTES

Os dentes foram radiografados e, como critério de inclusão, não deveriam apresentar tratamento endodôntico, calcificações ou ápice incompleto. Os dentes utilizados foram limpos e mantidos em solução de Timol 0,1% a 9 °C. Antes de iniciar o experimento, foram lavados em água destilada por 24h, com objetivo de eliminar os resíduos do timol. Os dentes foram seccionados com disco de carborundum montado em peça de mão em baixa rotação próximo à junção amelocementária, de forma que todas as raízes ficassem com 14 mm de comprimento. Após o seccionamento, foram mantidos em solução salina a 0,9% a 9 °C para evitar a desidratação.

Para a padronização do diâmetro anatômico, uma lima endodôntica #30 tipo Kerr (Dentsply Sirona Endodontics, Ballaigues, Switzerland) foi introduzida no canal radicular a fim de selecionar raízes cujo diâmetro anatômico coincidisse com o diâmetro da lima. Em seguida, para determinação do comprimento de trabalho, a lima foi introduzida no canal até que sua ponta fosse visualizada no forame apical, e deste comprimento foi subtraído 1mm. Os dentes foram autoclavados a 120 °C durante 20 minutos. A partir desta etapa, todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar para manutenção da cadeia asséptica.

## TESTE DE INFILTRAÇÃO

Para a realização do teste de infiltração, confeccionou-se um dispositivo para cada dente como descrito por Mozini<sup>11</sup> e Souza et al<sup>7</sup>. Inicialmente, realizou-se o corte da extremidade de frascos de eppendorfs com lâmina de bisturi para possibilitar que 2mm da raiz ficasse para fora do tubo. Na união entre a raiz e o eppendorf cortado, foi realizado um selamento com resina epóxica de polimerização rápida (Jet, Campo Limpo Paulista, SP). Os eppendorfs com os dentes foram colocados em tubos de vidro de 13ml, contendo 9ml do meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid Ltda, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) em volume suficiente para que os ápices das raízes permanecessem imersos no meio líquido. Para que não ocorresse contaminação externa, foi realizado também um selamento com resina epóxica entre o frasco de vidro e o tubo de eppendorf. Após esse procedimento, os espécimes foram armazenados em estufa a 37 °C por 24 horas para confirmação da sua esterilidade.

## CONTAMINAÇÃO DOS DENTES COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

O microrganismo escolhido para o teste de infiltração foi o *Enterococcus faecalis* (ATCC - 29212). Para o crescimento da cultura do *E. faecalis*, foram utilizados 200µl da cepa microbiana em 2ml de BHI armazenados em estufa a 37 °C por 24 horas. Para o preparo do inóculo, realizou-se a diluição da cultura retirando-se 200 µl da suspensão de *E. faecalis* que foi transferida para um tubo de hemólise contendo 1,8 ml de BHI, resultando em uma concentração de aproximadamente  $1 \times 10^7$  UFC/ml. Os dentes dos grupos experimentais e o controle positivo receberam inóculo do *E. faecalis* a cada três dias, por 30 dias, ou até apresentarem crescimento bacteriano. Os espécimes do grupo controle negativo não receberam inoculação bacteriana. Para a realização da inoculação, 10µl do inóculo foi depositado no espaço preparado para contenção intrarradicular em todos os espécimes com o auxílio de um micro pipetador. Os dispositivos foram colocados em recipientes plásticos e incubados em estufa microbiológica a 37 °C durante o tempo do experimento. Após a turvação do líquido no interior do dispositivo contendo as raízes contaminadas, a data e o número do espécime eram anotados. A turvação é o indicativo de que o crescimento bacteriano ocorreu devido à infiltração bacteriana e

esse conteúdo foi submetido aos testes microbiológicos<sup>12</sup>.

A fim de analisar o crescimento do *E. faecalis* e comprovar a ausência de contaminação externa foram realizados os testes de morfologia colonial em placas de ágar Müeller Hinton. Amostras do líquido proveniente dos dispositivos e do inóculo utilizado para contaminação das raízes foram coletadas, semeadas em placas de ágar Müeller Hinton e armazenadas a 37 °C por 24 horas para verificação do crescimento bacteriano por meio da análise da morfologia colonial. Em seguida, foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro coradas pela coloração de Gram para identificação da morfologia microbiana.

## GRUPOS EXPERIMENTAIS

Cinquenta dentes foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais com dez dentes cada (n = 10), de acordo com o protocolo de desinfecção utilizado após a infecção do canal radicular com *Enterococcus faecalis*. No Grupo 1, os dentes foram irrigados com hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl); no Grupo 2 os dentes foram irrigados com Clorexidina a 2% (CHX); no Grupo 3 o agente de irrigação utilizado foi o óleo de girassol ozonizado a 2400ppm (OGO); no Grupo 4 os dentes foram submetidos à PDT após irrigação com soro fisiológico (PDT+S) e no Grupo 5, os dentes foram submetidos à terapia fotodinâmica após irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5% (PDT+H). As dez raízes restantes constituíram os controles positivo e negativo, sendo cinco dentes para cada grupo. Os controles positivos foram infectados e não foi utilizado nenhum agente irrigante. Os controles negativos, compostos por dentes não contaminados pelo *E. faecalis*, foram armazenados em estufa a 37 °C para confirmação da sua esterilidade.

A confecção do batente apical foi realizada com três instrumentos acima do diâmetro anatômico anteriormente determinado (limas K #35, 40, 45). Durante todo o preparo, realizou-se a irrigação/aspiração com os agentes microbianos propostos de acordo com os grupos previamente definidos, a saber:

- NaOCl: 2ml de NaOCl a 2,5% durante um minuto para cada lima;
- CHX: 2 ml de CHX a 2% durante um minuto para cada lima;
- OGO: 2ml de óleo de girassol ozonizado a 2400ppm durante um minuto para cada lima;

- PDT+S: aplicação da PDT após irrigação com soro fisiológico durante dois minutos para cada lima;
- PDT+H: aplicação da PDT após irrigação com NaOCl a 2,5% conforme descrito para o grupo de NaOCl.

A aplicação da PDT foi avaliada isoladamente ou em associação com o hipoclorito de sódio. O protocolo de aplicação foi utilizado conforme descrito por Araújo et al<sup>13</sup>. Após cinco minutos de tempo de pré-irradiação, tempo no qual o agente fotossensibilizante azul de metileno (MB) (50mg/L) foi deixado no interior do canal radicular antes da exposição à fonte de luz, o excesso foi removido com o auxílio de um cone de papel absorvente #25. O canal radicular foi irradiado com um laser vermelho Laser Duo MMOptics (660nm, 40mW de potência) (MMO, São Paulo, Brasil), com o auxílio de uma fibra óptica intracanal por 60s, resultando em uma dose de energia de 60J/cm<sup>2</sup>.

O conteúdo dos canais radiculares foi coletado após lavagem dos condutos com uma aplicação coronal de 1mL de solução salina tamponada estéril (PBS) com uma seringa de irrigação. A suspensão bacteriana foi então coletada em um tubo de eppendorf de 1,5mL

posicionado abaixo do forame apical e medida em espectrofotômetro. Após vórtex por 20 segundos, realizaram-se diluições seriadas e alíquotas de 100mL foram plaqueadas em ágar sangue e incubadas anaerobicamente por 7 dias conforme Soukos et al<sup>14</sup>. O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi obtida por contagem visual. Os resultados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva.

## RESULTADOS

Os resultados da contagem total de UFC/mL em Ágar Sangue foram tabulados (Tabela1) e a análise descritiva realizada. NaOCl e PDT+H apresentaram crescimento bacteriano muito inferiores aos valores de referência, devido a isso o crescimento bacteriano foi considerado nulo para esses grupos. (Tabela 1). CHX e PDT+S apresentaram crescimento bacteriano baixo e OGO apresentou crescimento bacteriano moderado de acordo com os valores de referência (Tabela 1). Os controles positivos apresentaram crescimento bacteriano alto uma vez que foram infectados e nenhum protocolo de descontaminação foi utilizado. Os controles negativos, não apresentaram crescimento bacteriano (Tabela 1).

**Tabela 1** – Quantidade de colônias microbianas encontradas

Grupos	Crescimento <i>E. faecalis</i>
NaOCl	Nulo
CHX	Baixo
OGO	Moderado
PDT+S	Baixo
PDT+H	Nulo
Controle positivo	Alto
Controle Negativo	Nulo

Baixo crescimento: valores  $\leq 10^1$  UFC

Moderado crescimento: valores entre  $10^1$  a  $10^2$  UFC

Alto crescimento: valores entre  $10^2$  a  $10^3$  UFC

Muito alto: valores  $\geq 10^3$  UFC

## DISCUSSÃO

A desinfecção do sistema de canais radiculares é, sem dúvida, um componente fundamental do sucesso do tratamento endodôntico. Técnicas contemporâneas incluem o desbridamento mecânico e a modelagem

com ênfase em vários sistemas mecanizados de níquel-titânio (NiTi), irrigação intracanal com antimicrobianos/agentes de dissolução de tecidos e medicação intracanal<sup>15</sup>. No entanto, a complexidade do sistema de canais radiculares torna o desbridamento completo e remoção bacteriana com instrumentação,

irrigação e medicações intracanal virtualmente impossíveis<sup>16</sup>. Numerosos estudos verificaram que a eliminação completa de bactérias do SCR não pode ser consistentemente alcançada com nenhuma das técnicas e combinações usadas atualmente<sup>17</sup>.

*E. faecalis* foi usado neste estudo porque esta bactéria é um dos microrganismos encontrados nos canais radiculares infectados e também em infecções secundárias<sup>2</sup>. Além do mais, é capaz de formar biofilme, que confere resistência à fagocitose, anticorpos e agentes antimicrobianos<sup>18</sup>.

Em busca de novos métodos para fornecer desinfecção adicional para o sistema de canais radiculares e, provavelmente, melhorar o resultado do tratamento, novas técnicas incluindo diversos comprimentos de onda de laser<sup>19</sup>, hidráulicos<sup>20</sup>, sônicos<sup>21</sup> e ultrassônicos<sup>22</sup> além de ozonioterapia<sup>23</sup> e terapia fotodinâmica<sup>24</sup> têm sido propostos na literatura.

No presente estudo foi detectado crescimento bacteriano em todos os grupos utilizados em proporções diferentes. No grupo NaOCl, observou-se crescimento bacteriano foi considerado nulo. O hipoclorito de sódio atua como solvente orgânico e adiposo que degrada os ácidos graxos e os transforma em sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool), reduzindo a tensão superficial da solução remanescente (reação de saponificação). Autores relatam que instrumentação associada a um irrigante antimicrobiano, como NaOCl, produz mais culturas negativas do que a instrumentação isolada<sup>25</sup>. No entanto, mesmo com o uso de NaOCl, a remoção de bactérias dos sistemas de canais radiculares após a instrumentação permanece uma meta foi inatingível, o que também pode ser observado no presente estudo.

No grupo CHX, o crescimento bacteriano foi considerado baixo. A CHX é um agente antimicrobiano de amplo espectro, ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras<sup>1</sup>. Devido à sua natureza catiônica, o CHX é capaz de se ligar eletrostaticamente às superfícies carregadas negativamente de bactérias, danificando as camadas externas da parede celular e tornando-a permeável<sup>1</sup>. Dependendo da sua concentração, o CHX pode ter efeitos bacteriostáticos e bactericidas e substantividade<sup>1</sup>. Segundo Basrani & Haapasalo (2012)<sup>1</sup>, 2% de CHX foi muito eficaz na eliminação de um biofilme de *E. Faecalis*. A eficácia antibacteriana da CHX na redução de bactérias em canais radiculares infectados *in vivo* tem sido investigada em vários estudos.

Ringel et al<sup>26</sup> relataram que o hipoclorito de sódio foi significativamente mais eficaz do que a clorexidina quando os canais radiculares infectados foram irrigados por 30 minutos por qualquer uma das soluções. Entretanto, um estudo mais recente também baseado em técnica de cultura não revelou diferença significativa entre a eficácia antibacteriana do NaOCl e a CHX líquida quando utilizados como irrigantes durante o tratamento de canais infectados.

Em relação ao OGO, o crescimento bacteriano apresentou-se maior em relação aos demais grupos. Recentemente, o ozônio foi introduzido na odontologia por seu efeito antibacteriano, especialmente para a eliminação de patógenos endodônticos e periodontais<sup>27</sup>. Acredita-se que seja uma alternativa ao NaOCl na endodontia em relação ao seu efeito antimicrobiano sobre os microrganismos resistentes/persistentes. O ozônio mostrou-se eficaz para formas planctônicas de *E. faecalis* em vez de biofilmes<sup>28</sup>. Nagayoshi et al<sup>29</sup> utilizando a água ozonizada na concentração de 4 mg/L, avaliaram o efeito sobre *E. faecalis* e *Streptococcus mutans* inoculados em dentes bovinos. Os autores verificaram que houve um decréscimo significativo dessas bactérias intratubulares, que foi melhorado com a agitação dos meios, onde seu efeito foi semelhante estatisticamente à solução de hipoclorito de sódio 2,5%. O óleo ozonizado é um composto que mistura o gás com óleo, obtido mediante descargas elétricas em moléculas de oxigênio, tornando-se mais estável. Esta reação produz compostos oxigenados, como hidroperóxidos, aldeídos, peróxidos, diperóxidos e poliperóxidos, que são responsáveis pela atividade biológica dos óleos vegetais ozonizados. A gama de compostos oxigenados gerados na reação do ozônio com os óleos depende das condições no momento da mistura, como da temperatura, a agitação da reação da mistura, a concentração de ozônio utilizada<sup>30</sup>. Sugere-se que os resultados desse trabalho não acompanham os achados pela literatura em relação a eficácia da ozonioterapia devido ao veículo oleoso utilizado, o qual apresenta viscosidade e escoamento incompatíveis com as características de uma substância irrigadora ideal.

No grupo PDT+S, o crescimento bacteriano foi maior em relação aos grupos NaOCl, CHX e PDT+H. Garcez et al<sup>9</sup> mostraram que o tratamento endodôntico isolado foi capaz de reduzir 90% das bactérias, enquanto que a PDT apresentou redução de 95% e a combinação desses dois protocolos foi capaz de reduzir as

bactérias em 98%. Em outro estudo, Garcez et al<sup>10</sup> mostraram que o tratamento endodôntico sozinho pode produzir uma diminuição significativa na contagem microbiana, enquanto que na combinação de tratamento endodôntico com PDT todos os dentes se mostraram livres de bactérias corroborando os resultados desse estudo. A PDT tem sido estudada como uma abordagem promissora para erradicar bactérias patogênicas orais que causam doenças como periodontite, periimplantite e cárie<sup>10</sup>.

Várias estratégias adjuvantes ao preparo químico-mecânico têm apresentado resultados significantes na desinfecção do sistema de canais radiculares, e têm sido recomendadas para aumentar o nível de desinfecção. No presente estudo piloto, NaOCl e PDT+H apresentaram melhor desempenho em relação aos demais protocolos de desinfecção utilizados, enquanto o grupo do OGO apresentou crescimento bacteriano moderado sugerindo inviabilidade de sua utilização isolada em protocolos de desinfecção em endodontia. Apesar dos resultados apresentados neste estudo terem sido promissores em relação ao uso da PDT, estudos laboratoriais e clínicos adicionais são necessários para determinar parâmetros mais eficientes e seguros do uso da PDT em protocolos de desinfecção do SCR. Sugere-se também a utilização de um meio menos viscoso para o ozônio afim de permitir características melhor escoamento do SCR. As perspectivas futuras convergem para parâmetros de tratamento para a desinfecção endodôntica ótima, a desorganização mais efetiva do biofilme radicular e utilização em protocolos de revascularização pulpar.

## REFERÊNCIAS

1. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *End Topics*. 2012Sep;27(1):74-102.
2. Afkhami F, Akbari S, Chiniforush N. *Enterococcus faecalis* elimination in root canals using silver nanoparticles, photodynamic therapy, diode laser, or laser-activated nanoparticles: an in vitro study. *J Endod*. 2017Feb;43(2):279-82.
3. Beltes C, Economides N, Sakkas H, Papadopoulou C, Lambrianidis T. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy using indocyanine green and near-infrared diode laser against *enterococcus faecalis* in infected human root canals. *Photomed Laser Surg*. 2017May;35(5):264-9.
4. Garcez AS, Arantes-Neto JG, Sellera DP, Fregnani ER. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Dec;12(4):575-80.
5. Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S, Palazzi F. Recent advances in root canal disinfection: a review. *Iran Endod J*. 2017 Fall;12(4):402-6.
6. Xhevdet A, Stubljar D, Kriznar I, Jukic T, Skvarc M, Veranic P, et al. The disinfecting efficacy of root canals with laser photodynamic therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014 Winter;5(1):19-26.
7. Souza MA, Lima G, Pazinato B, Bischoff KF, Palhano HS, 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*. 2017 Sep;19:170-4.
8. Buliés JC. Una solución para exposiciones óseas postraumáticas: asociación de injerto de epiplon mayor con ozonoterapia. *Rev Cubana Invest Biomed*. 1996;15(2):1-9.
9. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod*. 2010 Sep;36(9):1463-6.
10. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):138-42.
11. Mozini ACA. Influência do remanescente de obturação, após preparo para contenção intra radicular, na infiltração cervical para *Enterococcus faecalis*. Ribeirão Preto. Dissertação [Mestrado] - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade de Ribeirão Preto; 2006.
12. Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, et al. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. *Int Endod J*. 2018 Jan;51 Suppl 1:e23-e34.
13. AraújoPVG, TeixeiraKIR, LanzaLD, CortesME, Poletto LTA. In vitro lethal photosensitization of *S.mutans* using methylene blue and toluidina blue O as photosensitizers. *Acta Odont Latinoam*. 2009;22:93-7.

14. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):143-66.
15. Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *J Endod*. 2014 Jul;40(7):891-8.
16. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SS, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Aug;22(4):266-71.
17. Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod*. 1999 May;25(5):332-5.
18. Pan J, Sun K, Liang Y, Sun P, Yang X, Wang J, et al. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with enterococcus faecalis biofilms in vitro. *J Endod* 2013;39:105-10.
19. Sahar-Helft S, Stabholtz A, Moshonov J, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D. Effect of Er:YAG laser-activated irrigation solution on Enterococcus Faecalis biofilm in an ex-vivo root canal model. *Photomed Laser Surg*. 2013 Jul;31(7):334-41.
20. Heilborn C, Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Cleaning efficacy of an apical negative-pressure irrigation system at different exposure times. *Quintessence Int*. 2010 Oct;41(9):759-67.
21. Huffaker SK, Safavi K, Spangberg LS, Kaufman B. Influence of a passive sonic irrigation system on the elimination of bacteria from root canal systems: a clinical study. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1315-8.
22. Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al. Molecular microbiological evaluation of passive ultrasonic activation as a supplementary disinfecting step: a clinical study. *J Endod*. 2013b Feb;39(2):190-4.
23. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, et al. Effectiveness of ozone against endodontic pathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J*. 2009 Jan;42(1):3-13.
24. Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. An alternative regimen for root canal disinfection. *Br Dent J*. 2006 Jul 22;201(2):101-5.
25. Estrela C, Barbin E, Spanó J, Marchesan M, Pécora J. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.
26. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. *In vivo* evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod*. 1982;8:200-4.
27. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R and Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of Enterococcus faecalis with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod*. 2012;38:523-6.
28. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of Enterococcus faecalis. *Int Endod J*. 2005;38:22-9.
29. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 2004a;19(4):240-6.
30. Diaz MF, Hernandez R, Martinez G, Vidal G, Gómez M, Fernández H, et al. Comparative study of ozonized olive oil and sunflower oil. *J Braz Chem Soc*. 2006;17(2):403-7.

## A pilot study of the comparative analysis of the antimicrobial activity of PDT and irrigating agents in root canals inoculated with *Enterococcus faecalis* “*in vitro*”

**Aim:** The present “*in vitro*” pilot study evaluated the antimicrobial effects of sodium hypochlorite, chlorhexidine, photodynamic therapy, and ozonated sunflower oil, which were used as irrigating agents in the elimination of *Enterococcus faecalis* in the root canals of extracted human teeth.

**Methods:** Sixty roots of single-root teeth (n = 60) were selected and autoclaved to perform the laminar flow experiment. To perform the infiltration test, a device was constructed for each tooth, which allowed for contamination by *Enterococcus faecalis*, and the tooth's subsequent chemical-mechanical preparation. The samples were submitted to biomechanical preparation with surgical diameter, corresponding to file #45 and the same taper in the middle and cervical thirds, and received a disinfection protocol with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), chlorhexidine 2% (CHX), ozonized sunflower oil at 2400ppm (OGO), PDT after irrigation with saline solution (PDT+S), and PDT after irrigation with 2.5% sodium hypochlorite (PDT + H). The remaining ten roots were positive and negative controls, with five teeth in each group. Positive controls were infected, and no irrigating agent was used. Negative controls consisted of teeth that were not contaminated by *E. faecalis*.

**Results:** The results of the total CFU count and descriptive analysis were performed. NaOCl and PDT+H presented a bacterial growth of much lower t than the reference values and was considered null. CHX and PDT+S presented low bacterial growth, while OGO presented moderate bacterial growth.

**Conclusion:** NaOCl and PDT + H presented better performance in relation to the other disinfection protocols used in this study. OGO presented moderate bacterial growth, suggesting its unviable use in endodontic disinfection protocols.

**Uniterms:** Photochemotherqapy. Endodontics. Disinfection.