

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
ARARAQUARA**

**Roberta Vieira Farac**

***Avaliação do Efeito Bactericida do Ozônio  
Associado ao Propilenoglicol em canais  
radiculares contaminados com Enterococcus  
faecalis em Diferentes Períodos de Tempo de  
Armazenagem***

**ARARAQUARA  
2010**



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

**Roberta Vieira Farac**

***Avaliação do Efeito Bactericida do Ozônio Associado ao  
Propilenoglicol em canais radiculares contaminados com  
Enterococcus faecalis em Diferentes Períodos de Tempo de  
Armazenagem***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do título de mestre em Odontologia.

*Orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho  
Co-orientador: Antonio Carlos Pizzolitto*

ARARAQUARA  
2010

Farac, Roberta Vieira

Avaliação do efeito bactericida do ozônio associado ao propilenoglicol em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* em diferentes períodos de tempo de armazenagem / Roberta Vieira Farac.– Araraquara: [s.n.], 2010.

106 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

1. Ozônio 2. Tratamento do canal radicular 3. *Enterococcus faecalis* I. Título

***Roberta Vieira Farac***

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA DO OZÔNIO  
ASSOCIADO AO PROPILENOGLICOL EM CANAIS  
RADICULARES CONTAMINADOS COM ENTEROCOCCUS  
FAECALIS EM DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO DE  
ARMAZENAGEM.**

Comissão Julgadora

Presidente e orientador: Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

2º Examinador: Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte

3º Examinador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara, 29 de março de 2010.

# *Dados curriculares*

## *Roberta Vieira Farac*

05 de abril de 1979	Nascimento em São Paulo-SP, Brasil
Filiação	Roberto Farac Galata Carmen Elizabeth Vieira Farac
1998-2001	Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
2005-2006	Curso de Pós Graduação em nível de Especialização, área de concentração em Odontogeriatría na Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas (APCD)
2008-2010	Curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado em Odontologia, Área de concentração em Endodontia, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Associações	APCD – Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas  SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

## DEDICATÓRIA

*A Deus e Nossa Santa Mãe,*

fonte de todo amor, luz e força. Obrigada por permitir viver mais este momento.

*Aos meus avós Catharina, Rubens e Antônio*

sempre estiveram ao meu lado, por todos os dias que com muito carinho e dedicação educaram-me. Infelizmente não posso mais vê-los para dar um abraço de muito obrigada, mas com certeza, estão muito felizes por mais esta conquista.

*Aos meus pais Carmen e Roberto,*

por estarem comigo, apoiando-me em qualquer decisão, nos momentos bons e naqueles não tão bons. Obrigada pela força e coragem e pelo sacrifício que fizeram pelos meus estudos. Meu eterno muito obrigada pela pessoa que sou e pela profissão alcançada. Tudo que consegui até hoje, devo tudo a vocês.

*Ao meu marido Alexandre,*

exemplo do verdadeiro amor e companheirismo. Obrigada por permitir a realização desta etapa, por sonhar os meus sonhos, pela coragem e fé que me transmitiu todas as vezes que precisei. Obrigada pela filha maravilhosa que temos. Amo você eternamente.

*A minha querida e amada filha Catharina*

Durante este curso, concretizou o meu sonho mais sublime: ser mãe. Tão pequena e cedeu algumas horas do dia para que eu pudesse redigir a dissertação do mestrado. Desculpe pelos dias que fiquei longe, distante do seu mundo. Te amo muito, minha linda!!

## *A minha família*

Irmãos Rafael e Gabriel, pelo apoio, incentivo e amizade. Vocês são pessoas indispensáveis na minha vida, a quem tenho muita admiração e muito prazer em poder chamá-los de irmãos.

Cunhadas Glaucia, Sandra e Valéria pelo carinho, ombro amigo e por estarem ao meu lado em todos os momentos que foram difíceis para mim.

Sobrinha Yasmin, pelo seu jeitinho de ser, pelas brincadeiras que tornam a vida mais divertida.

A minha querida avó Emília, pelas orações e constante torcida por todas as minhas conquistas.

*Aos meus sogros Vera e Valentim,*

obrigada por permitirem fazer parte de sua família, pelo maravilhoso filho a quem educaram, pelo carinho, apoio e incentivo e por serem pais e acima de tudo maravilhosos avós.

*Amo muito todos vocês!*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho*

Orientador e acima de tudo, amigo e verdadeiro mestre. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, companheirismo, respeito, paciência durante todo o curso de mestrado. Obrigada pelo apoio numa das fases mais importantes da minha vida.

*A profa e vice-diretora Dra. Andrea Montandom,*

por ter me ajudado a dar os primeiros passos na Odontogeriatrics, pelo carinho, amizade, conselhos e incentivo para realizar o mestrado.

*Aos docentes do curso de Pós-graduação de Endodontia,*

Mário Tanomaru Filho, Juliane Guerreiro Tanomaru, Renato de Toledo Leonardo, Roberto Miranda Esberard e Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert, pelos conhecimentos transmitidos durante o curso de Mestrado.

*Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolito,*

pelos seus conhecimentos de microbiologia, pela paciência ao ensinar, por permitir freqüentar o laboratório de Microbiologia Clínica da faculdade de Ciências Farmaceuticas da Unesp.

*Profa Dra. Denise Tibério,*

pelos ensinamentos profissionais, conselhos, incentivo, desde minha época de recém formada, por confiar em mim, quando nem eu mesma confiava. Seu amor a profissão e principalmente à Odontogeriatrics fazem de você uma pessoa especial a quem sou discípula. Obrigada pela amizade, companheirismo e confiança que hoje compartilhamos.

*As grandes amigas Regina e Renata,*

que conheci durante o curso de mestrado e que com certeza nossa amizade perpetuará por toda a vida. Obrigada pelo incentivo, pelos desabafos, por todos os momentos que estiveram ao meu lado. Vocês são ótimas profissionais, com certeza irão colher muitos frutos.

*Amigos do mestrado*

Geraldine, Paula, Carol, Naiana pela amizade conquistada, por todos os momentos alegres e companheirismo.

*A Maria do Carmo,*

técnica de laboratório de microbiologia clínica, por ser muito atenciosa e prestativa, pela ajuda na parte experimental, pela amizade e carinho.

*A Lilian Maekawa,*

colega de profissão e agora mais que uma amiga, por todas as horas que oportuneei e que precisei de seus conhecimentos imprescindíveis para a confecção do trabalho. Sempre ajudou com muito carinho e paciência. Meus eternos agradecimentos.

*A Dra. Rachel,*

prima e colega de profissão pelo carinho, conselhos, ensinamentos e principalmente ajuda profissional durante todos estes anos.

*A amiga Juliana*

por todas as vezes que me acolheu profissionalmente e pela amizade conquistada ao longo dos anos.

*Aos amigos do grupo de oração Azinheira de Fátima,*

pelas orações, pelos ensinamentos bíblicos e por fazerem conhecer a verdadeira amizade da fé.

*Aos amigos e colegas de profissão do Sindicato dos*

*Comerciários de São Paulo,*

pelo incentivo, apoio e por acreditarem em mim.

## *AGRADECIMENTOS*

À Faculdade de Odontologia de Araraquara nas pessoas do Exm. Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e vice-diretora Profa. Dra. Andreia Montandom

Aos professores que fazem parte do Curso de Pos-graduação de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A empresa Biodinâmica pelos materiais doados para a confecção do trabalho.

Aos funcionários da disciplina de Endodontia em especial, Marinho, Creusa, Célia, Cida e Pedro, pela atenção e carinho.

À Mara e aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção e boa vontade.

## SUMÁRIO

Resumo	11
Abstract	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DE LITERATURA	16
PROPOSIÇÃO	63
MATERIAL E MÉTODO	64
RESULTADOS	74
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXOS	102

## Resumo

Farac RV. Atividade antimicrobiana de diferentes medicações em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* nos períodos de 7 e 14 dias. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

O presente estudo avaliou, *ex vivo*, atividade antimicrobiana do ozônio, associado ao veículo propilenoglicol e ao hidróxido de cálcio em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. Foram utilizados 50 dentes humanos unirradiculados, doados pelo Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Após remoção das coroas dentárias, os canais radiculares foram instrumentados até uma lima endodôntica tipo kerr de número 50, e em seguida, os espécimes foram esterilizados, e os canais radiculares contaminados com *E. faecalis* e incubados a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por 21 dias. Os espécimes foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais, de acordo com a medicação utilizada: GI – Ozônio com propilenoglicol (n=11); GII - hidróxido de cálcio com paramonoclorofenolcanforado - PMCC (n=11), GIII – propilenoglicol com pó de hidróxido de cálcio ozonizado (n=11), GIV – grupo controle positivo – não foi colocada nenhuma medicação (n=11) e GV – grupo controle negativo – não foram contaminados (n=6). As coletas foram realizadas após sete e quatorze dias e o crescimento microbiano verificado por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *E. faecalis*. Os resultados que foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn e também pelo teste não-paramétrico de Friedman sendo ambos com um nível de significância de 0,05, mostraram que o propilenoglicol ozonizado e o hidróxido de cálcio com PMCC reduziram estatisticamente o número de bactérias quando comparados ao grupo controle positivo em 7 e 14 dias, não apresentando diferenças estatísticas entre eles; o hidróxido de cálcio ozonizado não reduziu estatisticamente o número de bactérias quando comparados ao grupo controle positivo em 7 e 14 dias e o propilenoglicol ozonizado e o hidróxido de cálcio PMCC não apresentaram diferença estatística entre eles em 7 e 14 dias. Em uma ordem decrescente de ação bactericida nos dois períodos analisados, encontra-se o hidróxido de cálcio PMCC, seguido do propilenoglicol ozonizado e hidróxido de cálcio ozonizado.

Palavras chaves: Ozônio; tratamento do canal radicular; enterococcus faecalis

## Abstract

Farac RV. Evaluation of the Bactericidal Effect of Ozone Associated with Propylene in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* in Different Time Periods of Storage[Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

This study evaluated in vitro bactericidal effect of ozone associated with the vehicle propylene glycol and calcium hydroxide in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. It used 50 single-rooted human teeth, donated by the teeth of the Faculty of Dentistry of Araraquara. After removal of dental crowns, root canals were instrumented to an endodontic kerr file number 50, and then the specimens were sterilized, and the root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* and incubated at  $37 \pm 1$  ° C for 21 days. The specimens were randomly divided into five experimental groups, according to the medication used: GI - ozone with propylene glycol (n = 11), group II - calcium hydroxide with paramonoclorofenolcanforado - PMCC (n = 11), GIII – propylene glycol added powder calcium hydroxide ozoized (n=11), GIV - positive control group - was not placed any medication (n = 11) and GV - negative control group - were not infected (n = 6). Microbiological samples were collected after seven and fourteen days and the microbial growth observed at the count of the number of colony forming units of *E. faecalis*. The results were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis followed by Dunn's test and also by the non-parametric Friedman and both with a significance level of 0.05, showed that the propylene ozonized and calcium hydroxide with PMCC statistically reduced the number of bacteria when compared to positive control group at 7 and 14 days, calcium hydroxide ozonized not statistically reduced the number of bacteria when compared to positive control group at 7 and 14 days and propylene ozonized calcium hydroxide and CMCP showed no statistically significant differences in bacterial growth at 7 and 14 days. In a descending order of bactericidal action in the two study periods, is calcium hydroxide PMCC, followed by propylene ozonized and ozonized calcium hydroxide.

Keywords: Ozone; Root canal treatment; enterococcus faecalis

# 1 Introdução

A grande maioria dos problemas de origem endodôntica são decorrentes de agente etiológico bacteriano. Embora outros fatores de ordem química ou física possam estar envolvidos, sem dúvida alguma e, na grande maioria das vezes, os microrganismos e seus produtos exercem papel de extrema relevância, na indução de patologia pulpar e perirradicular<sup>127</sup>.

As bactérias presentes nos canais radiculares constituem um grupo restrito de espécies quando comparadas ao total das presentes na cavidade bucal, sendo muitos os fatores que podem influenciar o crescimento e a colonização desses microrganismos nos canais radiculares. A disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio e as interações microbianas são importantes determinantes ecológicos, assim como o tecido pulpar desintegrado e os fluidos teciduais constituem fontes essenciais de nutrientes<sup>137</sup>.

Teoricamente, qualquer microrganismo componente da microbiota da boca, nasofaringe ou trato gastrointestinal pode infectar os canais radiculares de dentes com polpa exposta. Além disso, as infecções endodônticas são polimicrobianas e que, embora mais de 100 espécies diferentes tenham sido isoladas, em cada canal radicular usualmente, só está presente entre uma e doze espécies, constituindo em uma ampla variedade de combinações de um número relativamente pequeno de bactérias<sup>45, 137, 142</sup>.

Dentre estas, destaca-se *Enterococcus faecalis*, um microrganismo que apresenta uma alta prevalência em canais obturados com lesão periapical principalmente em lesões refratárias e que tem se mostrado resistente a diversos agentes antimicrobianos<sup>98;119</sup>, sendo relacionado aos casos de insucesso endodôntico.

Sendo assim, estes não são freqüentemente atingidos pela ação do preparo biomecânico, especialmente aqueles localizados nos túbulos dentinários, pois possuem grande capacidade de invasão devido à adesão do microrganismo ao colágeno, permanecendo viáveis no interior dos túbulos e ramificações apicais<sup>71</sup>. Então, o emprego de uma medicação intracanal antibacteriano é recomendado para a completa desinfecção do sistema de canais radiculares<sup>68</sup>.

Siqueira Jr. et al.<sup>115</sup>(1997), acrescentam que, embora uma redução considerável no número de microrganismos da luz do canal principal possa ser obtida pelos efeitos químicos e mecânicos da irrigação e da instrumentação, estes podem permanecer viáveis em regiões inacessíveis. Relatam também que

enquanto menores irregularidades anatômicas possam ser incorporadas no preparo, áreas como reentrâncias, istmos, ramificações e túbulos dentinários podem abrigar bactérias. Estas áreas não são comumente afetadas por instrumentos e a substância química auxiliar empregada na irrigação, não terá tempo de ação intracanal suficiente para agir em profundidade. Assim, o tratamento endodôntico apresenta três etapas principais de combate à infecção: o preparo químico mecânico, a medicação intracanal e a obturação do sistema de canais radiculares.

O hidróxido de cálcio tem sido o produto mais recomendado<sup>65,68,70,139</sup> como medicação intracanal. A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio está relacionada à liberação de íons hidroxila, oriundos de sua dissociação. Os íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que apresentam extrema reatividade, ligando-se a biomoléculas próximas ao seu local de formação. Porém, o hidróxido de cálcio não consegue agir sobre todas as espécies microbianas, principalmente as bactérias anaeróbias facultativas, destacando-se, *E. faecalis*. Vários estudos comprovam que quando o hidróxido de cálcio está associado ao paramoclorofenolcanforado (PMCC), possui maior eficácia sobre estas espécies<sup>67,118, 122,129</sup>. Porém, o PMCC possui algumas desvantagens como ser irritante aos tecidos periapicais, causar necroses e microabscessos<sup>16</sup>.

Então, existe um interesse permanente em se buscar substâncias químicas mais efetivas e que possam substituir o PMCC. Dentre as possíveis substâncias, com o intuito de preencher tais objetivos, o ozônio apresenta algumas características biológicas interessantes: ação bactericida, efeito debridante, estímulo a angiogênese, além do efeito oxidante<sup>20</sup>.

O ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás bastante reativo, sendo que o prefixo ozo vem do grego "ozein", com o significado de aroma ou cheiro, que no ozônio é muito forte, característico, penetrante e desagradável. Oxida as paredes celulares e membranas citoplasmáticas das bactérias, agindo também sobre fungos, protozoários e vírus. Este gás forma radicais oxidantes na presença de água, que penetram e atacam as membranas celulares, afetando o equilíbrio osmótico, promovendo a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucléicos, causando lise celular dependente da extensão das reações<sup>37,87,146</sup>. Estas propriedades antimicrobianas são utilizadas no tratamento de várias enfermidades, sendo bastante efetivas na eliminação de bactérias, fungos e vírus em lesões infectadas<sup>106</sup>.

Devido a sua alta instabilidade e toxicidade, o gás ozônio deve ser incorporado a fluidos, tais como o sangue, água, soluções isotônicas e veículos oleosos, para ser utilizado. O ozônio dissolvido em água é ainda instável e a sua permanência nesta está ligado à pureza da água. Deduz-se então que o efeito da água é imediato. O óleo ozonizado, obtido por meio de reação com ácidos graxos insaturados, é rico em ozonídeos. Estes, por sua vez, liberam oxigênio ativo lentamente conferindo ao óleo ozonizado um efeito prolongado<sup>20</sup>.

O efeito antimicrobiano do ozônio na odontologia, ainda é pouco difundido, mas tem atraído alguns pesquisadores interessados em estudos neste campo. Este gás tem se mostrado eficaz contra muitas espécies microbianas encontradas na cavidade bucal<sup>5</sup>, e como método de desinfecção de próteses<sup>87</sup>.

Estudos em periodontia constataram o efeito da água ozonizada sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus viridans* no biofilme dentário supragengival<sup>37</sup>, já em dentística restauradora, Baysan et al.<sup>8</sup> (2000), constataram os efeitos antimicrobianos da água ozonizada sobre lesões primárias de cárie radicular, frente *S. mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

Na endodontia, os estudos se concentram no uso do ozônio como medicação intracanal e como agente irrigante sobre diversos microrganismos envolvidos nas patologias pulpaes<sup>20, 82, 96, 121</sup>.

Neste contexto, parece oportuno o desenvolvimento de um trabalho experimental, que avalie a eficiência do ozônio quando associado ao propilenoglicol e ao hidróxido de cálcio como medicação intracanal, na eliminação de *E. faecalis* inoculados no interior de canais radiculares.

## 2 Revisão da literatura

### 2.1 A microbiota endodôntica

A grande maioria dos problemas de origem endodôntica tem um agente etiológico bacteriano. Embora fungos (*Cândida*) e vírus (HIV) já tenham sido isolados de canais radiculares infectados, bactérias são os microrganismos mais comumente associados à etiopatogenia dos problemas endodônticos. Além disso, outros fatores de ordem química ou física podem estar envolvidos, mas sem dúvida alguma e, na grande maioria das vezes, bactérias e seus produtos exercem papel de extrema relevância, na indução de patologia pulpar e perirradicular (Siqueira<sup>127</sup>, 1997). Sendo assim, o principal foco do tratamento endodôntico é a eliminação dos microrganismos e seus produtos do sistema de canais radiculares antes da obturação endodôntica (Gomes et al.<sup>40</sup>, 2004).

Diversos autores afirmam que, teoricamente, qualquer microrganismo componente da microbiota bucal, nasofaringe ou trato gastrointestinal pode infectar os canais radiculares de dentes com polpa exposta. Relatam ainda que as infecções endodônticas são polimicrobianas e que, embora mais de 100 espécies diferentes tenham sido isoladas, em cada canal radicular usualmente, só está presente entre uma e doze espécies, constituindo em uma ampla variedade de combinações de um número relativamente pequeno de bactérias (Haapasalo<sup>45</sup>, 1989; Sundqvist<sup>137</sup>, 1992; Tronstad<sup>142</sup>, 1992).

A microbiota dos canais radiculares infectados está constantemente sendo identificada, sendo que novas espécies microbianas são descobertas, de acordo com a evolução dos métodos de identificação e cultivo dos microrganismos isolados. Até 1970, os microrganismos comumente isolados dos canais radiculares eram facultativos, especialmente *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp. e leveduras (*Candida albicans*) (Oliveira et al.<sup>88</sup>, 2007), pois nesta época, os meios de cultura empregados, como caldo de BHI (Brain-Heart-Infusion), caldo dextrose-triptcase e outros favoreciam particularmente o isolamento de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos (Farber, Seltzer<sup>35</sup>, 1988; Sulitzeanu et al.<sup>134</sup>, 1964).

Graças aos avanços na tecnologia para a cultura de anaeróbios, houve considerável mudança no entendimento das infecções pulpares, tornando possível constatar a presença marcante de microrganismos anaeróbicos estritos (Farber, Seltzer<sup>35</sup>, 1988).

Atualmente, a introdução de métodos moleculares na identificação microbiológica permite uma melhor compreensão do perfil microbiano das infecções endodônticas primárias, pois permite a identificação de algumas espécies que foram subestimadas nos estudos de cultura, como *Treponema* spp. (Gomes et al.<sup>39</sup>, 2006), *Filifactor alocis* (Gomes et al.<sup>39</sup>, 2006), *Tannerella forsythia* (Gomes et al.<sup>39</sup>, 2006; Sassone et al.<sup>107</sup>, 2008) e *E. faecalis* (Sassone et al.<sup>107</sup>, 2008; Sassone et al.<sup>108</sup>, 2007).

Desta forma, a infecção endodôntica primária geralmente inicia com bactérias facultativas, sendo que, normalmente, após sete dias 50% da microbiota é composta por anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos. Após aproximadamente três meses, esta proporção atinge 85% e após seis meses, os anaeróbios estritos constituem mais de 90% da microbiota do canal radicular (Oliveira et al.<sup>88</sup>, 2007). Geralmente, os gêneros predominantes são: *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Tannerella*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Eubacterium* (Baumgartner<sup>6</sup>, 2003; Gomes et al.<sup>39</sup>, 2006; Gomes et al.<sup>40</sup>, 2004; Jacinto et al.<sup>54</sup>, 2006; Oliveira et al.<sup>88</sup>, 2007; Siqueira Jr<sup>126</sup>, 2003).

Além da infecção primária dos canais radiculares, é possível que microrganismos mais resistentes permaneçam no interior dos canais radiculares após o preparo biomecânico ou, ainda, penetrem no sistema de canais radiculares durante ou após o tratamento endodôntico, que ocorre geralmente por falhas no selamento coronário. Nestes casos, os microrganismos podem promover infecções secundárias e/ou persistentes, contribuindo para o insucesso do tratamento. Nas infecções secundárias e/ou persistentes, a microbiota é geralmente composta por um número bem menor de espécies que as infecções primárias, sendo bactérias Gram-positivas predominantes (Pinheiro et al.<sup>98</sup>, 2003). Os principais patógenos associados com estas infecções pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Candida*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (Oliveira et al.<sup>88</sup>, 2007; Pinheiro et al.<sup>98</sup>, 2003; Sundqvist et al.<sup>136</sup>, 1998; Waltimo et al.<sup>148</sup>, 1997).

Neste sentido, Gomes et al.<sup>40</sup> (2004) pesquisaram a microbiota do sistema de canais radiculares de 41 dentes com necrose pulpar, e de 19 dentes que foram submetidos ao retratamento, e encontraram 56 espécies diferentes de

microrganismos. No isolamento das culturas observou-se predomínio de bactérias anaeróbias estritas (70%). Os autores concluíram que a microbiota de dentes com polpa necrosada (infecção primária) é diferente das infecções secundárias (retratamento) em número de espécie. Nas infecções primárias sempre foram encontradas mais de três espécies por canal, com microrganismos Gram-positivos e negativos, já nas infecções secundárias foram encontradas de uma a duas espécies por canal, com predominância de microrganismos Gram-positivos e anaeróbios facultativos.

A melhor caracterização da microbiota endodôntica permitiu que novos questionamentos fossem levantados a respeito de como ocorreria o processo de colonização e evolução da infecção endodôntica, a fim de compreender o motivo da prevalência de anaeróbios. Diversos fatores seletivos atuam sobre microrganismos que colonizam o sistema de canais radiculares como: nutrição, potencial de óxido redução, pH, temperatura, interações entre microrganismos, além dos mecanismos de defesa do hospedeiro e presença de agentes microbianos e inibidores (Gomes et al.<sup>38</sup>, 1996; Marsh, Martin<sup>72</sup>, 1999).

Sundqvist<sup>137</sup>(1992) ressalta que as bactérias presentes nos canais radiculares constituem um grupo restrito de espécies quando comparadas ao total das presentes na cavidade bucal, sendo muitos os fatores que podem influenciar o crescimento e a colonização desses microrganismos nos canais radiculares. A disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio e as interações bacterianas são importantes determinantes ecológicos, assim como o tecido pulpar desintegrado e os fluidos teciduais constituem fontes essenciais de nutrientes.

No ambiente do canal radicular geralmente, existe baixa disponibilidade de oxigênio, especialmente quando não há uma comunicação direta com o meio bucal. Mesmo em presença dessa comunicação, o nível de oxigênio é baixo, principalmente na região apical, sendo o oxigênio inicialmente consumido pelas bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, provocando uma diminuição do potencial de óxido-redução e favorecendo, por fim, as bactérias anaeróbias estritas (Sundqvist<sup>138</sup>, 1992).

Lopes e Siqueira<sup>70</sup> (2004) acrescentam que a elevada concentração de oxigênio presentes nos tecidos nos estágios iniciais favorece a prevalência de bactérias aeróbicas e facultativas. A partir da necrose tecidual, a tensão de oxigênio é reduzida pela ausência da micro circulação. Observa-se então, uma redução no potencial de óxido redução proporcionando uma elevação na quantidade de microrganismos anaeróbios estritos.

Outro aspecto importante na seleção de microrganismos seria o pH tecidual. Os tecidos necrosados apresentam pH ligeiramente ácido, aproximadamente seis, o que favorece a colonização bacteriana. Por outro lado, em tecidos saudáveis, o pH é de aproximadamente 7.2 a 7.4, ou seja, ligeiramente básico o que dificulta a ação de enzimas bacterianas (Tronstad et al.<sup>141</sup>, 1992).

A disponibilidade nutricional é de extrema importância na composição da microbiota das infecções endodônticas, uma vez que determinados produtos podem ser metabolizados por algumas espécies de bactérias, enquanto outros podem se acumular e alcançar níveis tóxicos tanto para outras bactérias como para os tecidos periapicais. Assim, as bactérias e seus produtos têm um papel essencial na iniciação e perpetuação das patologias periapicais (Sundqvist<sup>138</sup>, 1992). O nutriente obtido por bactérias no interior do sistema de canais radiculares advém de produtos da desintegração celular, fluidos teciduais e componentes do tecido conjuntivo. No período inicial observa-se a prevalência de uma microbiota sacarolítica ocorrendo o rápido esgotamento dos carboidratos disponíveis. A partir de então, instala-se uma microbiota proteolítica capaz de metabolizar proteínas e aminoácidos que se torna a fonte de energia disponível no ambiente (Steege, Hoeven<sup>130</sup>, 1989). Nesse momento, predominam as espécies pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium* e *Fusobacterium* (Jansen, Hoeven<sup>55</sup>, 1997; Lopes, Siqueira<sup>70</sup>, 2004).

Como descrito anteriormente, as bactérias e seus subprodutos estão diretamente implicados nos casos de insucessos em endodontia, seja em complicações durante as intervenções, no pós-operatório imediato (processos inflamatórios agudos – flaresups) ou mediato (com lesões persistentes e refratárias) (Ricucci, Siqueira Jr<sup>104</sup>, 2008; Siqueira Jr<sup>123</sup>, 2001).

Ao pesquisar os casos de falhas no tratamento endodôntico, diversos estudos no sentido de avaliar a microbiota presente, sugerem que o microrganismo *E. faecalis* tem sido a espécie mais frequentemente identificada (Peciulienė et al.<sup>95</sup>, 2001; Sundqvist et al.<sup>136</sup>, 1998).

## 2.2 *Enterococcus faecalis*

Investigações procurando caracterizar a microbiota associada a dentes com insucesso endodôntico mostraram diferenças marcantes em relação aos casos de infecção primária. Engström<sup>25</sup> (1964) avaliou a prevalência do gênero *Enterococcus* ssp

nas infecções endodônticas e verificou uma maior prevalência destes microrganismos em canais com tratamento endodôntico prévio (20,9%) que em canais com necrose pulpar.

Möller<sup>79</sup> (1966) verificou um menor número de microrganismos presentes no canal radicular de dentes com fracasso da terapia endodôntica quando comparados aos dentes com polpas necróticas. A média de microrganismos encontrados nos 120 casos que apresentavam cultura positiva foi de 1,6 espécies por canal. Quanto à composição, verificaram um equilíbrio entre as bactérias anaeróbias facultativas e estritas e um predomínio das gram-positivas correspondendo a 80% das isoladas. Entre as isoladas, *E. faecalis* apresentou uma incidência de 29% dos casos que apresentavam culturas positivas.

Molander et al.<sup>78</sup> (1998) demonstraram que bactérias do gênero *Enterococcus* foram as mais frequentemente isoladas de canais radiculares obturados e que apresentavam lesões periapicais, sendo isoladas em 78% dos casos.

Sundqvist et al.<sup>136</sup> (1998) avaliaram a flora microbiana presente em dentes que apresentavam insucesso no tratamento endodôntico. Para tal estudo, foram selecionados 54 pacientes que apresentavam insucesso do tratamento endodôntico realizado por um período superior a quatro anos. Os casos selecionados para o estudo apresentavam lesão óssea periapical radiograficamente visível caracterizando a necessidade de retratamento. Inicialmente procedeu-se a total remoção do material obturador permitindo que amostras do conteúdo microbiano do canal fossem analisadas. Em seguida o dente foi retratado e acompanhado por um período de cinco anos. Os resultados detectaram na maioria dos casos uma mono infecção constituída principalmente de microrganismos Gram-positivos (87% bactérias isoladas), com proporções semelhantes de bactérias anaeróbias facultativas (58%) e estritas (42%). O microrganismo mais comumente recuperado foi *E. faecalis* isolado em 38% dos canais com cultura positiva.

Nesta mesma linha de pesquisa, Peciulene et al.<sup>94</sup> (2000) investigaram 25 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos e com periodontites apicais visíveis radiograficamente e encontraram *E. faecalis* em 70% das amostras com crescimento microbiano. Os mesmos autores<sup>95</sup> em 2001 determinaram a ocorrência de microrganismos em quarenta dentes com canais obturados com o quadro de periodontite apical crônica, necessitando de retratamento. Foram encontrados microrganismos em 33 dos quarenta dentes estudados. *E. faecalis* foi o microrganismo

dominante (isolado de 21 dentes), e *C. albicans* foi isolada em seis dentes, onde na metade dos casos estava associada com *E. faecalis*, e na outra metade associada a outros microrganismos. Após preparo biomecânico com hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), foi realizada uma segunda coleta de amostras microbiológicas e foram encontrados microrganismos em dez dos 33 dentes que apresentaram cultura positiva na primeira coleta. *E. faecalis* estava presente em seis amostras, *C. albicans* não foi identificada. Na terceira coleta de amostras microbiológicas (após uso de irrigação com iodine iodeto de potássio por cinco minutos), somente um dente apresentou crescimento de *E. faecalis*.

Hancock et al.<sup>47</sup> (2001) avaliaram a composição da microbiota presente em 54 dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Foi detectado crescimento bacteriano em 34 casos. A microbiota era composta predominantemente de microrganismos Gram-positivos (80,4%) com uma única espécie isolada ou em combinações de duas espécies. Os gêneros mais isolados foram: *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus* e *Streptococcus*. Dentre as espécies bacterianas, *E. faecalis* foi o mais frequentemente isolado estando presente em 30% das amostras com crescimento bacteriano.

Ao identificar também a microbiota de dentes com lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico, Sunde et al.<sup>135</sup> (2002) colheram amostras microbiológicas de 36 pacientes, que foram colhidas utilizando-se cones de papel absorvente. Os resultados revelaram um total de 148 cepas e 67 espécies de microrganismos. Deste total, 75% eram de bactérias facultativas (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Candida*). Os autores concluíram que em lesões de dentes com periodontite apical refratária, existe uma grande variedade de microrganismos, com predomínio de Gram-positivos (79,5% da microbiota).

Chávez de Paz et al.<sup>17</sup> (2003) observaram a existência de remanescente bacteriano após preparo biomecânico dos canais radiculares com periodontite periapical, necessitando de retratamento endodôntico. Após instrumentação associado a substâncias químicas e medicação intracanal com hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) em 107 dentes, amostras microbiológicas foram colhidas, e foram isoladas 248 espécies com predominância de Gram-positivos (85%), sendo *Lactobacillus* spp. (22%), estreptococos não mutans (18%) e *Enterococcus* spp. (12%). Os autores concluíram

que estes microrganismos uma vez estabelecidos, são bastante recorrentes em lesões de periodontite periapical.

Pinheiro et al.<sup>98</sup> (2003) identificaram a microbiota em canais radiculares com falhas no tratamento endodôntico e determinaram a associação de várias espécies. Os resultados demonstraram que das espécies isoladas, 57,4% foram anaeróbios facultativos e 83,3% microrganismos Gram-positivos. Os autores concluíram que a microbiota foi limitada a um pequeno número de espécies microbianas, predominantemente Gram-positivas e que anaeróbios facultativos, especialmente *E. faecalis*, foram os microrganismos mais comumente isolados. Contudo, infecções polimicrobianas e anaeróbios obrigatórios foram freqüentemente encontrados em canais com sintomatologia clínica.

Em outro estudo, Pinheiro et al.<sup>99</sup> (2003) através da avaliação microbiológica de canais radiculares que necessitavam de retratamento endodôntico verificaram que *E. faecalis* foi a espécie bacteriana mais comumente recuperada sendo identificada em 59,94% (27 casos) dos canais radiculares com crescimento microbiano. Dos 27 casos em que foram identificados, 18 tiveram esta espécie como único microrganismo identificado.

Da mesma forma, Pinheiro et al.<sup>97</sup> (2004) investigaram a prevalência de espécies de *Enterococcus* nos canais radiculares de sessenta dentes com lesões refratárias de tratamentos endodônticos mal sucedidos, e a susceptibilidade destes microrganismos aos antibióticos. Foram encontrados 51 microrganismos nos sessenta dentes avaliados, sendo que *E. faecalis* foi isolado em 53% dos dentes, sendo 35% em culturas puras (18 dentes). Os autores concluíram que *E. faecalis* é frequente neste tipo de lesão, estando presente em mais da metade dos canais com lesão refratária.

Seguindo a busca pela microbiota de dentes com lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico, Adib et al.<sup>1</sup> (2004) identificaram a microbiota em canais radiculares obturados com lesão periapical refratária. Foram pesquisados oito dentes extraídos de onde foram isoladas 252 cepas. As espécies prevalentes foram anaeróbias facultativas e Gram-positivas como as do grupo *Staphylococci*, grupo *Streptococci*, grupo *Enterococci* e *Actinomyces*. Os autores concluíram que microrganismos anaeróbios facultativos Gram-positivos são predominantes em dentes com lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico.

A utilização de métodos genéticos, em especial o PCR, permite a detecção do DNA das espécies bacterianas, sendo, portanto, mais sensível que o

método de cultura, da qual o número de células coletadas pode estar abaixo do nível de detecção do método, inviabilizando assim, o isolamento de determinadas espécies (Siqueira Jr, Rôças<sup>120</sup>, 2004).

Roças et al.<sup>105</sup> (2004) utilizando o PCR compararam a prevalência de *E. faecalis* em canais não tratados e em canais com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais crônicas. *E. faecalis* foi isolado em 20 dos 30 dentes com insucesso do tratamento endodôntico (67%) e em 9 dos 50 casos de infecções primárias (18%).

Gomes et al.<sup>42</sup> (2006) investigaram a prevalência de *E. faecalis* em canais com necrose pulpar e em canais com insucesso do tratamento endodôntico utilizando a cultura e o PCR como métodos de avaliação. Para o estudo foram selecionados 50 dentes com insucesso endodôntico e 50 dentes com infecções primárias. Nos casos de retratamento, *E. faecalis* foi encontrado em 21 casos (42%) pela cultura e em 38 casos (76%) pela análise do PCR. Já nos 50 casos de infecção primária, esta espécie esteve presente em 2 (4%) e 41 (82%) canais, respectivamente, pela cultura e PCR. Esses resultados mostraram que o *E. faecalis* está presente em canais com polpas necrosadas, porém em quantidades bem pequenas, não detectáveis pelo método da cultura. De acordo com os autores, o crescimento dessa espécie bacteriana pode ser favorecido por mudanças ecológicas no canal radicular após o preparo químico-mecânico ou obturação deficiente, tornando possível sua detecção nas culturas microbiológicas nesses casos.

Em 2008, Gomes et al.<sup>41</sup> investigaram a presença de nove espécies bacterianas em canais radiculares obturados e que apresentavam lesões periapicais. As amostras foram coletadas após desobturação e analisadas por PCR. De acordo com os resultados, *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77,8%, seguido por *Peptostreptococcus micros*, detectada em 51,1%. *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* foram detectados em 35,6%, 22,2%, 11,1% e 11,1% das amostras, respectivamente. Outras espécies também foram identificadas, como *F. alocis* em 26,7%, *T. denticola* em 24,4% e *T. forsythia* em 4,4% das amostras. Os autores observaram relação sinérgica entre algumas espécies e concluíram que *E. faecalis* foi a espécie mais frequentemente identificada em dentes com falhas no tratamento endodôntico.

Como visto o gênero *Enterococcus*, especialmente *E. faecalis*, é bastante importante na microbiota de canais radiculares com falhas no tratamento endodôntico. A

explicação mais provável para tal fato é que estes microrganismos têm demonstrado capacidade de sobreviver em ambiente em que há escassez de nutrientes e em que a comensalidade com outras bactérias é mínima (Berber et al.<sup>10</sup>, 2006; Sundqvist et al.<sup>136</sup>, 1998). Assim, nas infecções endodônticas, *E. faecalis* pode sobreviver no canal radicular como organismo único, sem o suporte de outras espécies, e representar um problema para o sucesso do tratamento. Este gênero oferece resistência a várias substâncias antimicrobianas e ainda pode se favorecer por alterações no ecossistema do canal radicular e instituir uma infecção persistente. *E. faecalis* pode invadir os túbulos dentinários em profundidade e, com isso, é provável que as células no interior dos túbulos dentinários que consigam sobreviver à instrumentação químico-mecânica e medicação intracanal possam colonizar os túbulos e reinfetar os canais radiculares obturados (Berber et al.<sup>10</sup>, 2006).

*E. faecalis* possui diversos fatores de virulência, tais como: enzimas líticas, substância de agregação, adesinas de superfície, ácido lipopoliteicóico e produção extracelular de superóxido, além da habilidade de formação de biofilme (kayaoglu, Orstavik<sup>59</sup>, 2004), possuindo capacidade de invadir os túbulos dentinários e aderir ao colágeno e sobreviver a períodos extensos de privação nutricional (Love<sup>71</sup>, 2001), fato que contribui para sua sobrevivência durante o preparo biomecânico.

A penetração intratubular de *E. faecalis* foi avaliada por Waltimo et al.<sup>147</sup> (2000), através de um modelo experimental utilizando dentes humanos. Os autores verificaram que a penetração dentinária foi fracamente em todas as 12 amostras num período de 1 a 5 dias.

Love<sup>71</sup> (2001) demonstrou a habilidade de *E. faecalis* em causar lesão periapical crônica envolvida com insucesso da terapia endodôntica. Para o autor, a resistência e a capacidade de invasão dos túbulos dentinários, é devida principalmente pela adesão do microrganismo ao colágeno, permanecendo viável no interior dos túbulos. Foi também comparado o comportamento de três diferentes espécies bacterianas (*S. gordonii*, *S. mutans* e *E. faecalis*), demonstrando que *S. gordonii* e *S. mutans* apresentaram menor e significativa fixação ao colágeno em relação ao *E. faecalis*, sugerindo que esse processo de fixação ao colágeno seja em parte responsável pela inibição da migração desses microrganismos para os túbulos dentinários.

Com relação à sobrevivência do *E. faecalis*, Sedley et al.<sup>110</sup> (2005) realizaram estudo *ex vivo* para determinar a capacidade de sobrevivência deste após a

obturação definitiva do canal sem aporte nutricional adicional. Os resultados mostraram que após períodos de incubação de 6 meses e 1 ano, *E. faecalis* foi recuperado em 100% dos casos. Esses resultados demonstram a ampla capacidade deste microrganismo de sobreviver a grandes desafios ambientais e de permanecer por um período viável no interior dos canais radiculares obturados podendo comprometer o tratamento.

Sendo assim, Peciulienė et al.<sup>95</sup> (2001) salientaram que a necessidade de emprego de medicação intracanal na eliminação das espécies microbianas, principalmente ao *E. faecalis*, para obtenção do sucesso no retratamento endodôntico, se faz necessária.

### **2.3 Medicação intracanal**

Devido às bactérias e seus produtos não serem frequentemente atingidos pela ação do preparo biomecânico, especialmente aquelas localizadas nos túbulos dentinários, ramificações apicais, áreas de reabsorção e no biofilme apical, o emprego de uma medicação intracanal antibacteriana é recomendado para a completa desinfecção do sistema de canais radiculares em dentes com lesão periapical crônica (Leonardo<sup>68</sup>, 2005).

Para Lopes, Siqueira Jr.<sup>70</sup> (1999), a medicação intracanal consiste no emprego de medicamentos no interior do canal radicular onde deverão permanecer ativos durante todo período entre as consultas do tratamento endodôntico. Embora esta etapa não possa substituir o preparo químico-mecânico em termos de eficácia no controle da infecção do canal radicular, sua utilização assume um papel auxiliar bastante importante em determinadas condições clínicas e patológicas. Um medicamento a ser aplicado no interior do sistema de canais radiculares deve promover a eliminação e impedir a proliferação de bactérias da saliva, reduzir a inflamação perirradicular, solubilizar matéria orgânica, neutralizar produtos tóxicos, controlar exudação persistente, reabsorção dentária externa inflamatória e estimular a reparação por tecido mineralizado.

Siqueira Jr. et al.<sup>115</sup> (1997), acrescentam que, embora uma redução considerável no número de células bacterianas da luz do canal principal possa ser obtida pelos efeitos químicos e mecânicos da irrigação e da instrumentação, bactérias podem permanecer viáveis em regiões inacessíveis a este. Relatam também que,

enquanto menores irregularidades anatômicas possam ser incorporadas no preparo, áreas como reentrâncias, istmos, ramificações e túbulos dentinários podem abrigar bactérias. Estas áreas não são comumente afetadas por instrumentos e a substância química auxiliar empregada na irrigação, não terá tempo de ação intracanal suficiente para agir em profundidade. Assim, o tratamento endodôntico apresenta três etapas principais de combate à infecção: o preparo químico mecânico, a medicação intracanal e a obturação do sistema de canais radiculares.

Por permanecer no interior do canal radicular por mais tempo, um medicamento intracanal dotado de ação antimicrobiana tem maiores chances de atingir áreas não afetadas pela instrumentação como istmos, ramificações, reentrâncias e túbulos dentinários. Sua ação antimicrobiana potencializa a redução da microbiota endodôntica proporcionando melhor reparação dos tecidos perirradiculares e, conseqüentemente, um maior índice de sucesso da terapia endodôntica (Lopes, Siqueira Jr<sup>70</sup>, 2004).

A demonstração da importância do emprego da medicação intracanal para reparação foi feita por Katebzadeh et al.<sup>58</sup>(1999) em estudo histológico em dentes de cães. Os autores avaliaram o reparo de lesões perirradiculares após o tratamento endodôntico efetuado em uma e duas sessões. Os canais foram irrigados com solução salina e no grupo de duas sessões foi utilizada medicação com hidróxido de cálcio. Após seis meses, a análise histológica revelou que houve significativamente menos inflamação perirradicular no grupo tratado em duas sessões. Em outro estudo também em cães, mas realizando análise radiográfica do sucesso, os mesmos autores<sup>57</sup> (2000) revelaram melhores resultados também para o grupo de duas sessões (15,8%), o qual apresentou um significativo menor número de casos de insucesso que o grupo de sessão única (41,2%).

Bonetti Filho<sup>13</sup> (2000) efetuou uma avaliação radiográfica, histopatológica e hitomicrobiológica após emprego ou não da medicação intracanal entre sessões, após 180 dias do tratamento de canais radiculares em dentes de cães com lesão periapical crônica. Durante o preparo biomecânico, os canais radiculares foram submetidos a uma copiosa irrigação com solução de hipoclorito de sódio a 5,25%, utilizando, por um período de 15 dias, três diferentes curativos de demora à base de hidróxido de cálcio, os quais determinaram três grupos experimentais. A conclusão da pesquisa foi de que, mesmo usando uma solução irrigadora de ação bactericida enérgica, a utilização de

medicação intracanal entre as sessões, foi de fundamental importância para a reparação periapical, radiográfica, histológica e histomicrobiológica.

Tanomaru Filho et al.<sup>139</sup> (2002) avaliaram o reparo apical e periapical após tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e lesão periapical crônica em cães. Setenta e dois canais radiculares de quatro cães foram submetidos ao preparo biomecânico, usando hipoclorito de sódio 5,25% ou digluconato de clorexidina 2%, como solução irrigadora. Os canais radiculares foram ou obturados imediatamente com Sealapex, usando condensação lateral ativa da guta-percha, ou um curativo intracanal à base de hidróxido de cálcio foi aplicado por 15 dias, antes da obturação com Sealapex. Após 210 dias, os animais foram mortos por sobredose anestésica, e os cortes histológicos obtidos foram corados com hematoxilina e eosina para análise em microscopia óptica do reparo apical e periapical. Houve melhor reparo nos grupos com medicação intracanal do que com obturação imediata ( $p < 0,05$ ), independente das soluções irrigadoras utilizadas.

Holland et al.<sup>51</sup> (2003) realizaram estudo objetivando analisar o processo de reparo em dentes com periodontite apical após o tratamento do canal radicular em uma ou duas sessões. Pré-molares e dentes anteriores de cães ( $n = 60$ ) foram expostos à cavidade bucal por seis meses para o desenvolvimento de lesões periapicais. Após o período de contaminação, os canais foram submetidos ao preparo químico mecânico utilizando hipoclorito de sódio 2.5% como solução irrigadora. Os dentes foram obturados empregando-se guta-percha e cimento Sealapex através da técnica da condensação lateral. Vinte dentes foram obturados em sessão única imediatamente após a instrumentação. Os demais 40 dentes foram divididos em dois grupos: onde o hidróxido de cálcio foi utilizado como medicação intracanal por 7 e 14 dias. Após 6 meses, os animais foram sacrificados e os tecidos preparados para análise histomorfológica. Foi concluído que o uso do curativo favorece a obtenção de melhores resultados que a obturação em sessão única.

De Rossi et al.<sup>24</sup> (2005) avaliaram a cicatrização de lesões periapicais crônicas induzidas experimentalmente em cães, aos 30, 75 e 120 dias após instrumentação dos canais radiculares, com limas NiTi ou K manuais, com ou sem curativo intracanal de pasta de hidróxido de cálcio/clorexidina 1%. Os 2º, 3º e 4º pré-molares inferiores e 2º e 3º pré-molares superiores de cinco cães (12 a 18 meses de idade, pesando de 8 a 15 Kg) foram selecionados para tratamento (um total de 82 canais radiculares). Após a remoção pulpar, os canais foram expostos a cavidade oral

por sete dias, para permitir contaminação microbiana e posteriormente selados, com cimento de óxido de zinco eugenol até que as lesões fossem confirmadas radiograficamente. Nos grupos I e II, os dentes foram instrumentados com limas K manuais, usando a técnica coroa-ápice. Nos dentes dos grupos III e IV, foram usadas limas rotatórias de NiTi. O delta apical foi perfurado usando limas K de #20 a #30, em todo o comprimento do dente, criando uma abertura apical padronizada. O batente apical foi alargado até a lima #70, com irrigação de hipoclorito de sódio 2,5% a cada troca de lima. Os dentes nos grupos II e IV receberam curativo com pasta de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ )/clorexidina 1% (CHX) por 15 dias, antes da obturação radicular. Os dentes dos grupos I e III não receberam curativo intracanal. As aberturas coronárias foram permanentemente restauradas com amálgama de prata, condensado sobre uma base de ionômero de vidro. Radiografias padronizadas foram tiradas antes do tratamento (0 dias) e aos 30, 75 e 120 dias após a obturação. Não houve diferença significativa na cicatrização radiográfica das lesões periapicais entre a instrumentação manual e rotatória. Radiografias tiradas 120 dias mostraram que o tratamento com a pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ /CHX 1% resultou em uma redução significativa no tamanho médio das lesões periapicais, comparado com o tratamento em sessão única. Estes achados suportam a hipótese que, independente da técnica de instrumentação (manual ou rotatória), o uso de um curativo intracanal é importante no tratamento endodôntico de dentes de cães com lesões periapicais crônicas induzidas experimentalmente.

Leonardo et al.<sup>64</sup> (2006) compararam o reparo de dentes com lesão periapical após tratamento endodôntico utilizando curativo intracanal à base de hidróxido de cálcio por vários períodos ou obturação na mesma sessão. Após indução de lesões periapicais em dentes de quatro cães, os canais radiculares foram preparados, usando hipoclorito de sódio a 5,25% como solução irrigadora, e os animais foram separados em quatro grupos experimentais. No grupo I, os canais radiculares foram obturados na mesma sessão; nos grupos II, III e IV, curativo à base de hidróxido de cálcio permaneceram nos canais por 15, 30 ou 180 dias, respectivamente. Os canais radiculares dos grupos I, II e III foram obturados com cones de guta-percha e cimento AH Plus. Após 180 dias, os animais foram mortos e os cortes histológicos foram corados com hematoxilina eosina, para avaliar o reparo periapical. O reparo foi melhor nos grupos II, III e IV (curativo intracanal) comparado com o grupo I (sessão única;  $p < 0,05$ ). Os autores concluíram que o curativo intracanal à base de hidróxido de cálcio foi importante para o reparo de dentes com lesão periapical. Curativo com pasta à base de

hidróxido de cálcio resulta em melhor reparo periapical do que quando o canal radicular é obturado na mesma sessão.

Além do reparo periapical induzido quando se utiliza a medicação intracanal entre as sessões, o uso da mesma também promove redução bacteriana.

Siqueira Jr. et al.<sup>117</sup> (2007) investigaram a redução bacteriana após instrumentação com hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% como irrigante e curativo entre sessões com uma pasta de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )/paramonoclorofenol canforado (PMCC). Onze dentes com infecções intra-radulares primárias e periodontites apicais crônicas foram selecionados de acordo com severos critérios de inclusão e exclusão. Amostras bacterianas foram colhidas antes do tratamento (S1), após o preparo químico-mecânico, usando limas manuais NiTi e NaOCl 2,5% (S2), e após uma medicação por sete dias com pasta  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /PMCC (S3). Bactérias cultiváveis registradas dos canais infectados nos três estágios foram contadas e identificadas por meio da análise seqüencial do gene rRNA 16S. Em S1, todos os casos abrigaram bactérias, com um número médio de 2,8 por canal (variando de 1-6). Em S2, 6 de 11 (54,5%) dos casos apresentaram culturas positivas com uma a três espécies por canal. Em S3, apenas um caso (9,1%) foi positivo para a presença de bactérias, com *Propionibacterium acnes* como único isolado. Uma redução significativamente alta nas contagens bacterianas foi observada comparando as amostras S2 e S3, com relação à redução bacteriana quantitativa ( $p = 0,029$ ) e o número de casos com cultura negativa ( $p = 0,03$ ). Foi concluído que o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5%, como solução irrigadora, reduziu significativamente o número de bactérias no canal, mas falhou em obter canais livres de bactérias em mais da metade dos casos. Um curativo intracanal por sete dias aumentou significativamente o número de casos com cultura negativa.

#### **2.4 Hidróxido de cálcio**

A busca incessante de uma medicação intracanal ideal, com o objetivo de eliminar os microrganismos sobreviventes ao preparo biomecânico foi um objetivo da fase da “simplificação endodôntica” (Leonardo<sup>68</sup>, 2005) que teve o seu início na década de 40 e seu término no começo da década de 80 no século passado. A partir da década de 70 o hidróxido cálcio passou a ser amplamente empregado e difundido como medicação intracanal para os dentes que apresentavam necrose pulpar e reação

periapical crônica, devido ao seu elevado poder bactericida e sua biocompatibilidade. Desde então, esse material tem sido utilizado durante décadas e tem sido o produto mais recomendado (Leonardo et al.<sup>66</sup>,2002; Leonardo<sup>68</sup>, 2005; Lopes, Siqueira Jr<sup>70</sup>, 2004; Tanomaru Filho et al.<sup>139</sup>, 2002) como medicação intracanal, persistindo como o medicamento mais empregado para essas situações e constituindo atualmente a conduta mais aceita para o combate aos microrganismos que escaparam do preparo biomecânico.

Os medicamentos aplicados em toda extensão do canal radicular funcionam como uma barreira física impedindo o suprimento de substrato e ocupando espaços, a fim de limitar a multiplicação microbiana (Chong, Pitt<sup>18</sup>, 1992). As pastas de hidróxido de cálcio funcionam como uma barreira físico-química, retardando significativamente a recontaminação do canal, quando da exposição à saliva por perda do selador coronário.

A propriedade antimicrobiana do hidróxido de cálcio foi investigada por inúmeras pesquisas com diferentes metodologias. Matsumiya, Kitamura<sup>73</sup> (1960) em estudo histopatológico e histobacteriológico em dentes de cães, verificaram que o hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, acelera a reparação natural de lesões periapicais, em função do desaparecimento progressivo de bactérias nos canais radiculares, a despeito da infecção existente no momento de sua aplicação.

Sjögren et al.<sup>128</sup> (1991) avaliaram o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio em 10 minutos e 7 dias. Para tanto, valeram-se de 30 dentes humanos unirradulares com polpas necrosadas e lesão periapical, que após a instrumentação, irrigação com hipoclorito de sódio a 0,5%, e a secagem, foram preenchidos com pastas de hidróxido de cálcio. Em 12 canais radiculares a medicação foi deixada no canal por um período de 10 minutos e em 18 canais por 7 dias. Amostras microbiológicas foram tomadas dos canais radiculares de modo a permitir que pontas de papel absorventes fossem introduzidas até 1 mm aquém do vértice radiográfico. Posterior a aplicação do hidróxido de cálcio nos dois períodos, e sua remoção, uma terceira amostra foi obtida. Após o processamento microbiológico, a análise dos resultados mostrou que bactérias estavam presentes em todas as 30 amostras iniciais. Após o preparo, bactérias ocorriam em 6 dos 12 canais que iriam receber a medicação de hidróxido de cálcio por 10 minutos, e em 9 dos 18 canais em que o medicamento permaneceria por 7 dias. Nestes 18 canais nenhuma bactéria foi isolada nas amostras tomadas imediatamente após a remoção do hidróxido de cálcio, nem nas amostras finais, 5 semanas mais tarde,

onde permaneceram sem o medicamento. Nos 12 dentes onde a medicação foi colocada por 10 minutos, as bactérias persistiram em 6 canais radiculares, sendo que todas as cepas identificadas estavam presentes nas amostras iniciais, exceto em 1 caso. A aplicação do hidróxido de cálcio por 10 minutos mostrou ser ineficiente, enquanto que por 7 dias, as bactérias não sobreviveram e no terceiro, eliminada após o curativo.

No ano de 1995, Kontakiotis et al.<sup>60</sup> analisaram a ação do hidróxido de cálcio sobre a flora anaeróbia do canal radicular, através da absorção do dióxido de carbono do meio. Vinte bactérias anaeróbias obrigatórias e 20 facultativas isoladas de canais radiculares infectados e identificadas em nível de espécies foram utilizadas. Para cada espécie bacteriana, uma concentração padrão foi alcançada, e 0,1 mL do inóculo foi colocado em placas ágar sangue, que foram, consecutivamente, incubadas em uma câmara anaeróbica por 5-7 dias. Um grupo controle e um experimental foram estudados: o grupo experimental incluiu uma placa com espécies bacterianas, bem como uma placa aberta contendo 32 g de pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  na proporção de 6:4. Ambas as placas foram incubadas em uma câmara anaeróbica por 72 horas. O grupo controle incluiu apenas uma placa contendo as mesmas espécies bacterianas e foi incubada sob as mesmas condições. Após 72 horas de incubação, o número de bactérias registradas foi contado em ambos os grupos. Os resultados demonstraram que no grupo controle a quantidade de bactérias recobertas foi significativamente menor que no grupo experimental, não sendo observada resistência de qualquer espécie bacteriana frente ao hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio é capaz de absorver o dióxido de carbono do meio, representando, assim, outro mecanismo antibacteriano desta medicação intracanal. Afirmaram, também, que desta maneira, o hidróxido de cálcio pode eliminar bactérias do interior do canal radicular, mesmo na ausência de contato físico do material com os microrganismos.

Leonardo et al.<sup>65</sup>, em 1997, in vitro, empregaram duas pastas à base de hidróxido de cálcio (Calen, Calasept), e também o óxido de zinco e eugenol, sobre cepas específicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* e duas cepas isoladas de saliva, o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus mutans*. Esses testes foram realizados pelo método de difusão, em meios sólidos Brain Heart Infusion Agar (BHIDifco) e Muller Hinton Medium (Difco), semeados pela técnica de pour plate. Os meios foram otimizados pelo gel de TTC a 1,0%. As pastas testadas foram colocadas em poços

(4x4mm), em pontas de papel absorventes, e mantidas por 2 horas à temperatura ambiente para o processo de difusão das mesmas. Decorridos 24 horas de incubação a 37°C, os halos de inibição formados foram então mensurados. Os resultados mostraram que as pastas Calen e Calasept inibiram todas as cepas bacterianas pelos dois métodos de avaliação empregados. A pasta de óxido de zinco e eugenol mostrou-se ineficiente, sem qualquer ação contra *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

Estrela et al.<sup>31</sup> (1998) determinaram *in vitro* o efeito antimicrobiano direto do hidróxido de cálcio sobre vários microrganismos (*M. luteus*; *S. aureus*, *F. nucleatum*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Streptococcus* ssp.), em intervalos de 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Estas cepas foram cultivadas em Brain-Heart-Infusion (BHI), com exceção do *F. nucleatum* onde foi cultivada em meio reduzido (BHI-pras). Cones de papel autoclavados foram imersos em culturas puras destes microrganismos e em misturas pelo período de 3 minutos, e posteriormente cobertos com pasta de hidróxido de cálcio associada ao soro fisiológico, sendo removidos nos diferentes períodos, e transferidos para o meio apropriado (BHI) para observar seu crescimento e multiplicação. A incubação foi conduzida a 37°C por 48 horas, de acordo com as exigências de oxigênio de cada microrganismo. O efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio foi demonstrado ocorrer após 12 horas sobre o *M. luteus* e o *F. nucleatum*, 24 horas sobre o *Streptococcus* ssp, 48 horas sobre a *E. coli*, e 72 horas sobre o *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

O hidróxido de cálcio é considerado uma base forte, com pH aproximado de 12,5, que apresenta uma baixa solubilidade em água. A grande maioria das bactérias patogênicas para o homem não é capaz de sobreviver em meio alcalino. Como o pH do hidróxido de cálcio é cerca de 12,5 conforme relata Siqueira Jr.<sup>125</sup> (1998), depreende-se que praticamente todas as espécies bacterianas já isoladas de canais infectados são sensíveis aos seus efeitos, sendo eliminadas em curto período de tempo, quando em contato direto com esta substância. A atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio está desta forma, relacionada à liberação de íons cálcio e hidroxila, oriundos de sua dissociação. Os íons hidroxila são radicais livres altamente oxidantes que apresentam extrema reatividade, ligando-se a biomoléculas próximas ao seu local de formação Leonardo<sup>68</sup>,2005; Lopes, Siqueira Jr<sup>70</sup>,2004; Tanomaru Filho<sup>139</sup>, 2002).

A variação o pH reflete na viabilidade bacteriana, uma vez que influencia a atividade enzimática. Todo o metabolismo celular é dependente da ação de enzimas, as quais possuem uma faixa estreita de pH onde a atividade ou estabilidade é ótima

girando em torno da neutralidade (Padan et al.<sup>91</sup>, 1981). A alcalinização promovida pelo hidróxido de cálcio induz a desnaturação de enzimas, alterando sua estrutura tridimensional, resultando na perda de sua atividade biológica e conseqüentemente comprometendo a atividade microbiana.

Estrela et al.<sup>33</sup> (1994) estudaram o efeito biológico do pH na atividade enzimática de bactérias anaeróbias. A análise de uma variedade de fatores isolados correlacionando pH e as atividades de enzimas bacterianas e teciduais, permitiu levantar a hipótese de que o hidróxido de cálcio poderia inativar as enzimas bacterianas de modo irreversível ou definitivo, quando em condições extremas de pH em longos períodos de tempo. E também uma inativação enzimática reversível ou temporária, quando do retorno do pH ideal à ação enzimática, haveria volta à sua atividade normal. Estes fatores proporcionaram aos autores acreditarem que na realidade o hidróxido de cálcio apresenta duas grandes propriedades enzimáticas: a de inibir as enzimas bacterianas, levando ao efeito antibacteriano, e a de ativar as enzimas teciduais, como a fosfatase alcalina, gerando o efeito mineralizador.

Estrela et al.<sup>32</sup> (1999) reportaram que a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio decorrente de seu pH elevado, determinada pela liberação de íons hidroxila, requer tempo ideal para a efetiva ação dos microrganismos, quer por contato direto ou indireto nos túbulos dentinários. Nesta pesquisa, foi avaliado o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio em túbulos dentinários infectados, a partir de sua difusão, nos períodos de 0, 48, 72 horas e 7 dias. Quatro cepas bacterianas: *S. faecalis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *P. aeruginosa* foram repicadas em 5 ml de Brain-Heart-Infusion (BHI) e incubada a 37°C por 24 horas. Cinco grupos de 12 dentes anteriores foram instrumentados, esterilizados em autoclave, inoculados com estes microrganismos por um período de 28 dias. A seguir, foram irrigados com soro fisiológico e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio e soro fisiológico. Em intervalos de 0, 48, 72 horas e 7 dias, a pasta de hidróxido de cálcio foi removida, os canais radiculares foram secados e os dentes imersos em 5 ml de caldo BHI, mantidos a 37°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi evidenciado pela turvação do meio de cultura e confirmado pela semeadura destes caldos em placas de ágar BHI a 37°C por 24 horas. Coloração de Gram foi realizada a partir do crescimento do caldo bem como das colônias das placas de ágar BHI, para confirmação microscópica dos microrganismos inoculados. Os resultados mostraram que no período de 7 dias o hidróxido de cálcio foi inefetivo por ação indireta contra os microrganismos testados.

Apesar de o pH alcalino ser um fator prejudicial à sobrevivência de microrganismos, muitas espécies implicadas em infecções dos canais radiculares conseguem manter sua viabilidade frente a alterações no pH. Alguns microrganismos como o *E. faecalis* e *C. albicans* podem sobreviver em meio extremamente alcalino. Mc Hugh et al.<sup>75</sup> (2004) avaliaram o comportamento do *E. faecalis* frente a diferentes intervalos de pH. Os resultados demonstraram que na faixa de pH 10.5 a 11.0 o crescimento do *E. faecalis* é retardado, enquanto que em pH 11.5 ou acima deste valor nenhum crescimento é verificado.

Porém, Waltimo et al.<sup>149</sup> (1999) avaliaram a susceptibilidade do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio, que permaneceram em contato por 5 minutos a 6 horas. *E. faecalis* apresentou resistência igualmente alta ou até mesmo maior ao hidróxido de cálcio

*E. faecalis* e alguns microrganismos apresentam maior resistência ao hidróxido de cálcio devido possuírem sofisticados mecanismos para regulação do pH intracitoplasmático para níveis compatíveis com a sobrevivência, a despeito de alterações do pH no ambiente (Booth<sup>14</sup>, 1985).

Tem sido relatado o isolamento de *E. faecalis* mesmo em ambientes com pH 11.5. Esta resistência de *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio está relacionada a uma bomba de prótons ativa, que reduz o pH intracitoplasmático por bombear prótons para o interior da células (Evans et al.<sup>34</sup>, 2002).

Quillin et al.<sup>101</sup> (1992) testaram os efeitos antimicrobianos, in vitro, de pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  associadas à clorexidina e ao metronidazol, em várias concentrações, em dentes infectados e preparados biomecanicamente. Dentes de humanos unirradiculados, recentemente extraídos, foram preparados com imagem circular e inoculados com uma mistura de *Bacteroides intermedius*, *F. nucleatum*, *S. faecalis* e *Eubacterium vuri*. Os canais infectados foram preenchidos com os medicamentos formulados, selados com cera esterilizada e incubados anaerobicamente no meio Brucella complementado com hemina/menadiona (BHM) a 37°C. Nos intervalos de tempo, os medicamentos foram removidos e os dentes colocados em BHM e incubados por sete dias. Crescimento positivo, observado pela turbidez, foi confirmado por procedimentos bacteriológicos padrões. Nos casos de resultados negativos (sem crescimento), BHM foi analisado para determinar a presença e concentração de substâncias inibitórias difusas. Resultados preliminares, usando método de difusão em

ágar, mostraram que preparações contendo metronidazol e clorexidina foram superiores ao  $\text{Ca(OH)}_2$  sozinho na inibição do crescimento dos organismos testados.

Behnen et al.<sup>9</sup> (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de várias preparações de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) na dentina de canal radicular infectado com *E. faecalis*. Raízes de incisivos bovinos extraídos foram preparadas formando espécimes cilíndricos, standardizados com 5 mm de comprimento, a smear layer foi removida e os espécimes foram incubados por 24 horas a 37°C em meio de cultura bacteriológico, contendo  $7 \times 10^4$  unidades formadoras de colônias por mililitro de *E. faecalis*. Os espécimes foram montados em placas de cultura individuais, com 4 mm de diâmetro, e o material teste foi aplicado para preencher a luz do canal. Havia cinco grupos de tratamento: grupo 1, uma mistura espessa de  $\text{Ca(OH)}_2$  USP (1g/ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ); grupo 2, uma mistura fina de  $\text{Ca(OH)}_2$  USP (0,1g/ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ); grupo 3, pasta Pulpdent TempCanal™; grupo 4,  $\text{H}_2\text{O}$  esterilizada (controle positivo); e grupo 5, 25 espécimes de dentina no meio de infusão Brain Heart, não inoculado, esterilizado, que foram incluídos como controles negativos. A análise microbiológica quantitativa da dentina, em várias profundidades, foi completada após 24 horas. Todos os grupos mostraram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) no número de *E. faecalis*, em todas as profundidades de dentina, comparados com o controle. Os grupos 2 e 3 demonstraram atividade antimicrobiana significativamente maior (redução de 73%-86%) em todas as profundidades de dentina testadas comparados com o grupo 1 (13%-26%) ( $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que o  $\text{Ca(OH)}_2$  pode diminuir o número de *E. faecalis* em todas as profundidades dos túbulos dentinários dentro de 24 horas, e preparações mais finas de  $\text{Ca(OH)}_2$  pode ser mais efetiva na eliminação de *E. faecalis* dos túbulos dentinários que preparações espessas.

Weiger et al.<sup>150</sup> (2002), propõem um método alternativo para caracterizar a viabilidade bacteriana na dentina radicular humana infectada através da determinação da proporção de microrganismos viáveis e não viáveis, quando foi utilizado hidróxido de cálcio como medicação. Para este estudo foram selecionados 24 dentes humanos que tiveram o diâmetro e extensão dos canais padronizados sendo, em seguida, esterilizados. Os espécimes foram divididos em dois grupos ( $n=12$ ) para contaminação com *E. faecalis* e *S. sanguinis* por 8 semanas. Cada um dos grupos foi subdividido em 1 grupo controle ( $n=6$ ) e 1 grupo teste ( $n=6$ ). Amostras da dentina radicular, através da ampliação padronizada do canal radicular, foram coletadas para determinar o padrão de contaminação após 4 semanas. Estas foram comparadas com amostras coletadas na 8ª

semana (grupo controle) e com aquelas coletadas na 12ª semana (grupo teste) após 28 dias de aplicação de curativo de hidróxido de cálcio. As amostras foram analisadas pela microscopia de fluorescência para determinação da proporção de bactérias viáveis e não viáveis e através da contagem de unidades formadoras de colônias. Bactérias viáveis e não viáveis foram identificadas em todas as amostras da dentina radicular. Nos grupos controles, a proporção de bactérias viáveis e avaliação das UFC não apresentaram grandes variações entre as amostras coletadas na 4ª e 8ª semana. Para o grupo teste, contaminado com *E. faecalis* observou-se 56,2% de bactérias viáveis e média de 5.3 log UFC. Os autores concluíram que a viabilidade do *E. faecalis* não foi afetada pelo hidróxido de cálcio.

Turk et al.<sup>143</sup> (2009) investigaram in vitro a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio (CH), em combinação com glicerina, gluconato de clorexidina (CHX), cetrimida, ou água destilada contra *E. faecalis* e *C. albicans*. Poços padronizados nas placas de ágar foram realizados e preenchidos com uma das preparações de CH e os agentes de controle. As zonas de inibição microbiana foram medidas após o período de incubação. Os preparados de CH com glicerina e CHX demonstraram atividade antifúngica mais do que preparados de CH com cetrimida e água destilada. Os preparados de CH- glicerina não tiveram qualquer efeito contra o *E. faecalis*, e o preparado CH- CHX foi o medicamento mais eficaz. A atividade antimicrobiana de CH pode mudar com o tipo do veículo e contra microrganismos diferentes. *E. faecalis* foi mais resistente do que a *C. albicans* aos preparados de CH.

## 2.5 Hidróxido de cálcio com PMCC

Algumas pesquisas demonstram que para uma efetiva ação antimicrobiana contra os microrganismos citados anteriormente, o uso do paramonoclorofenolcanforado (PMCC), tem mostrado bons resultados.

Baseados na justificativa de que embora o hidróxido de cálcio apresente maior eficácia contra os microrganismos anaeróbios, no início da década de 90, Leonardo<sup>68</sup> (2005), voltou a preconizar o emprego da associação do hidróxido de cálcio com paramonoclorofenolcanforado (PMCC), pois este tem atividade antimicrobiana contra alguns anaeróbios facultativos, como os enterococos. Assim, as associações das duas substâncias iriam conferir um maior espectro de atividade antimicrobiana.

O paramonoclorofenol canforado é constituído por uma mistura líquida, oriunda da combinação do paramonoclorofenol com a cânfora, em partes variáveis, 25 a 35% de paramonoclorofenol e 65 a 75% de cânfora. O paramonoclorofenol apresenta-se sob a forma de cristais e possui odor fenólico característico. A cânfora é, quimicamente, uma cetona terpênica bicíclica, derivada do canfeno e obtida da canforeira, árvore da família das lauráceas. Apresenta-se sob a forma de cristais incolores ou massas cristalinas friáveis e translúcidas, untuosas ao tato; tem odor penetrante, característico, e sabor amargo; é uma substância aromática, muito pouco solúvel em água (1:800). Dessa forma, o paramonoclorofenol canforado, quando empregado em associação ao hidróxido de cálcio, funciona como veículo oleoso, em razão da cânfora ser considerada um óleo essencial e apresentar baixa solubilidade em água (Lopes et al.<sup>69</sup>, 2004).

Em 1983, Stevens, Grossman<sup>131</sup> avaliaram a efetividade do hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) e paraclorofenol canforado (PCC), como medicamentos intracanal. Foram utilizados quatro caninos de gatos, inoculados com *S. faecalis*: dois foram medicados com uma pasta à base de  $\text{Ca(OH)}_2$  – Pulpdent; um foi medicado com PCC e um dente não recebeu medicação. Durante cinco semanas de observação, o PCC apresentou culturas negativas em todos os períodos, enquanto o  $\text{Ca(OH)}_2$  mostrou crescimento microbiano consistente. A eficácia dos medicamentos também foi avaliada em *S. faecalis* in vitro, pelo método de difusão em ágar. Zonas maiores de inibição (19,5 mm de diâmetro) foram observadas para o PCC quando comparadas as do  $\text{Ca(OH)}_2$  (10 mm). Foi concluído que tanto em dentes de gatos quanto in vitro, o  $\text{Ca(OH)}_2$  não foi efetivo em destruir *S. faecalis*, quando comparado ao PCC.

Souza et al.<sup>129</sup> (1989) avaliaram o sucesso clínico e radiográfico de dentes portadores de necrose pulpar e lesão perirradicular crônica empregando pasta aquosa de hidróxido de cálcio com PMCC e glicerina. Os autores concluíram que o preenchimento do canal de dentes portadores de necrose pulpar e reação perirradicular crônica com hidróxido de cálcio com PMCC conduz a uma elevada porcentagem de reparos clínicos e radiográficos.

Orstavik, Haapasalo<sup>90</sup> (1990) avaliaram, in vitro, a ação desinfetante da pasta Calasept, PMCC (6:3), sobre cilindros de dentina infectados com *E. faecalis*, *S. sanguis*, *E. coli* ou *P. aeruginosa*. Avaliaram também o efeito da camada residual sobre cilindros infectados com *E. sanguis* e *E. faecalis*, mediante aplicação do PMCC gasoso ou líquido, e a ação da Calasept sobre *S. sanguis*. Verificaram que a pasta Calasept

não eliminou *E. faecalis* em 10 dias, sendo as demais espécies eliminadas em períodos variáveis, não ultrapassando 24 horas. O PMCC na forma líquida inativou *S. sanguis* em cinco minutos e *E. faecalis* em 60 minutos. Na forma de vapor, o PMCC aboliu o crescimento de *E. coli* em 20 minutos. Contudo, mais tempo foi necessário contra *E. faecalis*, *S. sanguis* e *P. aeruginosa*. Portanto, o PMCC foi mais efetivo que o hidróxido de cálcio. Concluíram que a camada residual retardou, mas não aboliu o efeito antibacteriano do PMCC na forma líquida ou gasosa, bem como do hidróxido de cálcio.

Empregando técnicas diferentes no preparo biomecânico dos canais radiculares de dentes de cães com reação periapical crônica induzida, e medicação intracanal com pasta à base de hidróxido de cálcio, Leonardo et al.<sup>63</sup>, em 1994, avaliaram o processo de reparo dos tecidos periapicais através de análise histomicrobiológica e acompanhamento radiográfico. Empregaram 40 canais radiculares de pré-molares superiores e inferiores de cães adultos jovens. Após o período de indução das lesões, os canais radiculares foram instrumentados sendo no Grupo I irrigados com o hipoclorito de sódio a 4% -6%, recebendo uma pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen/PMCC) por 7 dias. No Grupo II, a solução irrigadora utilizada foi o hipoclorito de sódio a 0,5% (Dakin), sendo os canais radiculares obturados imediatamente após preparo biomecânico. Em ambas as técnicas o cimento obturador empregado foi o Sealapex. Decorridos 270 dias, os animais foram sacrificados e o material preparado para análise histomicrobiológica, empregando-se o método de coloração de Brown e Brenn. Pelos resultados obtidos, o grupo que recebeu a medicação intracanal com Calen/PMCC demonstrou os melhores índices de sucesso quanto ao desaparecimento ou mesmo regressão acentuada das lesões periapicais. A extensão da invasão bacteriana para o interior dos túbulos dentinários foi muito mais intensa no grupo sem a medicação intracanal, bem como a quantidade de bactérias encontradas nas ramificações do delta apical e luz do canal radicular.

Estrela et al.<sup>27</sup> (1995) analisaram o efeito antibacteriano de duas pastas de hidróxido de cálcio, uma associada ao soro fisiológico e a outra ao paramonoclorofenol canforado, sobre microrganismos facultativos (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. faecalis*) em períodos de 24 e 48 horas, através do método de difusão em ágar. Os resultados demonstraram que as duas pastas foram efetivas sobre todos os microrganismos analisados em 24 e 48 horas. A pasta que continha o hidróxido de cálcio com PMCC mostrou um maior halo de inibição de crescimento. Embora, os

autores acreditam que este fato ocorreu devido a dificuldade de difusão dos íons hidroxila da pasta de hidróxido de cálcio com soro fisiológico no ágar.

Siqueira et al.<sup>116</sup> (1996) avaliaram a atividade antimicrobiana de algumas pastas de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$  - 1g, Óxido de zinco 0,5 g, PMCC- 0,5 ml e glicerina;  $\text{Ca(OH)}_2$  - 1g, Óxido de zinco 0,5 g, PMCC - 1 gota, glicerina;  $\text{Ca(OH)}_2$  - 1g, Óxido de zinco 1g, PMCC 0,5 ml, glicerina;  $\text{Ca(OH)}_2$  + água destilada; hidróxido de potássio - 1 pastilha; hidróxido de sódio - 1 pastilha; óxido de zinco + água destilada), sobre os seguintes microrganismos: *F. nucleatum*, *E. faecalis* e *S. sobrius*, utilizando o teste de difusão em ágar. Os resultados mostraram que das três bases fortes testadas, os hidróxidos de sódio e potássio apresentaram atividade antimicrobiana excelente. Nenhuma zona de inibição associada ao hidróxido de cálcio foi observada. Das pastas contendo diferentes proporções de hidróxido de cálcio, óxido de zinco e PMCC, as que continham uma maior quantidade desta última substância apresentaram maiores efeitos inibitórios. O óxido de zinco, adicionado à pasta para conferir-lhe radiopacidade, não apresentou qualquer efeito antibacteriano.

Em 1996, Siqueira Jr., Uzeda<sup>122</sup> infectaram experimentalmente cilindros de dentina de bovinos com bactérias anaeróbicas obrigatórias: *A. israelii* e *F. nucleatum*, ou bactérias anaeróbicas facultativas: *E. faecalis*. Os espécimes infectados foram expostos a pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  misturado com soro ou paramonoclorofenol canforado (PMCC) por períodos de uma hora, um dia e uma semana. A viabilidade das bactérias após os períodos de exposição foi avaliada pela incubação dos espécimes em meio de cultura para comparar a efetividade das pastas na desinfecção dos túbulos dentinários. A pasta  $\text{Ca(OH)}_2$ /PMCC matou efetivamente bactérias nos túbulos após uma hora de exposição, exceto para o *E. faecalis*, que necessitou de um dia de exposição. Em contraste, a pasta  $\text{Ca(OH)}_2$ /soro foi ineficaz contra *E. faecalis* e *F. nucleatum*, mesmo após uma semana de exposição. Os resultados mostraram que o PMCC aumentou os efeitos antibacterianos do  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Siqueira et al.<sup>115</sup> (1997) estudaram a desinfecção por pasta de hidróxido de cálcio associado ao soro fisiológico e ao PMCC, em dentina bovina infectada com *A. israelii*, *F. nucleatum* e *E. faecalis*, nos períodos de 1 hora, 1 dia e 1 semana. Os resultados mostraram que a pasta de hidróxido de cálcio com PMCC foi efetiva matando bactérias nos túbulos após 1 hora de exposição, exceto o *E. faecalis* que requer 1 dia de exposição. A pasta de hidróxido de cálcio associada ao soro fisiológico foi inefetiva

após uma semana de exposição. Os resultados mostraram que o PMCC aumentou o efeito antimicrobiano do hidróxido de cálcio.

As atividades antibacterianas do PMCC, CHX e  $\text{Ca(OH)}_2$  foram comparadas por Barbosa et al.<sup>4</sup> 1997, através de avaliação clínica e laboratorial. No experimento clínico, os canais radiculares que apresentavam culturas positivas uma semana após o completo preparo químico-mecânico e curativo com PMCC foram medicados com uma das três substâncias testadas. Amostras após a medicação foram obtidas dos canais uma semana após. No experimento laboratorial, o teste de difusão em ágar foi usado para avaliar a atividade inibitória dos medicamentos contra bactérias comumente encontradas em infecções endodônticas. Os resultados da avaliação clínica mostraram que todos os medicamentos foram efetivos em reduzir ou eliminar a microbiota endodôntica, como demonstrado pela incidência de culturas negativas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os medicamentos testados. Na avaliação laboratorial, o PMCC mostrou zonas de inibição bacteriana maiores contra todas as cepas testadas.

Estrela et al.<sup>26</sup> (2001) avaliaram a influência dos veículos sobre a eficácia antimicrobiana do hidróxido de cálcio. Um total de 588 pontas de papel absorvente esterilizadas tamanho 50 foram imersas em várias suspensões microbianas por 3 min. As pontas foram então colocadas em Placas de Petri e cobertas com curativos intracanal contendo hidróxido de cálcio:  $\text{Ca (OH)}_2$ + Salina,  $\text{Ca (OH)}_2$ + Paramonoclorofenol canforado,  $\text{Ca (OH)}_2$  + solução de clorexidina 1%;  $\text{Ca (OH)}_2$  + lauril sulfato de sódio 3%;  $\text{Ca (OH)}_2$ + Otosporin®. Após 1 min, 48 e 72 h e 7 dias, 147 cones de papel absorvente foram removidos do contato com os curativos intracanal e transportados individualmente e imersos em 5 mL de caldo LB, seguido de incubação a 37°C por 48 h. Crescimento microbiano foi avaliado pela turvação do meio de cultura. Um inóculo de 0,1 mL obtido do LB foi transferido para 5 mL de BHI, e incubado a 37°C por 48 h. O crescimento bacteriano foi novamente avaliado pela turvação do meio de cultura. Tubos positivos BHI foram selecionados e inóculos foram espalhados sobre a superfície de ágar BHI e incubados a 37° C por 48 h. O efeito antimicrobiano ocorreu após 48 h em as culturas de *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e uma cultura mista, independentemente da medicação intracanal. Nas condições deste estudo, os vários veículos associados com o hidróxido de cálcio não influenciaram o tempo necessário para inativação microbiana.

Em outros experimentos, Siqueira Jr. et al.<sup>118</sup> (2001), utilizando cilindros de dentina bovina contaminada com cultura mista de *F. nucleatum* e *P.intermedia*, anaeróbios estritos comumente encontrados em infecções endodônticas, expostos por 3 a 5 dias a quatro formulações diferentes de hidróxido de cálcio, avaliaram a viabilidade bacteriana por meio de incubação dos espécimes em caldo de cultura, de forma a comparar a efetividade das pastas na descontaminação da dentina. Apenas a pasta de hidróxido de cálcio, PMCC e glicerina foram capazes de, efetivamente, descontaminar a dentina, após dias de contato.

Em 2002, Leonardo et al.<sup>66</sup>, avaliaram *in vivo* o reparo apical e periapical utilizando o hidróxido de cálcio (Calen PMCC) como medicação intracanal em diferentes períodos de tempo. Foram utilizados 61 canais radiculares de cães, que após a remoção da polpa, foram expostos à cavidade oral por 7 dias e selados com cimento de óxido de zinco e eugenol por 45 dias. Estabelecidas as lesões periapicais, os dentes foram instrumentados com o auxílio do NaOCl 5,25% e o hidróxido de cálcio foi aplicado. Os períodos avaliados foram 7, 15 e 30 dias. Os autores verificaram em 7 dias a presença de reabsorção cementária e infiltrado inflamatório contendo neutrófilos polimorfonucleares. Em 7 dias também, a espessura do ligamento periodontal foi aumentada devido à intensa reabsorção óssea enquanto que em 15 e 30 dias, a neoformação óssea causou uma diminuição nesta espessura. Em 30 dias a inflamação encontrava-se moderada, sem neutrófilos com intensa neoformação de fibras colágenas indicando uma evolução do processo de reparação. Assim, puderam concluir que os melhores resultados histopatológicos ocorreram de 15 a 30 dias.

Sukawat, Srisuwan<sup>133</sup> (2002) compararam a eficácia antimicrobiana de três diferentes formulações de hidróxido de cálcio utilizando espécimes de dentina humana que foram infectados com *E. faecalis*. Após exposição a três tipos de hidróxido de cálcio (hidróxido de cálcio misturado com água destilada, com clorexidina 0,2%, e com paramonoclorofenol canforado) por sete dias, obteve-se pó de dentina dos espécimes infectados e a quantidade bacteriana foi avaliada por espectrofotometria. Observou-se que o hidróxido de cálcio misturado com paramonoclorofenol canforado matou todos os *E. faecalis* dentro dos túbulos dentinários. Este resultado foi melhor que o obtido com hidróxido de cálcio misturado com água destilada ou com clorexidina 0,2% ( $p < 0,05$ ). Hidróxido de cálcio misturado com água destilada e com clorexidina 0,2% foi ineficaz contra esta bactéria.

Menezes et al.<sup>77</sup> (2004) avaliaram in vitro a efetividade do hipoclorito de sódio (NaOCl), clorexidina (CHX) e cinco medicações intracanal em microrganismos dentro de canais radiculares. Noventa e seis dentes humanos unirradiculares extraídos foram utilizados. Após a remoção das coroas, os canais radiculares foram preparados e as superfícies radiculares externas cobertas com resina epóxica. Os dentes foram esterilizados, contaminados com *C. albicans* e *E. faecalis* e incubados a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por sete dias. Os dentes foram divididos de acordo com a solução irrigadora ou medicação intracanal: grupo 1, soro fisiológico esterilizado (SFE) e pasta de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ); grupo 2, SFE e paramonoclorofenol canforado (PMCC); grupo 3, SFE e tricresol formalina; grupo 4, SFE e pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$  + PMCC; grupo 5, SFE e PMC furacin; grupo 6, NaOCl 2,5% sem medicação intracanal; grupo 7, CHX 2% sem medicação intracanal e grupo 8, SFE sem medicação intracanal (grupo controle). Amostras microbiológicas foram coletadas com pontas de papel esterilizadas e o crescimento microbiano foi determinado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA,  $p=0,05$ ). Para *C. albicans*, os grupos 3 e 8 foram estatisticamente menos eficientes que os grupos 1, 2, 4 e 5 (Kruskal-Wallis (K-W) = 65,241;  $gl=7$ ;  $p=0,001$ ). Para *E. faecalis*, os grupos 6 e 8 foram estatisticamente menos eficientes que os grupos 1-4 e 7 (K-W = 61,048;  $gl=7$ ;  $p=0,001$ ). Concluiu-se que a pasta  $\text{Ca(OH)}_2$  + PMCC foi a medicação intracanal mais eficiente na eliminação dos dois microrganismos e a solução de CHX 2% foi mais efetiva que o NaOCl 2,5% contra *E. faecalis*.

Siqueira Jr. et al.<sup>117</sup> (2007) em estudo clínico investigaram a redução bacteriana após instrumentação com hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl) como agente irrigante e posterior preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ )/paramonoclorofenol canforado. Onze dentes com infecções intra-radulares primárias e lesão periapical crônica foram selecionados de acordo com rigorosos critérios de inclusão / exclusão. As amostras bacterianas foram coletadas antes do tratamento (S1), após o preparo químico-mecânico utilizando limas manuais de NiTi e NaOCl 2,5% (S2), e após 7 dias com medicação intracanal de pasta de hidróxido de cálcio com PMCC (S3). Cultura de bactérias dos canais radiculares infectados foram removidas nas três fases e identificados por meio de análise de seqüências do Gene 16S rRNA. No S1, todos os casos abrigaram bactérias, com uma taxa média de 2,8 por canal (faixa, 1-6). No S2, 6 dos 11 (54,5%) casos resultaram culturas positivas, com uma a três espécies por canal. No S3, apenas um caso (9,1%) foi positiva para a presença de bactérias, com *Propionibacterium acnes* como o microrganismo isolado.

Uma redução significativa de bactérias foi observada entre S1 e S2 e S1 e S3. Diferenças significativas também foram observadas para comparações envolvendo amostras S2 e S3 que diz respeito a redução bacteriana quantitativas ( $p= 0,029$ ) quanto ao número de casos de cultura negativa ( $p= 0,03$ ). Concluíram que o preparo químico-mecânico, com NaOCl 2,5% como um irrigante, reduziu significativamente o número de bactérias no canal, mas não conseguiu promover o canal livre de bactérias cultiváveis em mais de metade dos casos. O curativo intracanal com pasta de  $\text{Ca(OH)}_2$ /PMCC por 7 dias aumentou significativamente o número de casos de cultura negativa.

Lana et al.<sup>61</sup> (2009) avaliaram a eficácia de pastas de hidróxido de cálcio: Calen-PMCC e Calen associadas ao preparo químico-mecânico. Foram avaliadas sobre o crescimento de *E. faecalis* no interior de canais radiculares. Setenta incisivos esterilizados foram inseridos em meio TSB, e contaminados com *E. faecalis*. O Meio de cultura foi substituído a cada 24 horas e incubados a 37 °C por 72h. Após o preparo químico-mecânico, os canais radiculares foram preenchidos com Calen e Calen-PMCC (7 ou 14 dias). As medicações foram removidas e os dentes foram inseridos em tubos de ensaio contendo caldo Enterococcosel. Pasta Calen (mantido por 7 e 14 dias) induziu eliminação de 70% de enterococos e pasta Calen-PMCC eliminou 100% somente após manutenção por 14 dias. Esses medicamentos foram significativamente mais eficazes ( $p < 0,001$ ) do que o preparo químico-mecânico somente a pasta Calen-PMCC mantido por 7 dias; ambos foram incapazes de eliminar a viabilidade de enterococos. Pastas de hidróxido de cálcio demonstraram importantes efeitos adjuvantes na eliminação do enterococo durante o preparo químico-mecânico do sistema de canais radiculares. Quando associado com PMCC, as pastas de hidróxido de cálcio devem ser mantidas por pelo menos 14 dias.

Leonardo et al.<sup>67</sup> (1993), conduziram e estabeleceram uma formulação na consistência de pasta à base de hidróxido de cálcio, para ser empregada como medicação intracanal. Dentre as várias fórmulas propostas, a que apresentou melhores resultados físico-químicos e biológicos foi 2,5g de hidróxido de cálcio; 0,5g de óxido de zinco; 0,05g de colofônia e como veículo 1,75mL de polietilenoglicol 400, que é uma substância viscosa, incolor, ligeiramente higroscópico. Esta pasta acondicionada em tubos de anestésicos é distribuída: pela S.S. White Artigos Dentários Ltda com o nome de pasta Calen. Para facilitar a sua aplicação, os autores elaboraram uma seringa especial ML, com êmbolo rosqueável, à qual se acopla uma agulha descartável 27G, tornado-se fácil e segura à aplicação de hidróxido de cálcio no canal radicular,

principalmente no seu segmento apical. Composição, por tubete, das pastas Calen e Calen/PMCC, de acordo com Leonardo et al.<sup>68</sup>:

Pasta Calen	Pasta Calen /PMCC
Hidróxido de Cálcio.....2,5g	Hidróxido de Cálcio.....2,5g
Óxido de Zinco.....0,5g	Óxido de Zinco.....0,5g
Colofônio.....0,05g	Colofônio.....0,05g
Polietilenoglicol 400.....2,0mL	Polietilenoglicol 400.....2,0mL
	PMCC.....(2,5:7,5) 0,15 mL

Embora a eficácia antimicrobiana do hidróxido de cálcio, principalmente sobre as bactérias anaeróbias facultativas, seja melhorada com o uso do PMCC, algumas pesquisas demonstram que esta substância é citotóxica para os tecidos periapicais.

Mauricio et al.<sup>74</sup> (1986) realizaram um estudo histomorfológico do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de pastas à base de hidróxido de cálcio, contidas em tubos de dentina humana . Para tanto, utilizaram 36 ratos, albinos, machos, adultos jovens, divididos em 3 grupos, de 12 animais cada, agrupados inicialmente em gaiolas para 3 indivíduos. Os animais receberam implantes de tubos de dentina humana contendo as seguintes pastas: Grupo 1- Hidróxido de cálcio + Polietilenoglicol 400; Grupo 2 – Hidróxido de cálcio + Lipiodol (ultrafluido) e Grupo 3 - Hidróxido de cálcio + Paramonoclorofenol canforado 2,5:7,5. Decorridos os períodos de 30, 60, 90 e 120 dias, os animais foram sacrificados e as áreas circunjacentes aos implantes, removidas e preparadas para estudo histológico. As misturas correspondentes aos Grupos I, II e III comportaram-se como irritantes do tecido conjuntivo subcutâneo de rato, possibilitando no entanto cápsula em colagenização progressiva no decorrer dos períodos. Em ordem decrescente de agressividade determinada pela histocompatibilidade, têm-se: Grupo II (Hidróxido de cálcio + Lipiodol); Grupo III (Hidróxido de cálcio + Paramonoclorofenol canforado) e o Grupo I (Hidróxido de cálcio + Polietileno glicol).

Carvalho et al.<sup>16</sup> (1991) analisaram histomorfologicamente o comportamento dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães, após biopulpectomia, quando do emprego como "medicação intracanal" do paramonoclorofenolcanforado, nas proporções 3,5:6,5 e 2,5:7,5, tendo como controle o macrogol 400. Após avaliação em períodos experimentais de 3 e 7 dias, concluiu-se que a utilização de substâncias líquidas missíveis nos fluidos intersticiais, ainda que consideradas inócuas, devem ser contra-indicadas como "medicação intracanal", por

permitir efeito de espaço vazio; a proporção comercial do paramonoclorofenolcanforado (3,5:6,5) determinou extensas necroses e intenso quadro reacional inflamatório, chegando à formação de microabscessos apicais e periapicais em alguns casos; a proporção 2,5:7,5 do paramonoclorofenol canforado (titulação padrão) apresenta menor irritabilidade tecidual, todavia também não indicada em biopulpectomias; a persistente necrose e a reação inflamatória mesmo que com intensidade reduzida aos 7 dias demonstraram efeito sequente das misturas de paramonoclorofenolcanforado.

Para determinar a tolerância tecidual dos medicamentos mais utilizados como medicação intracanal no tratamento endodôntico, Hidalgo et al.<sup>50</sup> (1999) analisaram as reações por eles provocadas sobre o olho de coelho, tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e tecidos periapicais de dentes de animais. Os medicamentos (hidróxido de cálcio, associação corticosteróide/ antibiótico, paramonoclorofenol canforado-PMCC e formocresol) foram instilados sobre a conjuntiva do olho de coelhos e as reações locais foram observadas em vários intervalos de tempo (entre 15min e 96h) posteriores à aplicação. Pela técnica de exsudação de corantes vitais, os quatro medicamentos foram injetados intradermicamente na região dorsal dos ratos, imediatamente após a injeção i.v. de azul de Evans. Decorridos 30 min, 3h, 6h ou 24h, os animais foram sacrificados e as reações avaliadas através de determinação espectrofotométrica da exsudação plasmática. Os resultados mostraram que a associação corticosteróide/antibiótico e o hidróxido de cálcio provocaram resposta inflamatória de leve intensidade (hiperemia, edema e exsudato), retornando à normalidade na sexta hora. Limites anatômicos, opacidade, reflexo e fechamento de pálpebra se mantiveram normais. Por outro lado, observou-se que o PMCC e o formocresol provocaram resposta inflamatória muito mais intensa, ambos apresentando um perfil similar de reação do olho de coelho ao longo do tempo para todos os eventos analisados, com exceção da hiperemia da conjuntiva. Corroborando esses resultados, dados semelhantes foram encontrados no modelo de exsudação de corantes vitais, o que indica que o hidróxido de cálcio e a associação corticosteróide/ antibiótico apresentaram melhor tolerância tecidual.

Nagem Filho et al.<sup>84</sup> (2007) avaliaram a biocompatibilidade do paramonoclorofenolcanforado na proporção 3,5:6,5 (PMCC) e do paramonoclorofenolcanforado associado ao hidróxido de cálcio (PMCC+Ca(OH)<sub>2</sub>) no tecido subcutâneo de ratos, e o potencial antimicrobiano desses medicamentos frente a alguns microrganismos: *S. aureus*, *S. mutans*, *B. subtilis* e *C. albicans*. Utilizaram dez

ratos Wistar que receberam, após a anestesia, a administração endovenosa de corante Evan's Blue, seguida de inoculação de 0,1mL dos respectivos fármacos na região dorsal. A quantidade de corante extravasada, ligadas às proteínas do plasma foi avaliada por meio de espectrofotometria. A atividade antimicrobiana foi realizada através do teste de difusão em ágar através da medida dos halos de inibição contra os microrganismos. Os resultados mostraram que valores médios de densidade óptica para o PMCC foram de  $0,325 \pm 0,025$  (reação moderada) e para o PMCC+Ca(OH)<sub>2</sub> -  $0,211 \pm 0,040$  (reação discreta). Os halos de inibição detectados foram de: PMCC - 7,29mm e PMCC+Ca(OH)<sub>2</sub> - 7,29mm para *S. aureus*; PMCC - 8,57mm e PMCC+Ca(OH)<sub>2</sub> - 7,0mm para *S. mutans*; PMCC - 8,57mm e PMCC+Ca(OH)<sub>2</sub> - 7,43mm para *B. subtilis* e de PMCC - 8,71mm e PMCC+Ca(OH)<sub>2</sub> - 8,29mm para *C. albicans*. Os dados obtidos indicaram que o PMCC mostrou ser mais irritante que o PMCC+Ca(OH)<sub>2</sub>, enquanto que a atividade antimicrobiana não apresentou resultados estatisticamente diferentes entre as substâncias testadas.

Sendo assim, existe um interesse permanente em se buscar substâncias químicas mais efetivas ou com ação mais rápida sobre as bactérias anaeróbias e que sejam biocompatíveis aos tecidos vivos. Dentre as possíveis substâncias, com o intuito de preencher tais objetivos, o ozônio apresenta algumas características biológicas interessantes: ação bactericida, efeito debridante, estímulo a angiogênese, além do efeito oxidante.

## 2.6 O Ozônio

O ozônio (O<sub>3</sub>) é uma variedade alotrópica do oxigênio (O<sub>2</sub>), que se forma na alta atmosfera, naturalmente, por reações fotoquímicas. Serve de filtro contra as radiações ultravioleta emitidas pelo sol quando a 25 km de altitude (UV-A, UV-B e UV-C). Os raios UV-A auxiliam na síntese de vitamina D no organismo, UV-C são absorvidos pela própria atmosfera, não provocando grandes problemas. Já o UV-B é nocivo à saúde, com grande potencial carcinogênico. Os raios ultravioletas atuam como uma descarga elétrica quebrando a ligação do O<sub>2</sub>, transformando-o em oxigênio atômico (O), formando o ozônio no meio ambiente, o que promove a coloração azulada do céu. O ozônio no meio ambiente apresenta a principal função de proteger o ecossistema contra esses raios ultravioletas. Substâncias como o clorofluorcarbono (CFC), subproduto do cloro, destroem a camada de ozônio e como consequência

acarreta no efeito estufa. O CFC sobe para a alta atmosfera e reage com os raios ultravioletas liberando cloro. O cloro que com densidade alta, desce passando pela camada de ozônio, reage produzindo óxidos de cloro e oxigênio (Bocci<sup>12</sup>, 1996).

O ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás bastante reativo, sendo que o prefixo ozo vem do grego “ozein”, com o significado de aroma ou cheiro, que no ozônio é muito forte, característico, penetrante e desagradável, extremamente prejudiciais ao homem (Garduño et al.<sup>37</sup>, 1995).

O gás é incolor, parcialmente solúvel em água, instável e evapora quando na temperatura ambiente. Possui odor facilmente detectado mesmo em concentrações muito baixas (0,01 a 0,05 mg/dl). Fatores como temperaturas elevadas, radiação ultravioleta, agentes catalisadores, pH ácido e força iônica podem acelerar o processo de decomposição do ozônio (Lapolli et al.<sup>62</sup>, 2003).

A história do ozônio iniciou-se em 1834, através do químico alemão Christian Friedrich Schöbein, professor da Universidade de Basel, que reconheceu inicialmente o odor e passou a investigá-lo. Ele percebeu que ao liberar descarga elétrica sobre a água, era produzido um odor diferente. Foi descrito como uma substância oxidante e também desinfetante. Schöbein também notou que a concentração de ozônio aumentava de acordo com a altitude. Um pouco antes de sua morte em 1867, ironicamente por *Bacillus anthracis*, a fórmula molecular do ozônio foi reportada por Jacques-Louis Soret que deixou claro que era composto de oxigênio (Bocci<sup>12</sup>, 1996).

O alemão Werner Von Siemens, em seguida, identificou a possibilidade de geração de ozônio a partir do oxigênio e do ar, por intermédio de descargas elétricas. Desenvolveu o primeiro gerador de ozônio capaz de eliminar microrganismos, ressaltando sua alta instabilidade (Bocci<sup>12</sup>, 1996).

Em vários países da Europa, há mais de oitenta anos, o ozônio é empregado no tratamento de água potável (Barros, Fiorini<sup>5</sup>, 2000)

Paraskeva et al.<sup>92</sup>. (1998) relataram o emprego do ozônio no tratamento de afluentes em áreas de lazer e de água potável na Europa, descrevendo o ozônio como um desinfetante potente, que inativa microrganismos, matéria orgânica e inorgânica com ação bastante rápida, deixando menor quantidade de subprodutos. Com o emprego do cloro, além da cor amarelada da água, esta fica com sabor e odor desagradáveis, e com uma maior quantidade de subprodutos, extremamente nocivos. O

maior emprego do cloro no tratamento e desinfecção da água deve-se ao fator custo, pois no tratamento da água com cloro, resulta no preço mais acessível.

Considerando sua característica altamente oxidante, o ozônio começou a despertar interesse, dentro da área biológica. Estudos microbiológicos da ação antimicrobiana da água ozonizada e sua eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas associadas com alimentos começaram a fornecer dados para aplicação na indústria de alimentos, sendo que Restaino et al.<sup>103</sup> (1995), afirmaram que o emprego do ozônio resultou em redução microbiana, podendo ser aplicada no controle microbiano de alimentos. A água ozonizada exposta contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras foi eficaz na destruição destes patógenos, ressaltando maior resistência dos esporos fúngicos. Seguindo a mesma linha da indústria alimentícia, Güzel-Seydim et al.<sup>44</sup> (2004) relataram o emprego do ozônio como agente antimicrobiano, utilizado na higiene de superfície de frutas e vegetais, aumentando a validade dos produtos.

O ozônio oxida as paredes celulares e membranas citoplasmáticas das bactérias, agindo também sobre fungos, protozoários e vírus. Este gás forma radicais oxidantes na presença de água, que penetram e atacam as membranas celulares, afetando o equilíbrio osmótico, promovendo a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucléicos, causando lise celular dependente da extensão das reações (Garduño et al.<sup>37</sup>, 1995; Oizumi et al.<sup>87</sup>, 1998; Velano et al.<sup>146</sup>, 2001). Estas propriedades antimicrobianas são utilizadas no tratamento de várias enfermidades, sendo bastante efetivas na eliminação de bactérias, fungos e vírus em lesões infectadas (Rodriguez et al.<sup>106</sup>, 1994).

Durante a primeira guerra mundial foi utilizado de forma empírica para tratamento de feridas infectadas e gangrenas. Seu efeito antimicrobiano é que estimulou as pesquisas. Hans Wolff foi o primeiro a reportar a possibilidade de expor o sangue a uma mistura de oxigênio e ozônio, criando a técnica da autohemoterapia. Junto com Joachim Hänsler fundaram em 1972 a Sociedade Médica do Ozônio, com o principal objetivo de motivar pesquisas voltadas a esse assunto, tornando a terapia com ozônio mais aceita (Bocci<sup>12</sup>, 1996).

A ozonioterapia é a técnica que emprega ozônio como agente terapêutico. Atualmente são descritas nas: osteomielites, abscessos, úlceras de decúbito, pé diabético, queimaduras, doenças isquêmicas, degeneração macular relacionada com a idade (forma atrófica), problemas ortopédicos, fibromialgias, tratamento de cáries dentárias, osteonecrose da mandíbula, infecções agudas e

crônicas da cavidade oral, hepatites, herpesvírus, papilomavírus, herpeszoster, onicomicose, criptosporidiose, fadiga em pacientes com câncer, doenças auto-imunes (artrites reumatóides, doença de Crohn, psoríases, esclerose múltipla), doença pulmonar, síndrome do estresse respiratório agudo, metástases, sepses e disfunção de vários órgãos (Bocci<sup>11</sup>, 2005).

Para a utilização do ozônio, sua produção é realizada por meio de geradores médicos pela descarga corona. Onde ocorre uma descarga elétrica pela diferença de potencial de dois eletrodos em um fluxo gasoso de oxigênio medicinal. O campo elétrico fornece energia suficiente aos elétrons para que ocorra o rompimento das duplas ligações da molécula de oxigênio ( $O_2$ ), gerando dois átomos isolados. Esses átomos de oxigênio reagem com outra molécula de  $O_2$  formando o  $O_3$  (Lapolli et al.<sup>62</sup>, 2003).

A concentração do ozônio vai depender da composição do gás empregado na produção ( $O_2$  ou ar), frequência, fluxo de distribuição do sistema e voltagem aplicada nos eletrodos. Velano<sup>146</sup> (2001) e Hass, Kayamak<sup>46</sup> (2003) relatavam que a ação antimicrobiana do ozônio depende da relação sobrevivência do microrganismo  $X$  tempo de exposição, intimamente associado à concentração inicial de microrganismos e a concentração do ozônio; e também da velocidade de dissipação de um microrganismo em relação ao outro exposto à água ozonizada (Baysan et al.<sup>8</sup>, 2000).

Devido a sua alta instabilidade e toxicidade, a vida média do ozônio é de 30 – 45 minutos a 20°C (68°F), descendendo sua concentração aos 16% de seu valor inicial em duas horas; o gás ozônio deve ser incorporado a fluidos, tais como o sangue, água, soluções isotônicas e veículos oleosos, para ser utilizado. O ozônio dissolvido em água é ainda instável e a sua permanência nesta está ligado à pureza da água. Deduz-se então que o efeito da água é imediato. O óleo ozonizado, obtido através da reação com ácidos graxos insaturados, é rico em ozonídeos. Estes, por sua vez, liberam oxigênio ativo lentamente conferindo ao óleo ozonizado um efeito prolongado (Cruz<sup>21</sup>, 2006).

O ozônio, quando misturado ao azeite de oliva ou girassol, possui características antimicrobianas, ativação da oxigenação dos tecidos, auxilia na regeneração tecidual e propriedades cicatrizantes. O mecanismo de ação ocorre através de triozonídeos, que são subprodutos do óleo ozonizado, que posteriormente gera peróxido de hidrogênio e produtos da peroxidação lipídica. Com a capacidade de

armazenamento de até dois anos quando mantido refrigerado. Demora de uma hora até dois dias para atingir a concentração desejada, quando na temperatura ambiente. Um grama de óleo pode absorver até 160 miligramas de ozônio (Bocci<sup>11</sup>, 1996).

O efeito antimicrobiano do ozônio na odontologia, ainda é pouco difundido, mas tem atraído alguns pesquisadores interessados em estudos neste campo.

Estudos em periodontia constataram o efeito da água ozonizada sobre o biofilme dentário supragengival. Garduño et al.<sup>37</sup> (1995), estudaram os efeitos de bochechos da água ozonizada, na redução de *S. mutans* do biofilme dentário. Os resultados indicaram que os efeitos dos bochechos com a água ozonizada reduziram *S. mutans* do biofilme dentário, sendo que quanto maior o tempo de exposição, maior redução bacteriana. Na mesma linha, Barros e Fiorin<sup>5</sup> (2000), compararam o efeito da clorexidina com a água ozonizada sobre *S. viridans*, (bactéria prevalente no biofilme dental supragengival da placa bacteriana) de 30 indivíduos. Estes foram instruídos a suspenderem higiene oral por 24 horas, quando então foi realizada a primeira coleta da placa supragengival para posterior diluição, plaqueamento e incubação em estufa de cultura por 48 horas para contagem de unidades formadoras de colônia. Após este procedimento, foram divididos em 2 grupos: 15 recebiam bochechos de 25 ml de gluconato de clorexidina 0,12% e os outros 15 recebiam bochechos por 10 segundos de água ozonizada numa concentração de 4,5 mg/L, e foi realizada uma segunda coleta da placa supragengival. Os resultados indicaram que com o bochecho de clorexidina houve uma redução significativa na contagem de unidades formadoras de colônias na ordem de 56% e com a água ozonizada houve uma redução de 4,2% não sendo considerada significativa. Os autores atribuem que para o que o ozônio pudesse atingir os microrganismos do biofilme dental, deveria ser transferido a água uma maior concentração de ozônio para sua completa eficácia como anti-séptico intrabucal, porém, a dose fisiológica de ozônio para uso oral ainda não foi estabelecida.

Nagayoshi et al.<sup>82</sup> (2004) examinaram o efeito da água ozonizada contra microrganismos orais como *S. mutans*, bactérias periodontopatogênicas (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*), endodontopatogênicas (*P. endodontalis*) e *C. albicans*. Também investigaram o efeito da água ozonizada em biofilmes da placa dentária. Os microrganismos foram ajustados a  $1 \times 10^6$  células/mL, foram individualmente expostos a ação da água ozonizada a uma concentração de 0,5, 2, e 4 mg/mL a um tempo de 10, 30, 60 e 120 segundos. A viabilidade de *Streptococcus* diminuiu 58% com a exposição

de água ozonizada a uma concentração de 0,5 mg/mL por 10 segundos e em concentrações maiores (2 e 4 mg/mL), eliminou completamente os microrganismos. Este resultado foi similar às bactérias periodontopatogênicas e endodontopatogênicas. A viabilidade de *C. albicans* foi dose dependente e houve completa eliminação quando se utilizou água ozonizada a 2 mg/mL por 120 segundos. O tratamento com água ozonizada a 4 mg/mL a 120 segundos reduziu o número de *S. mutans* viáveis no biofilme da placa dentária. Os autores sugerem que com resultados obtidos neste estudo devem promover orientações para futuros experimentos para aplicação do ozônio na placa dentária da superfície dos dentes ou próteses.

Em dentística restauradora, Baysan et al.<sup>8</sup> (2000), avaliaram os efeitos antimicrobianos da água ozonizada sobre lesões primárias de cárie radicular, frente *S. mutans* e *S. sobrinus*, por dez e vinte segundos; e no segundo estudo avaliaram os efeitos antimicrobianos do ozônio sobre a saliva, frente os mesmos microrganismos por somente dez segundos. Foi encontrada significativa redução de *S. mutans* e *S. sobrinus* das amostras das lesões primárias de cárie radicular, em dez e vinte segundos de tratamento pela água ozonizada, em comparação às amostras do grupo controle. A aplicação do ozônio pelo período de dez segundos na saliva humana, também resultou na redução dos microrganismos testados.

Polydorou et al.<sup>100</sup> (2006) avaliaram o efeito antimicrobiano do ozônio, produzido pelo aparelho Healzone (Kavo - concentração de 2100 p.p.m. de ozônio a um fluxo de 615 cc/min) sobre o *S. mutans* e compararam com a atividade antimicrobiana já estabelecida de dois adesivos dentinários (Clearfil SE Bond e Clearfil Protect Bond). Trinta e cinco terceiros molares humanos foram divididos em 5 grupos, dos quais foram removidos as coroas e a porção radicular, e realizados 4 cavidades em cada dente. Em seguida, foram esterilizados, e deixados em culturas com 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônias de *S. mutans* a 36°C por 48 horas. Então os dentes receberam o tratamento nas cavidades de acordo com o grupo: grupo A – não recebeu tratamento (controle); grupo B – Clearfil SE Bond; grupo C- Clearfil Protect Bond; grupo D- aplicação de 40 segundos de ozônio; Grupo E- aplicação de 80 segundos de ozônio. Estas cavidades foram vedadas com resina composta e após 72 horas foram removidas e com auxílio de um escavador foram coletadas amostras de dentinas para contagem das unidades formadoras de colônias. Todos os tratamentos reduziram significativamente os microrganismos quando comparados com o grupo controle; mas o efeito dos dois

adesivos dentinários e aplicação de ozônio por 80 segundos mostraram resultados melhores quando comparados com a aplicação de ozônio por 40 segundos.

Baysan, Beighton<sup>7</sup> (2007) avaliaram o efeito da aplicação de 40 segundos do gás ozônio produzido pelo aparelho Healzone (Kavo) em 53 molares com lesões de cáries na superfície oclusal, porém sem cavitação e compararam com um grupo de 49 molares, nas mesmas condições, na qual foi aplicado somente ar atmosférico. Não houve diferença significativa entre o número de bactérias que receberam tratamento com ozônio e o grupo que recebeu apenas ar. Quando a dentina foi exposta, houve apenas uma pequena redução na contagem de bactérias do grupo que recebeu tratamento com ozônio, porém não significativa.

Dähnhardt et al.<sup>23</sup> (2008) realizaram tratamento para hipersensibilidade cervical com aplicação de 60 segundos de gás ozônio sobre a superfície dentária de 31 indivíduos. O total de dentes analisados foi de 62 dentes, dos quais metade recebia o tratamento e eram categorizados como dentes teste, e a outra metade não recebia o ozônio, e eram categorizados como grupo controle. O período de tempo avaliado foi de 2, 6, 14, 22, 30, 38, 46, e 54 semanas. Os indivíduos foram instruídos a relatar o nível de dor na escala visual analógica, sendo zero como nenhuma dor e 10 como dor insuportável. Houve redução significativa do nível de dor do grupo teste após a aplicação do ozônio, porém quando comparado com o grupo controle não houve diferença estatisticamente significativa em todo período de tempo analisado.

Morgan et al.<sup>80</sup> (2009) realizaram um estudo que teve por objetivo avaliar a eficácia antimicrobiana dos óleos de copaíba e de girassol ozonizados sobre o *S. mutans* em amostras de dentes bovinos. Quarenta blocos de esmalte/dentina de incisivos foram preparados e imersos em tubos de ensaio contendo caldo BHI contaminado com *S. mutans* em uma concentração inicial de 10<sup>9</sup> UFC/ml. Durante cinco dias, foram realizadas trocas diárias do caldo BHI de forma a produzir um biofilme sobre os espécimes. Após a formação do biofilme, os blocos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (n=10) de acordo com as terapias antimicrobianas a serem avaliadas: G1- óleo de copaíba ozonizado (1000 ppm); G2- óleo de girassol ozonizado (1000 ppm); G3- solução de hipoclorito a 5% (controle positivo); e G4- água destilada estéril (controle negativo). As amostras foram imersas uma a uma em eppendorfs contendo 0,5 ml de cada agente antimicrobiano, vortexadas por 20 segundos e deixadas em repouso por mais 40 segundos, totalizando 60 segundos de contato com cada agente antimicrobiano. Todo o experimento foi realizado em ambiente asséptico em câmara de

fluxo laminar. Diluições seriadas até  $10^3$ UFC (unidades formadoras de colônia) foram realizadas e alíquotas de 50µl foram plaqueadas em triplicata em Agar mitis salivarius. Após incubação em microaerofilia em estufa a 37°C por 48h, o número de unidades formadoras de colônias foi obtido por contagem visual. O Grupo 2 (óleo de girassol ozonizado) mostrou capacidade de eliminação total no número de microrganismos viáveis (100%) e o grupo 1 (óleo de copaíba ozonizado) reduziu em 99,3% o número de UFCs viáveis quando comparados ao grupo controle (G4), onde o número de colônias foi considerado incontável. No Grupo 3 (hipoclorito de sódio a 5%, controle negativo), não houve crescimento bacteriano. Estes resultados indicam que os óleos de copaíba e de girassol ozonizados foram efetivos na redução do *S. mutans* nas condições utilizadas no experimento, sugerindo uma possível aplicação destes materiais no tratamento clínico de lesões de cárie.

Em estomatolgia, Rodriguez et al.<sup>106</sup> (1994) avaliaram o emprego do óleo de girassol ozonizado no tratamento da gengivoestomatite herpética aguda em crianças. Como tratamento das lesões, foi empregado o óleo de girassol ozonizado embebido em gaze, utilizada na assepsia das lesões, quatro vezes ao dia. O período de reparação foi bastante reduzido; em três dias de tratamento obteve-se 76,9% de cura, das 113 crianças. Como conclusão, comprovou-se a efetividade do ozônio no tratamento das lesões com 100% de cura dos casos, não sendo observadas reações adversas do medicamento.

Sechi et al.<sup>109</sup> (2001) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo de girassol ozonizado (Oleozone) em diferentes espécies bacterianas (*Mycobactéria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* e *E. coli*), isoladas de diferentes sítios. O Oleozon é produzido pelo Centro de Investigações do Ozônio em Havana, Cuba através de um gerador de ozônio. Segundo os fabricantes, o efeito bactericida deste óleo é estável em até 1 ano em temperaturas entre -10 e 8 °C, e estável por 6 meses em temperaturas entre 27-30°C, assim como o pH torna-se estável durante estes períodos. Neste trabalho, foi determinada uma concentração inibitória mínima do óleo para inativar as diferentes espécies bacterianas. Os resultados mostraram que o oleozon possui um valioso efeito antimicrobiano sobre todas as espécies bacterianas testadas, sendo a *Mycobactéria* mais sensível. As concentrações inibitórias mínimas variaram de 1.18 a 9.5 mg/ml de oleozon para inativar as bactérias. Os autores sugeriram que se deve conduzir a uma criação de pesquisas clínicas para

comparar o oleozon com outros agentes antimicrobianos, visto a baixa toxicidade deste produto.

Faria et al.<sup>36</sup> (2005) avaliaram o efeito da água ozonizada sobre culturas de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal. Foram coletados 2 mL de saliva de 108 indivíduos com idade entre 18 e 25 anos da qual foram plaqueadas e incubadas por a 37°C por 48 horas. Após este período foi confirmada as culturas de *Candida albicans* através de um microscópio, das quais 49 foram incluídas no estudo. A cepa padrão ATCC 18804 de *C. albicans* também foi testada para comparação. Foram preparadas suspensões na concentração de  $5 \times 10^8$  células/mL, que foram submetidas à água ozonizada a uma concentração de 3,3 mg/L de ozônio, pelos tempos de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 300 segundos. Após estes intervalos de tempo foram contadas as unidades formadoras de colônia. Os resultados mostraram que o completo efeito fungicida para as cepas padrão foi obtido somente depois de 300 segundos, porém não foi efetiva para a total inativação da *C. albicans* isoladas da cavidade bucal, o que sugerem que estas cepas são mais resistentes a ação do ozônio.

Em cirurgia, Guerra et al.<sup>43</sup> (1997) comparou o efeito do oleozon (óleo de girassol ozonizado, usado em Cuba) e da pasta alvogil utilizados no tratamento para alveolite. Foram utilizados 50 pacientes que receberam a terapia com oleozon e 50 pacientes que receberam a terapia com alvogil e antibiótico sistêmico. Antes de cada tratamento, todos os alvéolos foram irrigados com solução salina para remover restos de coágulos necróticos ou conteúdo inadequado do alvéolo. Após 72 horas foi avaliado novamente o estado a qual o critério de evolução satisfatória foi ausência de dor e formação de tecido de cicatrização. Ambos os grupos evoluíram de forma similar, porém foi visto que os pacientes que utilizaram o oleozon curaram mais rapidamente porque não necessitaram antibiótico por via oral. Este trabalho demonstrou que o oleozon pode ser usado como um medicamento efetivo no tratamento da alveolite, devido as suas propriedades germicidas, assim como poder de oxigenação aos tecidos que estimula a regeneração tecidual.

Em prótese dentária, Murakami et al.<sup>81</sup> (1996) avaliaram o poder de desinfecção do ozônio sobre *C. albicans*, cuja prevalência do acúmulo desta em formas de placa em superfícies de próteses removíveis é alta. A remoção desta placa se faz importante, porque tem sido relacionada como causa de estomatites e odores desagradáveis. Para tanto, culturas de *C. albicans* foram preparadas e contadas as unidades formadoras de colônias. Em seguida, estas amostras foram derramadas

dentro de um reservatório de dois aparelhos geradores de ozônio (gerador 1 e gerador 2), cuja concentração era de 10 ppm, que receberam ozônio por um período de 30 e 60 minutos; e compararam com um grupo de cultura de *C. albicans* que recebia apenas ar por 60 minutos. Os resultados demonstraram que tanto no gerador 1 quanto no gerador 2 houve declínio de 1/10 depois de 30 minutos e de 1/1000 após 60 minutos, porém não eliminou por completo as colônias. No grupo que recebeu apenas ar, o declínio foi apenas 13%. Concluíram que há possibilidade da utilização do ozônio para limpeza e desinfecção de próteses.

Em outro estudo, Oizumi et al.<sup>87</sup> (1998) compararam o efeito microbicida do gás ozônio com a água ozonizada para determinar se são métodos eficazes para desinfecção de próteses. Foram utilizadas culturas de *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*, das quais são as que mais aderem as próteses e são responsáveis pela maioria das infecções orais. Estas foram aplicadas sobre a superfície da prótese. O gás ozônio produzido pelo gerador (20g/h) foi aplicado diretamente sobre esta superfície e os microrganismos foram coletados depois de 1 e 3 minutos e em seguida o número de células foi determinado. Foram preparados 1mL a 1 ppm e 3 ppm de água ozonizada e colocadas em tubos de polietileno esterilizados e adicionados a mesma quantidade de suspensões microbianas, em seguida o número de células foi contado após 30 segundos, um, cinco, dez, vinte e trinta minutos. Os resultados mostraram que em ambos os mecanismos, houve declínio de bactérias; para a aplicação de gás ozônio este declínio foi de 1/10<sup>5</sup> após 1 minuto e após 3 minutos foram inferiores do limite de detecção; para a água ozonizada a 1ppm e 3 ppm o declino de *C. albicans* foi de 1/10, o de *S. mutans* foi de 1/10<sup>3</sup> e para *S. aureus* foi de 1/10<sup>2</sup>, sendo que nenhuma mudança no número de células foi observada após este período. A aplicação do gás ozônio diretamente na superfície da prótese foi mais efetiva, mostrando que o efeito bactericida do ozônio depende do número de moléculas de deste em contato com a bactéria.

Arita et al.<sup>3</sup> (2005) avaliaram *in vitro* a eficácia antimicrobiana da água ozonizada contra *C. albicans* em superfícies de resinas para dentaduras. Placas de resina acrílica foram cultivadas por 120 minutos com *C. albicans*. Estas placas foram mantidas durante 1 minuto em 150 mL de água ozonizada a uma concentração de 0,5; 2 e 4 mg/mL por 1, 5, 10, 30 e 60 minutos. A viabilidade de *C. albicans* foi tempo-dependente, ou seja, houve uma diminuição de unidades formadoras de colônias quando as placas ficaram imersas na água ozonizada numa concentração de 4 mg/mL por um tempo de 30 minutos de ozonização.

Em endodontia, a maioria dos estudos concentram-se no ozônio como agente irrigante e como medicação intracanal.

Siqueira Junior et al.<sup>121</sup>. (2000), avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo ozonizado frente a bactérias comumente envolvidas na etiopatogenia das doenças perirradiculares. Foi comparado o efeito do óleo ozonizado às pastas de hidróxido de cálcio associados à glicerina, ao hidróxido de cálcio associado ao tricresol formalina/glicerina e ao hidróxido de cálcio associado ao paramonoclorofenol/glicerina, sendo estas pastas empregadas como medicações intracanal em tratamentos endodônticos. A eficiência do óleo ozonizado, em comparação a outras pastas utilizadas, foi observada através do halo de inibição de crescimento bacteriano em placas de Petri. Os maiores halos de inibição foram observados para o óleo ozonizado. Os autores ressaltaram ainda que pasta de hidróxido de cálcio em glicerina apresentou ausência de efeito inibitório sobre todas as cepas bacterianas testadas, concluindo que pasta de hidróxido de cálcio em veículos inertes (água destilada, soro fisiológico, glicerina), foi ineficaz em inibir o crescimento de várias espécies bacterianas anaeróbias estritas e facultativas.

Velano et al.<sup>146</sup> (2001) pesquisaram *in vitro* a atividade antimicrobiana da água ozonizada sobre *S. aureus*, utilizando concentrações variando de  $10^6$  a  $10^{16}$  microrganismos/mL. Para tanto, realizaram dois grupos de experimentos; grupo 1, utilizando água destilada previamente ozonizada a uma concentração inicial de 0,6 mg/mL por 20 minutos e grupo 2, água destilada sem prévia ozonização. No grupo 1, a água ozonizada foi adicionada a suspensão de *S. aureus* onde mantiveram o fluxo de ozônio constante até o término do experimento. Foram coletadas amostras com intervalos de tempo variados para determinar o tempo de morte de 99% das bactérias. No grupo 2, o mesmo procedimento foi realizado, só que foi utilizada água destilada sem ozonização prévia e então acionado o gerador para produção do ozônio. Os resultados obtidos mostram que no grupo 1, a inativação bacteriana total foi conseguida com o tempo variando entre 4 segundos e 5 minutos e 25 segundos e no grupo 2, a inativação ocorreu no intervalo de 1 minuto e 31 segundos a 23 minutos e 45 segundos. A partir dos dados obtidos, os autores sugeriram que é possível que a água ozonizada após um período de 30 minutos de prévia ozonização com concentração inicial de 0,6 mg/mL seria um excelente padrão para eliminar os microrganismos estudados.

Silveira et al.<sup>113</sup> (2007) avaliaram radiográfica, histológica e histobacteriologicamente o efeito da medicação intracanal com o óleo ozonizado

(Soluzione O<sub>3</sub> a 99%, Fomblim 1% - Comoproject- Parma/ Itália) ou com a pasta de hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado e glicerina (HPG) no tratamento endodôntico de dentes despulpados com lesão perirradicular associada. Foram utilizados 84 canais radiculares de pré-molares e incisivos inferiores de 6 cães. Para a indução das lesões perirradiculares, a polpa foi removida e o canal inoculado com *E. faecalis*, sendo os dentes em seguida selados coronariamente com resina composta fotopolimerizável por 90 dias. Decorrido este período foi realizado exame radiográfico e, uma vez constatado o desenvolvimento de lesão perirradicular, procedeu-se o tratamento endodôntico. Os dentes submetidos ao tratamento endodôntico foram divididos em 3 grupos experimentais: tratamento endodôntico em sessão única; tratamento em 2 sessões com medicação com HPG e tratamento em 2 sessões com medicação intracanal com óleo ozonizado. Como controles positivos foram utilizados os seguintes grupos: instrumentação sem obturação e dentes com infecção sem realizar tratamento; e como controle negativo, dentes com polpa viva tratados em sessão única. Após o término do preparo químico-mecânico e decorridos 7 dias de medicação intracanal com o óleo ozonizado ou com a pasta HPG, os canais foram obturados e as cavidades coronárias seladas com resina composta fotopolimerizável. Decorridos 180 dias após a obturação, os dentes foram radiografados e os animais sacrificados por sobredose anestésica. As peças foram preparadas, fixadas em formalina a 10 por cento e posteriormente desmineralizadas em EDTA. Após o processamento histológico de rotina, os cortes com 5 µm de espessura foram corados por H. E. ou por Brown e Brenn. Tanto a análise radiográfica quanto a histológica e a histobacteriológica demonstraram que não houve diferença significativa na resposta tecidual perirradicular aos dois medicamentos utilizados. Os resultados então sugerem que o óleo ozonizado tem o potencial de ser utilizado na endodontia como medicamento intracanal.

Nagayoshi et al.<sup>83</sup> (2004) avaliaram in vitro o efeito da água ozonizada como agente irrigante em túbulos dentinários infectados por *E. faecalis* e *S. mutans* em dentes bovinos. A parte coronária foi seccionada, e a parte radicular foi cortada em blocos de 4 mm, que foram colocados em meio de cultura contendo *E. faecalis* e *S. mutans*. Posteriormente, os blocos foram divididos e irrigados por 10 minutos com 4mg/L de água ozonizada, 4mg/L de água ozonizada com ultrassom, água destilada, 1 espécime não foi irrigado (controle positivo) e 1 espécime foi irrigado por 2 minutos com hipoclorito de sódio 2,5% (controle negativo). Após irrigação dos agentes, raspas de dentina foram coletadas com uso de uma broca e colocadas em meio de cultura,

diluídas em solução salina, plaqueadas e cultivadas em estufa 37°C por 24 horas e contadas as unidades formadoras de colônia. Verificaram que a viabilidade do *E. faecalis* e *S. mutans* diminuiu com todos os agentes irrigantes e diminuiu significativamente quando irrigados com ozônio, especialmente quando utilizaram o ultrassom, cujo resultados foram similares aos tratados com NaOCl 2,5%. Sugeriram então, que a água ozonizada pode ser empregada como agente irrigante durante a terapia endodôntica. Este trabalho também avaliou o efeito citotóxico do ozônio sobre fibroblastos de ratos, o qual mostrou baixa toxicidade.

Hems et al.<sup>49</sup> (2005) avaliaram in vitro a habilidade do ozônio em eliminar uma cepa de *E. faecalis*. Para o experimento, utilizou ar ozonizado, água ozonizada cuja concentração máxima foi determinada através de um espectrofotômetro, e ar atmosférico (controle negativo), que foram borrifadas sobre culturas de *E. faecalis* em vários períodos de tempo (30, 60, 120 e 240 segundos). As unidades formadoras de colônia foram contadas antes e depois da aplicação do ozônio. Compararam os dados obtidos com o efeito bactericida do hipoclorito de sódio a 0,05% (controle positivo). Houve redução no número de células bacterianas em torno de 1-2 log<sub>10</sub> em todos os períodos de tempo, mas redução significativa foi detectada no tempo de 240 segundos, tanto para a aplicação do ar ozonizado quanto da água ozonizada. Não houve redução bacteriana quando o ar atmosférico foi aplicado nas culturas. O efeito bactericida do hipoclorito de sódio 0,5% usados como controle positivos foram comparados com o efeito do ozônio. Embora concentrações de 0,5-5% de NaOCl são comumente usados para limpeza químico mecânica de canais radiculares, uma concentração mais baixa foi usada (0,05%), baseado em outros estudos, de que seria uma concentração eficaz mínima usada contra *E. faecalis*. Os autores concluíram que foi impossível uma comparação direta entre ozônio e NaOCl porque a concentração do ozônio muda constantemente durante o borrifamento contínuo.

Em 2006, Cruz<sup>21</sup> avaliou in vitro a associação do efeito antimicrobiano do ozônio a veículos como óleo de oliva, óleo de girassol, Calen PMCC<sup>®</sup> (Hidróxido de cálcio com paramonoclorofenolcanforado) e propilenoglicol, quando foram semeadas as bactérias *E. faecalis* em placas de petri com ágar, analisando halos de inibição formados em cinco períodos diferentes de tempo de armazenagem. Concluiu que o Calen<sup>®</sup> PMCC não tem boa associação com o ozônio e o propilenoglicol tem melhor capacidade de associação, boa estabilidade de tempo, mantendo atividade antimicrobiana por maior período.

Estrela et al.<sup>30</sup> (2006) avaliaram a capacidade do ozônio associado a três diferentes soluções usadas em um sistema de limpeza ultra-sônica em inativar *S. aureus*. Cento e vinte mL de suspensão de *S. aureus* foram misturadas em 6 L das soluções experimentais (água destilada esterilizada, vinagre de maçã e água destilada esterilizada + Endozime AWplus) utilizadas no sistema de limpeza ultra-sônica. O ozônio foi produzido por descarga elétrica através de uma corrente de oxigênio com valor de 7g/h de ozônio (1,2%) dentro das suspensões microbianas. Um total de 10 mL de cada solução experimental foram coletados e realizadas cinco diluições em 9 mL de BHI e incubadas a 37°C por 48 h. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez do meio de cultura. Ao mesmo tempo, 1 mL das amostras bacterianas foram coletadas e inoculadas em placas contendo BHIA. Após o período de incubação a 37°C por 48 horas, realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônias (ufc/ mL). No teste de diluição em tubos com BHI e placas com BHIA(ufc/mL), quando o ozônio foi empregado, o crescimento bacteriano não foi observado em nenhuma das soluções experimentais. Nas condições deste estudo, a aplicação do ozônio nas soluções experimentais presentes no sistema de limpeza ultra-sônica mostrou atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*.

Huth et al.<sup>52</sup> (2006) investigaram se o ozônio na forma gasosa e aquosa exercem algum efeito citotóxico nas células epiteliais orais humanas e de fibroblastos gengivais e compararam com agentes anti-sépticos já estabelecidos: clorexidina 2% e 0,2%, hipoclorito de sódio 5,25% e 2,25% e peróxido de hidrogênio 3%. Todos os agentes foram deixados por um período de 1 minuto de contato com as células. Foram avaliados a contagem de células, atividade metabólica, nível de actina e apoptose. O gás ozônio foi utilizado na concentração entre 0,2 e 53 X10<sup>6</sup>µg/mL e a água ozonizada entre 1,25 e 20X10<sup>6</sup>µg/mL. Os resultados mostraram que o ozônio na forma de gás produziu efeitos tóxicos em ambos os tipos celulares. Nenhum efeito tóxico foi observado para o ozônio na forma aquosa. A clorexidina (2% e 0,2%) foi altamente tóxica para células epiteliais e pouco tóxica para os fibroblastos. O hipoclorito de sódio e a água oxigenada mostraram redução da viabilidade celular em ambos os tipos de células. Sendo assim, o ozônio na forma aquosa demonstrou uma alta biocompatibilidade em relação aos demais agentes anti-sépticos, tornando-o útil na desinfecção endodôntica, tratamento periodontal e enxaguatórios para prevenção de cáries.

Estrela et al.<sup>29</sup> (2007) avaliaram a eficácia antimicrobiana da água ozonizada, gás ozônio, hipoclorito de sódio e clorexidina em canais humanos infectados com *E. faecalis*. Utilizaram 30 dentes anteriores superiores que foram preparados até o diâmetro de uma lima K 50 e inoculados com *E. faecalis* ajustadas com a escala 1 de Mac Farland ( $3 \times 10^8$  células/mL) por 60 dias. Em seguida, a porção coronária dos espécimes foi conectada em tubos de eppendorf, no qual mangueiras de uretano foram acopladas com uma bomba peristáltica. Os canais foram divididos em grupos de acordo com a solução irrigante: grupo I- água ozonizada (preparada pelo borbulhamento de ozônio numa taxa de fluxo de 7 g/hora, em 1 litro de água destilada); grupo II - gás ozônio (taxa de fluxo de 7g/hora); grupo III – hipoclorito de sódio 2,5%; grupo IV- solução de digluconato de clorexidina 2%; grupo V –controle positivo e grupo VI – controle negativo. Os agentes irrigantes circularam num fluxo constante de 50 mL/min durante 20 minutos. A seguir foram coletadas amostras através da introdução de cones de papel absorventes no interior dos canais e imersos em caldo LB para incubação a 37°C por 48 horas, em triplicata. Após este período foram transferidas 0,1 mL de caldo LB para 7 mL de BHI e incubados a 37°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi analisado pela turbidez do meio. Concluíram que nenhum agente irrigante usado por 20 minutos foi suficiente para inativar o *E. faecalis*.

Cardoso et al.<sup>15</sup> (2007) avaliaram in vitro o efeito da água ozonizada a concentração de 24mg/L produzida por 20 minutos em 24 canais contaminados com *E. faecalis* e 24 canais com *C. albicans*. Foi preparado uma suspensão destes microrganismos a uma concentração de  $1,3 \times 10^8$  células/mL e foram adicionados 20 µL desta a canais esterilizados e instrumentados previamente até o diâmetro de uma lima K no 35. Foram incubados a 37°C por 21 dias e a cada três dias foi adicionado meio de cultura TSB (Tryptic soy broth). Após este período, um cone de papel foi colocado no interior dos canais radiculares, deixados por 1 minuto e transferidos para tubos de eppendorf contendo 1 mL de solução fisiológica esterilizadas. Alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas e contadas as unidades formadoras de colônias após 48 horas de incubação a 37° C. Os canais foram instrumentados novamente até o diâmetro de uma lima K 80, o qual se utilizou para irrigação a água ozonizada ou solução fisiológica esterilizada. Os dentes foram incubados por 7 dias a 37° C e após este tempo foi verificado as unidades formadoras de colônias. Os resultados obtidos foram que a água ozonizada reduziu significativamente o número de unidades formadoras de colônias

tanto para *C. albicans* quanto para o *E. faecalis*, porém, após os 7 dias o número de microrganismos voltou a crescer, mostrando que o ozônio não possui efeito residual.

Huth et al.<sup>53</sup> (2009) avaliaram a eficácia antimicrobiana do ozônio gasoso e aquoso como uma alternativa anti-séptica contra *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. micros* e *P. aeruginosa* em suspensão e como modelo de biofilme em canais radiculares e compararam com o hipoclorito de sódio, clorexidina e peróxido de hidrogênio. Para avaliação do efeito do ozônio na suspensão, os microrganismos foram preparados na escala 1 de Mac Farland, que foram plaqueados e expostos ao ozônio e ao ar ambiente por 1 minuto. Depois, foram incubados e determinadas as unidades formadoras de colônias. Os resultados mostraram que o ozônio aquoso eliminou completamente o *E. faecalis* e *C. albicans* quando usados na concentração de no mínimo 5 µg/mL. No caso da *P. micros* a concentração necessária para a completa eliminação foi no mínimo 2.5 µg/mL. O NaOCl e a CHX eliminaram totalmente os microrganismos testados, porém o peróxido de hidrogênio não foi tão efetivo. A concentração mínima do gás ozônio para eliminar completamente os microrganismos testados foi 1 g/m<sup>3</sup> aplicados por 1 minuto. Para avaliação do ozônio sobre biofilme, foram preparadas culturas únicas destes microrganismos durante 3 semanas dentro de canais radiculares de dentes permanentes extraídos e acoplados com uma bomba peristáltica com saliva artificial suplementada com sacarose num fluxo de 720 mL/dia em condições aeróbicas. Os canais foram então cortados na horizontal e expostos ao ozônio gasoso e aquoso em diferentes concentrações e tempo; e comparados com os irrigantes endodônticos. Os resultados mostraram que a aplicação do ozônio aquoso, numa concentração maior que 20 µg/mL, durante 1 minuto, reduziram 96% do biofilme dos microrganismos, similar à clorexidina. O NaOCl eliminou completamente, porém o peróxido de hidrogênio não foi efetivo. Quando aplicado o gás ozônio, este mostrou uma redução dose dependente contra diferentes espécies. A maioria de *E. faecalis* e *C. albicans* foi eliminada por uma alta concentração a 53 g/m<sup>3</sup> e a *P. aeruginosa* por 32 g/m<sup>3</sup> e concluíram que altas concentrações de ozônio gasoso e aquoso foram dose e tempo dependentes contra os microrganismos testados na suspensão e no modelo de biofilme testados.

Noetzel et al.<sup>85</sup> (2009) avaliaram a eficácia do hidróxido de cálcio, laser Er: YAG, e gás ozônio em canais radiculares contaminados com *E. faecalis*. Utilizaram 180 dentes humanos extraídos, com raiz única das quais foram divididos em 4 grupos de 45 dentes cada. No grupo 1, os canais foram alargados até a lima n° 60 e nos grupos de 2 a 4 foram alargadas até a lima n° 40. Depois os dentes foram esterilizados e

inoculados com *E. faecalis* e incubados por 3 dias, seguido pela contagem das unidades formadoras de colônias. Subsequentemente, os canais foram alargados até a lima 60 nos grupos de 2 a 4 e para irrigação foi usado solução salina (0,9%) no grupo 2, hipoclorito de sódio 1% no grupo 3 e clorexidina 0,2% no grupo 4. Finalmente cada grupo de 45 dentes foi subdividido dentro de 3 grupos com 15 dentes cada, da qual foi aplicado hidróxido de cálcio por 7 dias, radiação laser Er: YAG por 30 segundos ou gás ozônio por 120 segundos, seguido pela avaliação final com a contagem das unidades formadoras de colônias. Os resultados mostraram que ambos os grupos 1 e 2 a redução média das bactérias depois da aplicação do hidróxido de cálcio e ozônio foi significativamente maior do que a aplicação do tratamento com laser. A eficácia antibacteriana foi aumentada pelo uso adicional de hipoclorito de sódio e clorexidina como irrigantes em todos os subgrupos (grupos 3 e 4) comparado com o correspondente subgrupo do grupo 1.

Nogales et al.<sup>86</sup> (2008) apresentaram uma revisão de literatura com a finalidade de incorporar a terapia de ozônio dentro da prática odontológica, nas diversas especialidades, como prótese, dentística, periodontia, endodontia e estomatologia. Concluíram que o futuro da terapia com ozônio deve ser focada para o estabelecimento de parâmetros seguros e bem definidos em estudos clínicos controlados e randomizados a fim de determinar a precisa indicação e orientações para tratamento das várias patologias médicas e dentárias; assim como, o estabelecimento do tempo de aplicação do gás ozônio, onde há divergências de opiniões nos diversos estudos relatados

### **3 Proposição**

Este estudo teve como proposta avaliar a atividade antimicrobiana do ozônio em associação ao propilenoglicol e ao hidróxido de cálcio como medicações em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* no período de 7 e o efeito residual após mais 7 dias.

## 4 Material e Método

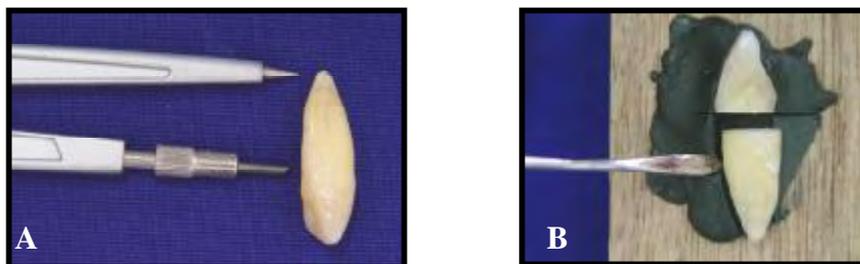
Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, protocolo nº42/08 (Anexo 1).

### 4.1 Seleção dos dentes e preparo biomecânico do canal radicular

Foram utilizados cinquenta dentes humanos unirradiculados extraídos por motivos patológicos ou ortodônticos, doados pelo Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Os elementos dentários foram conservados em hipoclorito de sódio 1% para mantê-los hidratados até o momento do uso. Os restos de tecido periodontal ou ósseo, que porventura estavam aderidos às superfícies radiculares foram removidos por raspagem com curetas periodontais.

Para a padronização da amostra, a seleção dos dentes foi baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz, os quais foram radiografados (Dabi Atlante, São Paulo, Brasil) no sentido mésiodistal, sendo excluídos aqueles que apresentaram mais de um canal radicular, calcificações difusas ou localizadas, reabsorções internas e tratamento endodôntico.

Os dentes tiveram suas coroas seccionadas em uma máquina de corte de alta precisão (BUEHLER Isomet 1000, Illinois, USA), a uma velocidade de 275 r.p.m., de modo que o comprimento final das raízes foi padronizado em torno de  $15 \pm 0,5$  mm (FIGURA 1).



**FIGURA 1** – padronização das raízes: a) Padronização de  $15 \pm 0,5$  mm; b) Remoção da porção coronária.

#### **4.2 Preparo biomecânico das raízes**

Foi estabelecido um instrumento apical inicial com o auxílio de uma lima tipo K (Dentsply-Maillefer®, Ballaigues, Suíça), em média, número 15, de modo que cada canal radicular foi explorado em toda a sua extensão até que a lima fosse detectada no forame apical. Raízes com diâmetro menor que a lima K nº10, ou maior que a lima K nº 20 eram descartadas. A partir da detecção da lima no forame apical, a raiz foi instrumentada até a lima K nº 30, sendo em seguida, recuado um milímetro a fim de determinar o comprimento de trabalho. Deste modo, foi realizado o preparo biomecânico pela técnica clássica, confeccionando-se o batente apical com a lima tipo K nº 50 (Dentsply-Maillefer®, Ballaigues, Suíça). As raízes foram fixadas em uma morsa para que permanecessem imóveis durante toda a confecção do preparo biomecânico.

Para a irrigação, foi utilizado, entre um instrumento e outro, 2 mL de solução hipoclorito de sódio 1% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil), com auxílio de seringa apirogênica de 3 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) com agulha apirogênica 20 X 5,5 mm (BD, PR, Brasil) sendo a irrigação final realizada com 2 mL de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a 17% (Biodinâmica®, Ibiporã, PR, Brasil), permanecendo por três minutos, para a remoção da smear layer, provocada pela ação cortante dos instrumentos. Em seguida, procedeu-se novamente a irrigação com 2 mL de hipoclorito 1% (Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil) a fim de neutralizar o EDTA e secagem do canal com pontas de papel absorvente nº 50 (Tanari®, Amazonas, Brasil) compatível com o diâmetro do canal.

#### **4.3 Vedamento apical e impermeabilização externa das raízes**

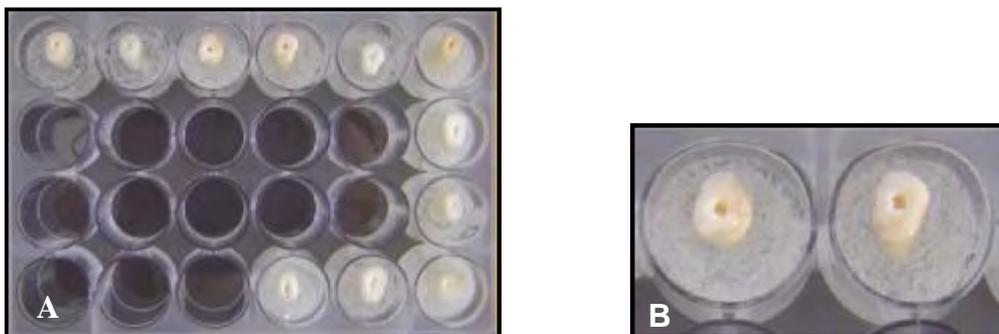
Os forames apicais foram selados com resina composta fotopolimerizável Z100 (3M, Sumaré, SP, Brasil) e as raízes foram impermeabilizadas com duas camadas de adesivo epóxi-araldite (Brascola, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) com auxílio de um pincel, exceto na porção correspondente ao acesso coronário (FIGURA 2).



**FIGURA 2** – Impermeabilização externa das raízes e selamento do ápice.

#### 4.4 Inclusão dos espécimes em placas de polistireno

Todos os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em cinco placas de polistireno de 24 poços (Costar, New York, USA), sendo quatro placas com onze espécimes cada e uma placa com seis espécimes (FIGURA 3). Os espécimes foram fixados nos poços mais externos da placa com resina acrílica quimicamente ativada incolor (Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil), recobrindo aproximadamente 10 mm a partir do ápice.



**FIGURA 3** - Raízes incluídas com resina acrílica na placa de contagem de células: a) distribuição dos 11 espécimes na placa; b) detalhe dos dentes.

As placas foram tampadas e embaladas com papel kraft, e foram esterilizadas por radiação gama cobalto 60 (20 KGy por 6 horas). Esta esterilização foi

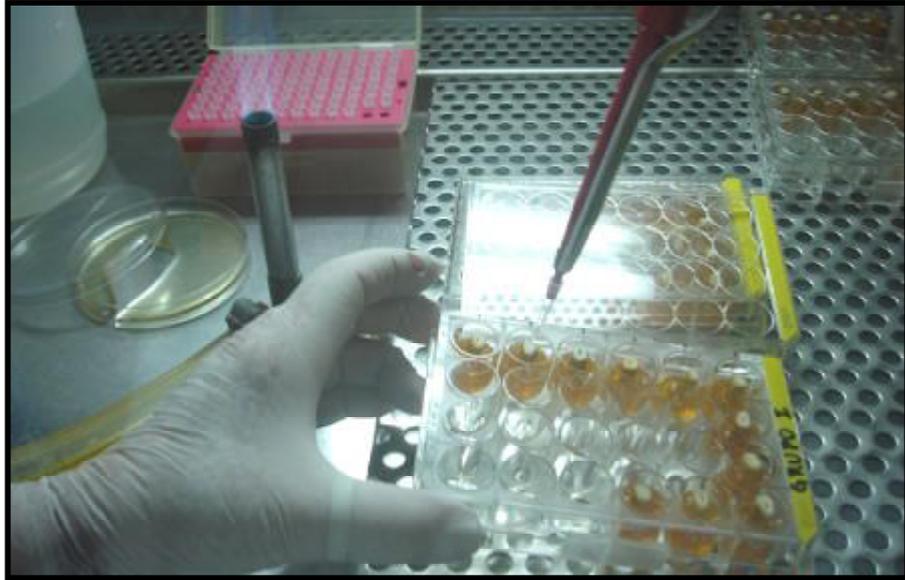
realizada na empresa EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, São Paulo, Brasil).

#### 4.5 Seleção e preparo do inóculo

A bactéria utilizada foi *E. faecalis*, obtido da *American Type Culture Collection* (ATCC 29212) doado pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, campus Araraquara. Foram inoculados 100 µL da bactéria em um tubo de ensaio contendo 1 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA), previamente esterilizado a 121°C por vinte minutos. O tubo contendo a cepa foi incubado a 37°C por vinte e quatro horas e, após esse período sua diluição foi ajustada ao tubo 0,5 da escala de *MaCFarland*, correspondendo a uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  células/mL.

#### 4.6 Contaminação dos dentes

Após o preparo, em câmara de fluxo laminar e com auxílio de uma micropipeta (Gilson – Villiers-le-Bel, França) 10 µL da suspensão microbiana de *E. faecalis*, preparada com culturas de 24 horas ajustadas ao tubo 0,5 da escala de *MaCFarland*, foram inoculados nos dentes previamente esterilizados, juntamente com 10 µL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA), totalizando 20 µL (FIGURA 4). Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida no caldo BHI, e em seis poços do centro das cinco placas, foi colocado chumaços de algodão umedecidos em água destilada esterilizada para manter a umidade das mesmas. As placas foram fechadas, incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 21 dias. Durante este período, foi adicionado após as 24 horas de incubação, e depois a cada 72 horas, meio de cultura BHI (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA), com auxílio de seringa de insulina 1 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil), de modo que preenchessem toda extensão do canal e água destilada esterilizada nos poços que continham os chumaços de algodão com auxílio de micropipeta. Seis dentes não foram contaminados com a bactéria, porém foram colocados meio de cultura BHI (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA), pois foram utilizados como controle negativo.

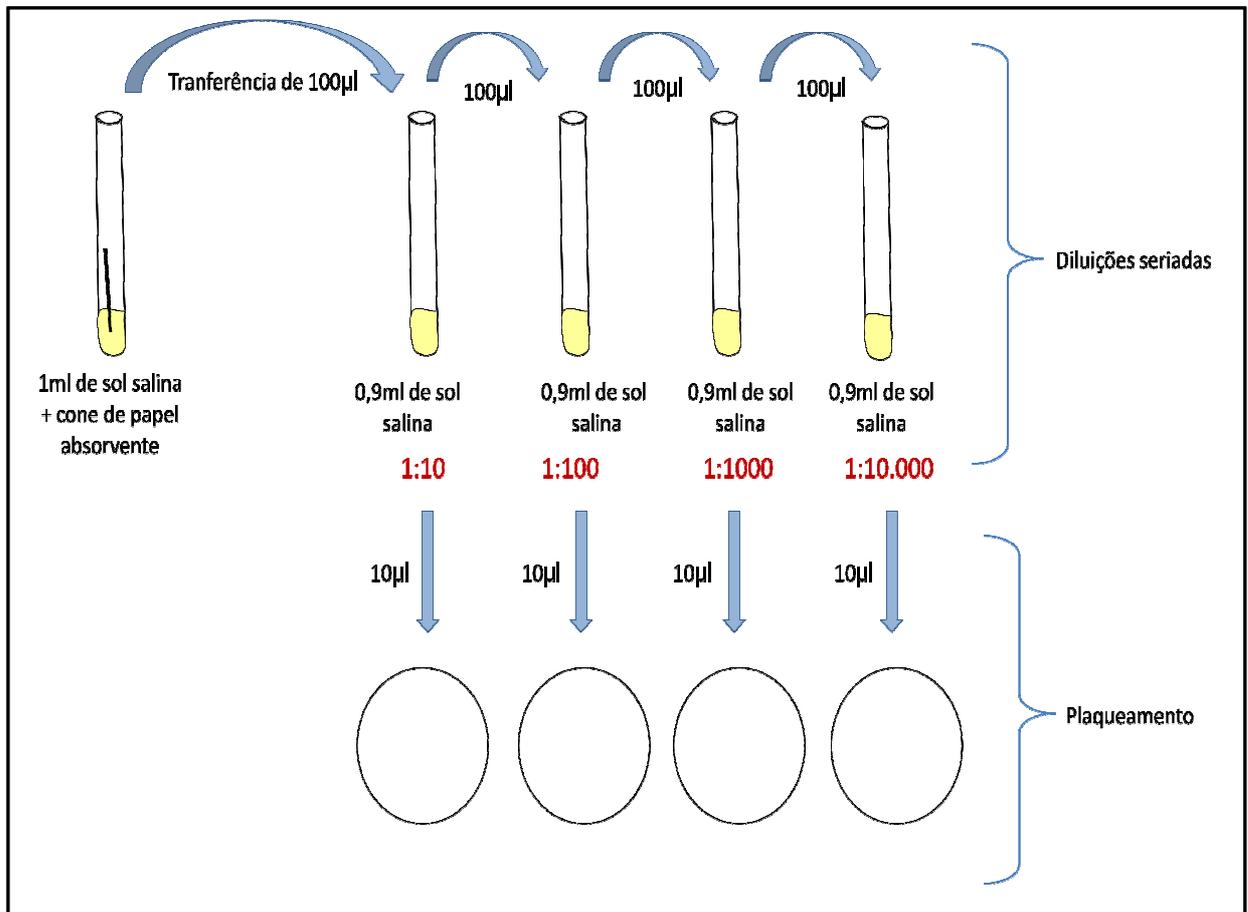


**FIGURA 4** – Inoculação da suspensão microbiana de *E. faecalis* nos dentes previamente esterilizados.

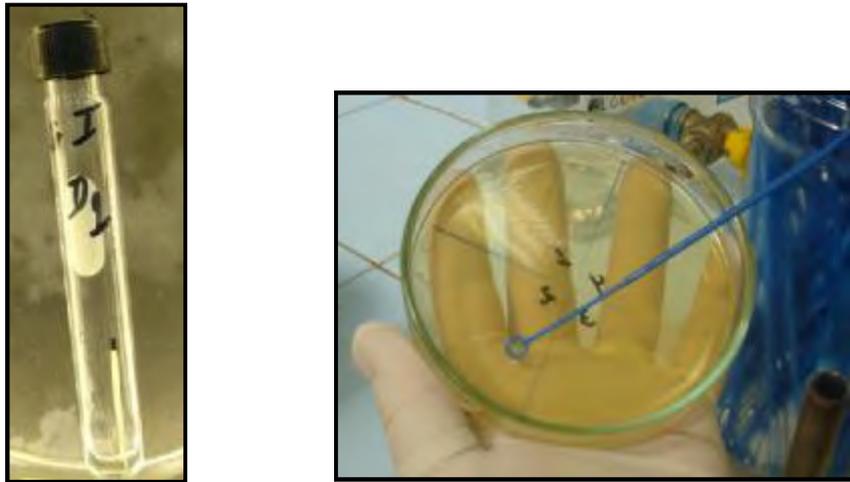
#### **4.7 Coleta de confirmação de contaminação**

A coleta para análise microbiológica para comprovação da contaminação dos dentes foi realizada após 21 dias de contaminação, em todos os dentes, por meio da técnica de semeadura e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Para tanto, foram utilizados para a coleta das amostras, cones de papel esterilizados número quarenta (Tanari®, Amazonas, Brasil), que foram colocados no interior do canal radicular e deixados por um minuto. Os cones foram retirados do canal radicular e colocados no interior de tubos de ensaio contendo 1 mL de solução salina esterilizada e agitados por 1 minuto em agitador de tubos (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) e alíquotas de 100  $\mu$ L foram transferidos para outros quatro tubos de ensaio contendo 0,9 mL de solução salina esterilizada, realizando assim, quatro diluições seriadas (1:1, 1:2, 1:3 e 1:4). Em seguida, com auxílio de uma alça plástica flexível estéril, alíquotas de 10  $\mu$ L de cada diluição foram semeadas em placas de petri contendo meio de cultura BHI Agar (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) (FIGURA 5 e 6) e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37° C. Após 24 horas foi verificado o crescimento dos microrganismos, e contadas as unidades formadoras de colônias

(UFC/mL), confirmando assim a contaminação dos canais radiculares de todos os espécimes após 21 dias.



**FIGURA 5** - Realização das diluições seriadas.



**FIGURA 6** – a-) Cone de papel no interior de tubo de ensaio com solução fisiológica; b-) realização da diluição seriada.

Para confirmar que a bactéria tratava-se de *Enterococcus*, foi realizada uma coloração de Gram.

#### 4.8 Divisão dos grupos

Após a coleta para comprovação de contaminação, os canais radiculares foram secos com cones de papel absorvente número 40 (Tanari®, Amazonas, Brasil) e divididos em quatro grupos, de acordo com a medicação testada:

**Grupo I** (n=11) Propilenoglicol ozonizado

**Grupo II-** (n=11) Calen PMCC

**Grupo III-** (n=11)- Propilenoglicol com hidróxido de cálcio ozonizado

**Grupo IV** -(n=11) Dentes contaminados, porém não foram preenchidos com nenhuma medicação (controle positivo)

**Grupo V** – (n=6) Dentes esterilizados, não foram inoculados a suspensão bacteriana. Foram usados como controle negativo

#### 4.9 Preparo da medicação intracanal

Para ozonizar o veículo – propilenoglicol (Labsynth, Diadema, SP, Brasil)- (Grupo I), tubos de ensaio contendo 5 mL de propilenoglicol foram submetidos a borbulhagem de oxigênio por um tempo de 60 minutos cada, obtido de um gerador de ozônio (OZONIC modelo C-20, São Bernado do Campo, São Paulo, Brasil). A pressão de alimentação de oxigênio medicinal foi de 5 L /minuto com uma potência de conversão de 1 (potência máxima do gerador), o que produziu uma concentração de 9 mg/L. O produto ozonizado foi colocado em tubinhos de anestésico de vidro previamente esterilizados e colocados no interior do canal radicular através de uma seringa tipo carpule (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com agulhas de anestésico longas 27G (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) (FIGURA7).



**FIGURA 7** – a-) Ozonizador com o gerador de oxigênio; b-) propilenoglicol sendo ozonizado; c-) introdução do propilenoglicol ozonizado no interior dos canais.

Para o grupo II, foi utilizado pasta calen PMCC® (SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), que foi levado ao canal radicular através da seringa ML (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de modo que preenchessem todo o comprimento do canal radicular.



**FIGURA 8** – Introdução da pasta calen PMCC no interior dos canais radiculares.

Para o grupo III, foi utilizado 5 mL de propilenoglicol, acrescido de 5 mg de hidróxido de cálcio p.a. (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), e foram ozonizados conforme descrito acima. O produto foi colocado em tubinhos de anestésico de vidro previamente esterilizados e levados ao interior do canal radicular através da seringa ML (Duflex), de modo que preenchessem todo o comprimento do canal radicular.

#### **4.10 Análise bacteriológica após tratamento**

Após sete dias com os curativos, os onze dentes de cada grupo foram irrigados com 2 mL de solução salina esterilizada e preenchidos com a mesma e um cone de papel absorvente esterilizado número 40 (Tanari®, Amazonas, Brasil), foi inserido em cada canal radicular, permanecendo por 1 minuto. Posteriormente o cone foi transferido para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução salina esterilizada e agitados por 30 segundos em agitador de tubos (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) e alíquotas de 100 µL foram transferidos para outro tubo de ensaio contendo 0,9 mL de solução salina esterilizada. Foram removidos 10 µL para semeadura em placas de petri contendo meio de cultura BHI Agar (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37° C. Após 24 horas foi verificado o crescimento

dos microrganismos, e contadas as unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Nos dentes do controle negativo também foram realizadas as coletas microbiológicas.

Os espécimes foram preenchidos com solução salina esterilizada e deixados em estufa microbiológica por mais 7 dias. Após este período foi realizada novamente a coleta microbiológica para avaliação do efeito residual das medicações. Estes procedimentos foram realizados da mesma forma que citado anteriormente do período de 7 dias.

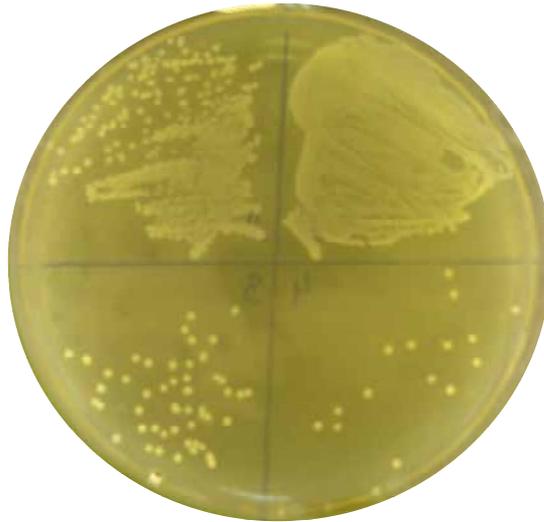


**FIGURA 9** - Coletas das amostras do canal radicular.

## 5 Resultados

### 5.1 Análise microbiológica

A Figura ilustra a coleta de confirmação das amostras após 21 dias de contaminação com *E. faecalis*



**FIGURA 10** – Coleta de confirmação em agar BHI.

### 5.2 Análise estatística

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e 1º. quartil, mediana e 3º. quartil. Para a comparação dos quatro grupos em cada momento de avaliação foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparação múltiplas através de Dunn, pois a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada. Para a comparação dos momentos de avaliação em cada um dos quatro grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman, pois a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada. Os dados foram representados graficamente através do Box-Plot. O nível de significância foi de 5%.

**Tabela 1:** Valores descritivos da quantidade de bactérias segundo o grupo de estudo e o momento da avaliação

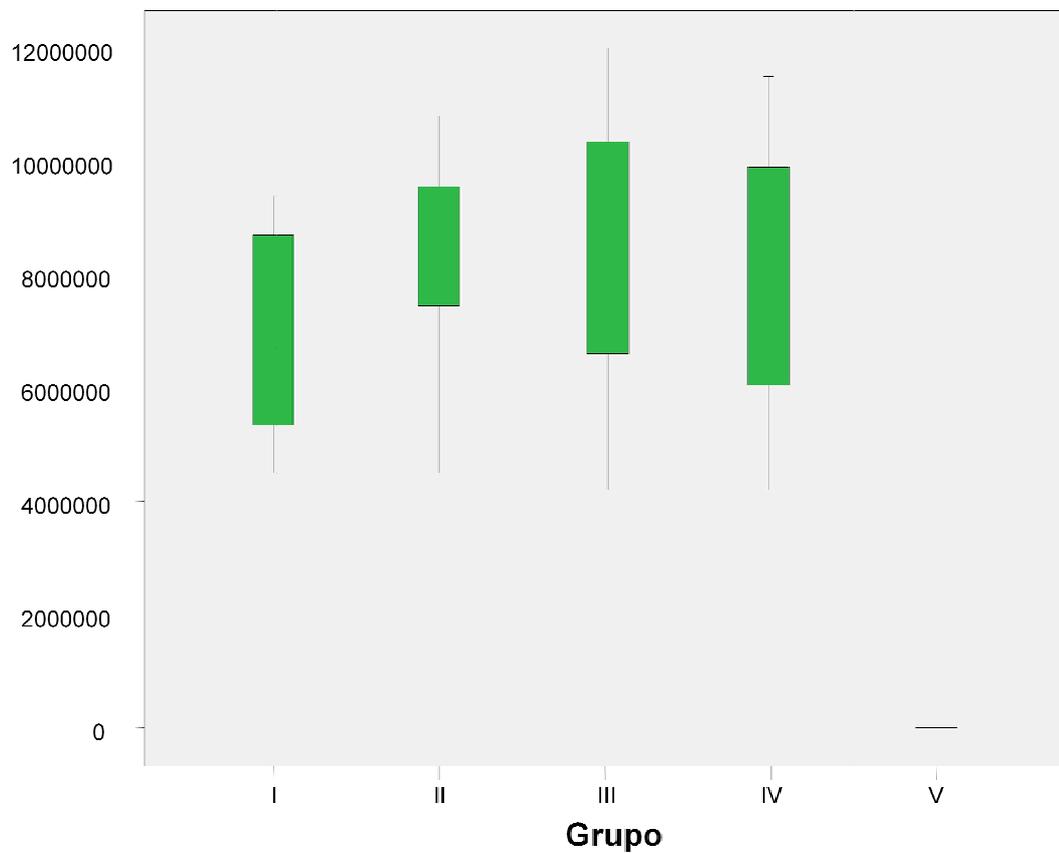
<b>Grupo</b>		<b>21 dias após contaminação</b>	<b>7 dias após medicação</b>	<b>14 dias após medicação</b>
<b>Propilenoglicol + ozônio (n=11) (grupo I)</b>	<b>Média</b>	6945454,55	3545,45	5959,09
	<b>dp</b>	1858689,67	4033,95	6019,56
	<b>Mínimo</b>	4500000,00	0,00	0,00
	<b>1o. Quartil</b>	5200000,00	0,00	530,00
	<b>Mediana</b>	6700000,00	3000,00	4000,00
	<b>3o. Quartil</b>	8900000,00	7000,00	11000,00
	<b>Máximo</b>	9400000,00	12000,00	17000,00
<b>Calen PMCC (n=11) (Grupo II)</b>	<b>Média</b>	8290909,09	818,18	527,27
	<b>dp</b>	1774516,58	2400,76	1502,72
	<b>Mínimo</b>	4500000,00	0,00	0,00
	<b>1o. Quartil</b>	7200000,00	0,00	0,00
	<b>Mediana</b>	8300000,00	0,00	0,00
	<b>3o. Quartil</b>	9800000,00	0,00	0,00
	<b>Máximo</b>	10800000,00	8000,00	5000,00
<b>Controle positivo (n=11) (grupo IV)</b>	<b>Média</b>	7963636,36	55090,91	49122,73
	<b>dp</b>	2307497,66	22853,68	37652,83
	<b>Mínimo</b>	4200000,00	11000,00	1000,00
	<b>1o. Quartil</b>	5800000,00	39000,00	11000,00
	<b>Mediana</b>	7900000,00	57000,00	54000,00
	<b>3o. Quartil</b>	10200000,00	71000,00	82000,00
	<b>Máximo</b>	11500000,00	89000,00	104000,00
<b>Propilenoglicol + hidróxido de Ca+ ozônio (n=11) (grupo III)</b>	<b>Média</b>	8345454,55	19181,82	18000,00
	<b>dp</b>	2631487,65	12867,15	12288,21
	<b>Mínimo</b>	4200000,00	0,00	4000,00
	<b>1o. Quartil</b>	5700000,00	5000,00	5000,00
	<b>Mediana</b>	8000000,00	21000,00	18000,00
	<b>3o. Quartil</b>	11500000,00	29000,00	25000,00
	<b>Máximo</b>	12000000,00	39000,00	44000,00
<b>Controle negativo (n=6) (Grupo V)</b>	<b>Média</b>	0,00	0,00	0,00
	<b>dp</b>	0,00	0,00	0,00
	<b>Mínimo</b>	0,00	0,00	0,00
	<b>1o. Quartil</b>	0,00	0,00	0,00
	<b>Mediana</b>	0,00	0,00	0,00
	<b>3o. Quartil</b>	0,00	0,00	0,00
	<b>Máximo</b>	0,00	0,00	0,00

Pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis observamos que os grupos diferem nos momentos 21 dias ( $p=0,001$ ), 7 dias ( $p< 0,001$ ) e 14 dias ( $p< 0,001$ ).

**No momento 21 dias:**

O grupo V (controle negativo) difere significativamente dos demais grupos (teste de Dunn,  $p< 0,05$ ).

Os outros grupos não apresentam diferença significativa entre si.



**GRÁFICO 1:** Box-plot da quantidade de bactérias, segundo o grupo de estudo na avaliação de 21 dias.

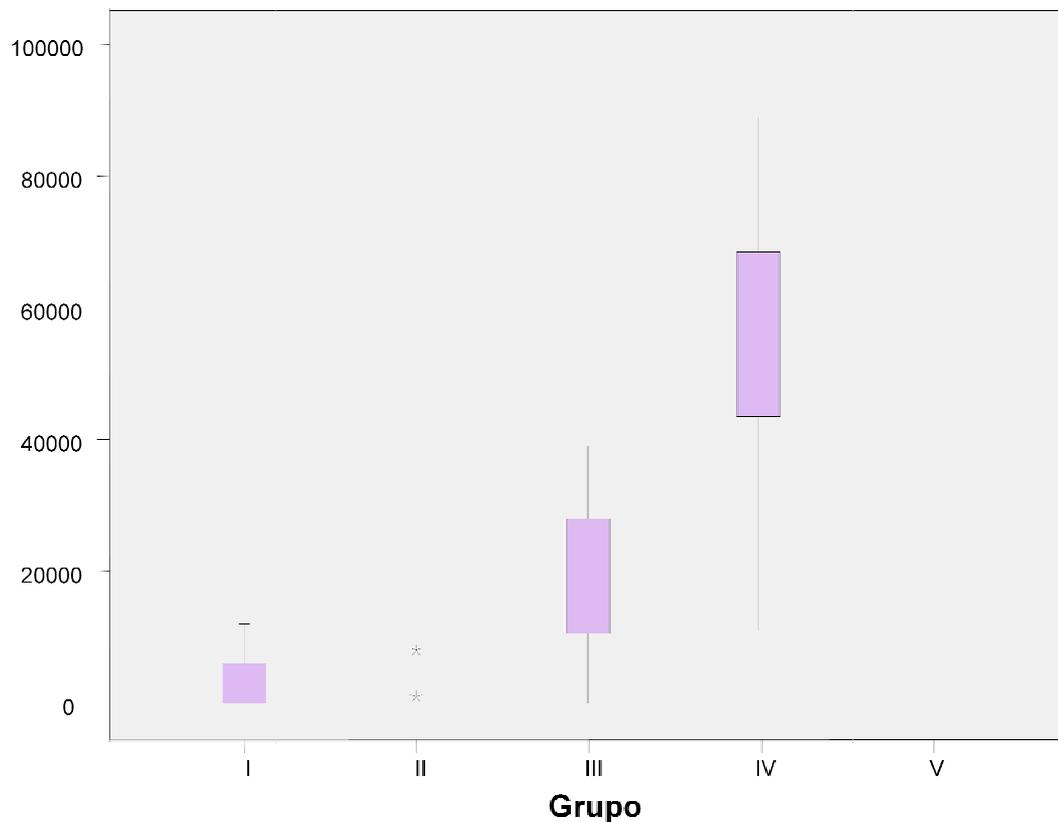
**No momento 7 dias:**

O grupo V (controle negativo) difere significativamente dos grupos IV e III (controle positivo e Propilenoglicol + hidróxido de Ca+ ozônio) (teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

O grupo IV (controle positivo) difere significativamente dos grupos I e II (Propilenoglicol + ozônio e Calen PMCC) (teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

O grupo III (Propilenoglicol + hidróxido de Ca+ ozônio) difere significativamente do grupo II (Calen PMCC) (teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

As demais comparações não apresentaram diferença significativa entre si.



**GRÁFICO 2:** Box-plot da quantidade de bactérias, segundo o grupo de estudo na avaliação de 7 dias.

### No momento 14 dias:

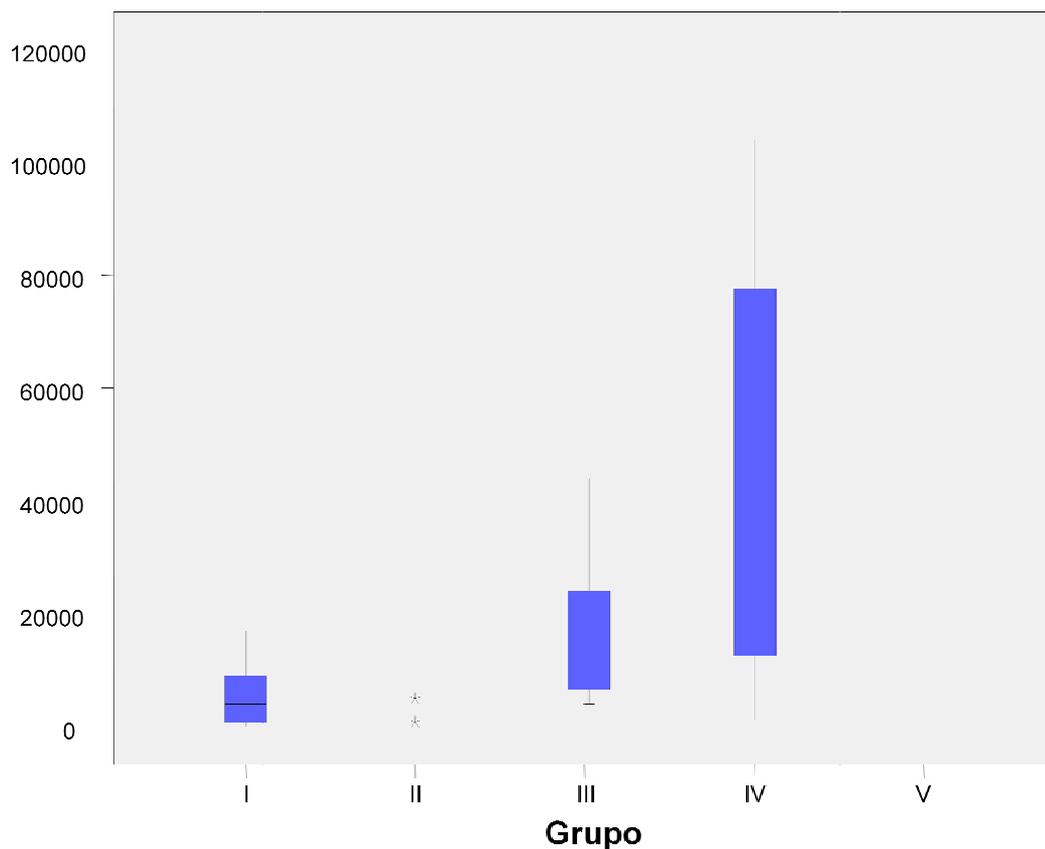
O grupo V (controle negativo) difere significativamente dos grupos IV e III (controle positivo e Propilenoglicol + hidróxido de Ca+ ozônio) (teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

O grupo II (Calen PMCC) difere significativamente dos grupos III e IV (Propilenoglicol + hidróxido de Ca+ ozônio e controle positivo) (teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

As demais comparações não apresentaram diferença significativa entre si.

Pelo teste não-paramétrico de Friedman observamos que nos grupos I,II,III e IV (Propilenoglicol + ozônio, Calen PMCC, Controle positivo e Propilenoglicol + hidróxido de Ca+ ozônio) apresentam alteração significativa ao longo das avaliações ( $p < 0,001$ ). No grupo V (controle negativo) não há alteração significativa.

Nos grupos com alteração, a avaliação de 21 dias difere significativamente das avaliações 7 dias e 14 dias ( $p < 0,05$ ). As avaliações de 7 e 14 dias não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



**GRÁFICO 3:** Box-plot da quantidade de bactérias segundo o grupo de estudo na avaliação de 14 dias

## 6 Discussão

### 6.1 A escolha do tema

A maioria das infecções endodônticas é de natureza polimicrobiana<sup>45,137,142</sup> decorrentes da invasão de microrganismos e de seus subprodutos, para a região periapical. Durante o processo de infecção nos canais radiculares, ocorrem interações entre as espécies microbianas, favorecendo o crescimento de espécies anaeróbias estritas, devido à baixa tensão de oxigênio, e das relações nutricionais<sup>70,137,138</sup>.

Desta forma, o sucesso do tratamento endodôntico dependerá da máxima eliminação de restos teciduais necróticos, microrganismos, e de seus produtos e subprodutos. Durante o tratamento endodôntico, além da ação mecânica, há necessidade da ação conjunta de substâncias químicas auxiliares ou soluções irrigadoras, complementada pela ação da medicação intracanal, objetivando assim a desinfecção do complexo sistema de canais radiculares, contribuindo para o sucesso da terapia endodôntica<sup>13,51,58,68,70,117</sup>.

Na busca de uma nova medicação intracanal com ação antimicrobiana, foi avaliado no estudo, a ação do propilenoglicol ozonizado como medicação intracanal entre sessões. O ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás bastante reativo, que formam radicais oxidantes na presença de água, que atuam na membrana celular, e dependendo da extensão das reações causam lise, conferindo-lhe propriedades antimicrobianas<sup>37,87,146</sup>.

O efeito antimicrobiano do ozônio na odontologia, ainda é pouco difundido, mas tem atraído alguns pesquisadores em determinadas áreas. Em periodontia com os trabalhos de Garduño et al.<sup>37</sup>, (1995); Barros, Fiorini<sup>5</sup>, (2000), em dentística restauradora com trabalhos de Baysan et al.<sup>7</sup> (2000), em endodontia com as pesquisas de Siqueira Jr. et al.<sup>121</sup> (2000); Nagayoshi et al.<sup>82-83</sup> (2004), no tratamento de lesões bucais, Rodriguez et al.<sup>106</sup> (1994); Guerra et al.<sup>43</sup>(1997) e na ação sobre *C. albicans* da saliva humana com os estudos de Faria et al.<sup>36</sup> (2005).

Desta forma, a avaliação *ex vivo* (utilizando dentes humanos extraídos), da ação do propilenoglicol ozonizado como medicação intracanal foi verificada e comparada com o efeito da pasta Calen PMCC, cuja eficácia antimicrobiana está bastante comprovada na literatura<sup>26-27,61,63,77,90,115-118,129</sup>.

## 6.2 A utilização de dentes humanos

A utilização de dentes humanos em pesquisas *ex vivo* enfrenta algumas dificuldades como obtenção dos dentes e padronização da amostra. Para esta pesquisa foram obtidos dentes que foram indicados para exodontia, na maior parte dos casos por problemas periodontais. Em relação à questão ética, no que diz respeito ao emprego *in vitro* de dentes humanos, foram utilizados nesta pesquisa dentes doados e provenientes do acervo do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Apesar das dificuldades como idade do dente, variações anatômicas, quantidade de dentina esclerosada, no presente estudo foram utilizados dentes unirradiculados, que tiveram suas coroas seccionadas, padronizando o tamanho dos espécimes em  $15 \pm 0,5$  mm. Os canais radiculares foram instrumentados até a lima Kerr nº 50 para padronização do diâmetro do canal radicular, obtendo-se assim espaço para inoculação de 20 µL da suspensão de microrganismos concordando com o trabalho de Menezes<sup>76</sup> (2005).

Após a instrumentação inicial os canais radiculares foram preenchidos com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17%, para remoção da *smear layer*, sendo este um fator importante a ser considerado, pois a remoção desta camada expõe os túbulos dentinários, facilitando assim a penetração de microrganismos no momento da contaminação dos canais, como também favorece a efetividade da medicação intracanal de acordo com os estudos de Sen et al.<sup>111</sup>(1999); Waltimo et al.<sup>147</sup>(2000).

Após preparo biomecânico inicial, foi realizada vedação da região apical com resina fotopolimerizável, para impossibilitar a saída de microrganismos durante e após a contaminação, bem como impossibilitar a saída da medicação intracanal. A impermeabilização externa da raiz, com adesivo epóxi, foi realizada para que a contaminação não ocorresse fora do canal radicular pelos túbulos dentinários. Para facilitar o manuseio e manter a assepsia dos espécimes, os mesmos foram incluídos em placas de polistireno de 24 poços, com resina acrílica quimicamente ativada<sup>89</sup>.

Após este procedimento, os espécimes foram esterilizados com radiação gama cobalto 60, pela Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD). Esta radiação é capaz de neutralizar pirógenos provavelmente devido a destruição da porção polissacarídica e alteração do lipídeo A<sup>22</sup>.

### 6.3 A escolha da bactéria

Na seleção dos microrganismos empregados, optou-se por *E. faecalis*, pois é uma bactéria frequentemente encontrada em canais infectados, apresentando importante habilidade em penetrar nos túbulos dentinários como relata Love<sup>71</sup> (2001) e Waltimo et al.<sup>147</sup> (2000), sendo bastante relacionado com os casos de insucessos endodônticos<sup>1,41-42,47,78-79,94,97-98,105,135-136</sup>.

Trabalhos relataram variados períodos de contaminação dos canais radiculares por microrganismos: 48 horas - Valera et al.<sup>144</sup> (2001), cinco dias - Waltimo et al.<sup>147</sup>(2000), sete dias - Menezes et al.<sup>77</sup> (2004), 14 dias - Siqueira Jr. et al.<sup>124</sup> (2003) e 21 dias – Menezes<sup>76</sup> (2005). O período de contaminação que foi adotado após inoculação da suspensão contendo *E. faecalis* no interior do canal radicular dos espécimes, foi de 21 dias com adição de meio de cultura a cada três dias, para manutenção das condições favoráveis para o crescimento da bactéria, pois segundo Menezes et al.<sup>77</sup> (2005) este é o período de tempo necessário para que a suspensão contendo a bactéria se difunda em direção ao cimento pelos túbulos dentinários.

A contaminação dos canais radiculares foi confirmada por uma coleta de amostras microbiológicas que foi realizada após os 21 dias da contaminação, na qual foi verificado que todas as raízes estavam contaminadas. Somente após esta confirmação, foi iniciada a colocação das medicações intracanaís.

Na metodologia da contaminação dos canais radiculares do presente estudo, foram utilizados dentes humanos, já Nagayoshi et al.<sup>83</sup> (2004) utilizou dentes bovinos e obtiveram diminuição significativa de microrganismos, após preparo biomecânico com a água ozonizada, porém deve-se ressaltar que em estudos onde se utilizam dentes bovinos, que apresentam túbulos dentinários maiores e mais permeáveis, a ação do agente irrigante ou medicação é facilitada.

No estudo de Siqueira Jr. et al.<sup>121</sup> (2000), não foi utilizado dentes humanos ou bovinos na contaminação, e sim placas de Petri, eliminando o fato de que microrganismos penetram em direção aos túbulos dentinários, local onde ficam alojados, dificultando a ação da medicação intracanal.

O método utilizado na coleta de amostras microbiológicas, na verificação do crescimento microbiológico no interior dos canais radiculares, foi por meio de cones de papel esterilizados, por ser um método efetivo, e de fácil execução. O cone foi colocado e deixado no interior do canal radicular, absorvendo o líquido existente, e

levado em tubo de ensaio contendo solução fisiológica esterilizada, agitado, e semeado em placas de Petri contendo meio de cultura de acordo com os estudos de Siqueira Jr. et al.<sup>121</sup> (2000) e de Valera et al.<sup>144</sup> (2001).

O método por meio de cones de papel esterilizados pode limitar-se apenas a luz do canal, não atingindo microrganismos presentes nas profundidades dos túbulos dentinários. Com intuito de eliminar este fato, foi realizada uma segunda coleta após sete dias da colocação da medicação e verificado a permanência de microrganismos viáveis no interior dos canais radiculares, permitindo também avaliar o efeito residual da medicação intracanal empregados<sup>56</sup>

No presente estudo não foi realizada a neutralização do hidróxido de cálcio e do ozônio. Optou-se pela não neutralização, pois foi verificado o efeito residual destas substâncias no período de 7 e 14 dias.

## **6.4 As medicações intracanaís**

### **6.4.1 Calen PMCC**

Com relação às medicações intracanaís, o hidróxido de cálcio é a medicação intracanal mais utilizada e tem sido o produto mais recomendado pelos autores: Leonardo<sup>68</sup>, (2005); Lopez, Siqueira Jr.<sup>70</sup> (1999); Tanomaru Filho et al.<sup>139</sup>; Leonardo et al.<sup>66</sup> (2002), e quando está associado ao PMCC possui maior ação antimicrobiana frente bactérias anaeróbias facultativas, dentre elas *E. faecalis*<sup>27,66,90,116,122,127</sup>. Sendo assim, a escolha do hidróxido de cálcio com PMCC na presente pesquisa foi feita para comparação com outras medicações intracanaís experimentais, visto que esta substância pode ser considerada como padrão ouro, tendo em vista as inúmeras pesquisas que comprovam sua eficácia antibacteriana<sup>26-27,61,63,66,77,90,115-118,122,129,133</sup>.

### **6.4.2 Ozônio**

Os pesquisadores estão em busca de novos medicamentos intracanaís que sejam tão eficientes quanto o hidróxido de cálcio associado ao PMCC, mas que não possuam alguns efeitos indesejáveis do PMCC. Neste contexto, encontra-se o ozônio,

que apresenta algumas características biológicas interessantes: ação bactericida, efeito debridante, estímulo a angiogênese, além do efeito oxidante.<sup>37</sup>

No presente estudo, optou-se por avaliar *in vitro*, com a utilização de dentes humanos extraídos, o efeito do ozônio associado ao propilenoglicol, como uma possível medicação intracanal. Os efeitos benéficos do ozônio foram avaliados na endodontia como agentes irrigantes com os estudos de Velano et al.<sup>146</sup> (2001), Nagayoshi et al.<sup>82-83</sup> (2004), Hems et al.<sup>49</sup> (2005), Estrela et al.<sup>30</sup> (2006), Cardoso et al.<sup>15</sup> (2007), Huth et al.<sup>52</sup> (2009) e como medicação intracanal com os trabalhos de Siqueira Jr. et al.<sup>121</sup> (2000), Pereira<sup>96</sup> (2002), Cruz<sup>21</sup> (2006), Noetzel et al.<sup>85</sup> (2009), sendo por testes de contato direto, utilização de dentes humanos extraídos ou em cães. Todos estes estudos comprovaram a eficácia antibacteriana do ozônio sobre diversos microrganismos.

O tempo de ozonização escolhido foi de 60 minutos. Este foi o tempo avaliado em estudo piloto realizado por Andolfatto et al.<sup>2</sup> (2009) realizado em placas de petri semeadas com 100 µL de *E. faecalis*, na qual se utilizou propilenoglicol ozonizado a diferentes tempos de ozonização (5, 10, 15, 30 e 60 minutos). Estas placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e após este período o halo de inibição foi verificado, sendo maior quando se utilizou o propilenoglicol ozonizado a 60 minutos. Um estudo anterior, por meio do método do teste de contato direto, Cruz<sup>21</sup> (2006) também utilizou 60 minutos de ozonização para inativar *E. faecalis*, sendo que as propriedades antibacterianas do propilenoglicol ozonizado foi avaliado imediatamente, 7, 15, 30 e 180 dias após a ozonização, comprovando que a eficácia antibacteriana permanece por 180 dias, desde que o produto seja armazenado em geladeira.

A concentração de ozônio no propilenoglicol, gerada por 60 minutos de ozonização foi de 9µg/mL. O fabricante especifica que o aparelho pode gerar 20g de ozônio por 1 hora, alimentado com 5L de oxigênio medicinal por hora. Para medir esta concentração, foi realizado estudo piloto, na qual foi ozonizado 5 mL de propilenoglicol a temperatura ambiente. Amostras do produto foram tituladas com tiosulfato de sódio e calculada a concentração final.

Embora exista dificuldade em comparar o presente estudo com os trabalhos realizados por Barros e Fiorini<sup>5</sup> (2000); Nagayoshi et al.<sup>82</sup> (2004); Baysan et al.<sup>8</sup> (2000); Polydoru et al.<sup>100</sup> (2006); Baysan, Beihton<sup>7</sup> (2007); Faria et al.<sup>36</sup> (2005); Oizumi et al.<sup>87</sup> (1998), Velano et al.<sup>146</sup> (2001); Hems et al.<sup>49</sup> (2005); Estrela et al.<sup>29</sup> (2007); Cardoso et al.<sup>15</sup> (2007); Huth et al.<sup>53</sup> (2009), pois utilizaram água ozonizada em

diferentes concentrações e em diferentes períodos de tempo de ozonização, para eliminar diversos microrganismos como *E. faecalis*, *C. albicans*, *S. mutans*, *S. aureus* O presente estudo concorda com o trabalho de Cruz et al.<sup>20</sup> (2006), na qual o propilenoglicol necessitou ser ozonizado por 60 minutos para produzir efeito bactericida sobre *E. faecalis*.

O ozônio pode apresentar efeito maléfico quando inalado em altas concentrações, podendo produzir danos com consequências prejudiciais à saúde em indivíduos saudáveis. Recomenda-se que em locais fechados onde se gera ozônio, não se deve permanecer por mais de oito horas. Desta forma, durante a geração de ozônio para os experimentos do presente estudo, o local de geração foi em um ambiente ventilado com renovação constante do ar, e o período de permanência no local não ultrapassou o tempo de quatro horas diárias, a fim de se evitar qualquer efeito prejudicial<sup>93</sup>.

#### 6.4.3 Propilenoglicol

O propilenoglicol é um líquido viscoso límpido, inodoro, incolor, higroscópico, hidrofílico, volátil, não irritante da pele, cuja fórmula molecular é  $C_3H_8O_2$ ; de peso molecular 76,09; amplamente utilizado pela indústria farmacêutica como veículo de um grande número de medicamentos de uso tópico, digestivo, retal e parenteral, entre eles produtos antibacterianos<sup>102</sup>.

Tem sido utilizado como veículo e solventes farmacêuticos em vários produtos. O uso de propilenoglicol como veículo, por exemplo, em pastas de hidróxido de cálcio tem sido amplamente pesquisado, e demonstrado ser o mais favorável para induzir a liberação de íons cálcio e hidroxila nas pastas em comparação com outros veículos, incluindo água destilada<sup>114</sup>.

A escolha do propilenoglicol a ser ozonizado para posterior utilização como medicação intracanal foi devido ao trabalho de Cruz et al.<sup>20</sup> (2006), que ozonizou diferentes produtos como o Óleo de oliva, Óleo de girassol, Calen PMCC, Calen, Propilenoglicol, propilenoglicol com hidróxido de cálcio, e colocou em placas de petri contendo *E. faecalis*. Os resultados mostraram que o propilenoglicol teve melhor capacidade de associação com o ozônio e boa estabilidade no tempo, mantendo a atividade antimicrobiana. Outra característica importante que deve ser ressaltada é no trabalho de Cruz et al.<sup>19</sup> (2002), que fizeram um estudo com o objetivo avaliar a

penetração de propilenoglicol em dentina radicular. Para tanto, foi utilizado o corante juntamente com o propilenoglicol e água destilada, das quais foram introduzidas em canais radiculares com e sem smear layer artificial. A difusão através dos túbulos dentinários foi determinada espectrofotometricamente. O tempo necessário para a saída do propilenoglicol e água destilada através do forame apical também foi determinada. A extensão e as áreas de penetração sobre as superfícies das raízes foram avaliadas usando o Adobe Photoshop e NIH Image Software. O Propilenoglicol permitiu a saída do corante mais rápido através do forame apical. A área e a profundidade de penetração do corante com propilenoglicol foi significativamente maior do que com água destilada ( $P < 0,0001$ ). A camada de smear layer atrasou significativamente a penetração do corante. Os autores concluíram que o propilenoglicol com corante atravessou o sistema de canais radiculares mais rapidamente e mais eficazmente indicando seu uso potencial como componente para medicação intracanal.

#### **6.4.4 Propilenoglicol ozonizado com hidróxido de cálcio**

Foi avaliado o uso do propilenoglicol com hidróxido de cálcio no intuito de manter as propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio associadas às propriedades do ozônio, verificando a possibilidade de substituição do paramonoclorofenolcanforado, que infelizmente possui propriedade irritante aos tecidos periapicais como visto anteriormente na literatura.

De acordo com o presente estudo, esta formulação não possui propriedades bactericidas, visto que não eliminou ou reduziu o *Enterococcus faecalis* no período de 7 dias e 14 dias, quando comparada com o grupo controle positivo. Este resultado está de acordo com o estudo de Cruz et al.<sup>22</sup> (2006), onde através do teste por contato direto mostrou que o hidróxido de cálcio juntamente com o ozônio não tiveram boa associação, ou seja, não tinham propriedades bactericidas sobre a suspensão de *Enterococcus faecalis*.

#### **6.4.5 Os resultados**

A contagem bacteriana referente à primeira coleta (após 21 dias de contaminação) mostrou que todos os canais radiculares estavam contaminados por *E.*

*faecalis*, exceto o grupo controle negativo, no qual não foi inoculado nenhum microrganismo, garantindo assim a eficácia da esterilização.

Em seguida, foram colocadas as medicações estudadas. A análise de *E. faecalis* após 7 dias no grupo controle positivo mostrou a manutenção de UFC/mL semelhante ao inicial. No grupo calen PMCC, houve redução bacteriana significativa. Embora algumas pesquisas como Leonardo et al.<sup>66</sup> (2002) e Lana et al.<sup>61</sup> (2009) demonstrem que esta medicação necessita de 14 dias para ter sua atividade bacteriana adequada, o presente estudo verificou que houve atividade em 7 dias, concordando com os estudos de Leonardo et al.<sup>63</sup> (1994); Siqueira Jr., Uzeda<sup>122</sup> (1996); Sukawat, Srisuwan<sup>123</sup> (2002); Menezes<sup>77</sup> (2004); Siqueira Jr et al.<sup>117</sup>(2007). Optou-se por verificar a atividade antibacteriana em 7 dias devido esta medicação apresentar alguns resultados positivos neste período e para comparar se o propilenoglicol ozonizado possuía efeito semelhante no mesmo período estudado, visto ser uma tendência em se buscar medicações com efeito bactericida adequado em curto período de tempo. Quando a pasta calen PMCC foi comparada com o Hidróxido de cálcio ozonizado, este mostrou ser estatisticamente diferente, ou seja, eliminou um número menor de bactérias. Estes resultados concordam com os de Cruz et al.<sup>22</sup> (2006).

O grupo propilenoglicol ozonizado também reduziu a quantidade de bactérias semelhante ao calen PMCC em 7 dias. Embora a maioria das pesquisas utilizem diversos veículos ozonizados, como a água e óleo, e com diversas concentrações e tempos e de ozonização, os resultados do presente trabalho assemelham-se com os estudos de Cardoso et al.<sup>15</sup> (2007), que utilizou água ozonizada como agente irrigante e reduziu o número de *Enterococcus faecalis* no mesmo período de tempo. Comprovando a importância da água ozonizada na diminuição do número de microrganismos ou de sua eliminação, outros estudos também demonstraram este efeito como agente irrigante.

No presente estudo, também compara a atividade antibacteriana com os estudos de Pereira<sup>96</sup> (2002), que utilizou óleo ozonizado como medicação intracanal em dentes de cães contaminados por *E. faecalis*. Embora o veículo também seja diferente, os resultados mostraram a eficácia do óleo ozonizado em possuir efeito bactericida semelhante ao hidróxido de cálcio com paramonoclorofenolcanforado e glicerina.

Quando o propilenoglicol ozonizado foi comparado com o hidróxido de cálcio ozonizado, não mostraram diferenças estatísticas, sugerindo então a necessidade de novas pesquisas como o aumento do número de amostras de dentes com os

medicamentos ou aumento do tempo de ozonização dos produtos, para se comprovar se o propilenoglicol ozonizado tem maior poder bactericida do que o hidróxido de cálcio ozonizado.

Assim sendo, tanto o Calen PMCC, quanto o propilenoglicol ozonizado quando comparados com o grupo controle, foram capazes de reduzir a quantidade de bactérias no interior do canal radicular em 7 dias.

Com o intuito de verificar se os curativos a base de ozônio possuem efeito residual, amostras microbiológicas foram coletadas no interior dos canais radiculares com 14 dias após a colocação das medicações. Os dados desta coleta mostraram que este período foi semelhante aos de 7 dias para todos os grupos. Assim sendo, as amostras bacteriológicas mostraram que o ozônio não possui efeito residual, indicando que microrganismos localizados mais profundamente nos túbulos dentinários, não foram atingidos pelo propilenoglicol ozonizado e hidróxido de cálcio ozonizado, pois foram capazes de recolonizar a luz do canal radicular.

## **7 Conclusão**

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos, conclui-se que:

O Propilenoglicol ozonizado e a pasta Calen PMCC reduziram estatisticamente o número de bactérias quando comparados ao grupo controle positivo, em 7 e 14 dias.

O hidróxido de cálcio ozonizado não reduziu estatisticamente o número de bactérias quando comparados ao grupo controle positivo em 7 e 14 dias.

O propilenoglicol ozonizado e a pasta Calen PMCC, mostraram não haver diferenças estatísticas significantes na proliferação bacteriana em 7 e 14 dias.

Em uma ordem decrescente de atividade antibacteriana nos dois períodos analisados, encontra-se a pasta Calen PMCC, seguido do propilenoglicol ozonizado e hidróxido de cálcio ozonizado.

## 8. Referências\*

1. Adib V, Spratt YL, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J.* 2004; 37: 542-51.
2. Andolfatto C, Farac RV, Pizzolitto AC, Bonetti-Filho I. Avaliação in vitro do tempo de ozonização do propilenoglicol para produzir efeito bactericida sobre *Enterococcus faecalis*. *Braz Oral Res* 2009; 23 (Suppl. 1): 288 (Proceedings of the 26th SBPqO Annual Meeting)
3. Arita M, Nagayoshi M, Fukuizumi T, Okinaga T, Masumi S, Morikawa M, Kakinoki Y, Nishihara T. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 206-10.
4. Barbosa CAM, Gonçalves RB, Siqueira Júnior JF, Uzeda MD. Evaluation of antibacterial activities of calcium hydroxide, clorexidine and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. *J Endod.* 1997; 23: 297 – 300.
5. Barros LM, Fiorini JE. Efeito da clorexidina e da água ozonizada sobre os *S. viridans* da placa bacteriana supragengival. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2000; 54: 47-52.
6. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, XIA T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29: 794-7.
7. Baysan A, Beighton D. Assessment of the ozone-mediated killing of bactéria in infected dentine associated with non-cavited occlusal carious lesions. *Caries Res.* 2007; 41: 337-41.
8. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res.* 2000; 34: 498- 501.
9. Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, Mcpherson JC. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod.* 2001; 27: 765-7.

---

\*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

10. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vainna ME, Ferraz CC, Zaia AA et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006; 39: 10-7.
11. Bocci V. Ozone: a new medical drug. Dorrecht: Springer; 2005. 295 p.
12. Bocci V. Ozone as bioregulator. *Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today*. *J Biol Regul Homeost Agents*. 1996; 19: 31-53.
13. Bonetti filho I. Tratamento de canais radiculares de dentes de cães com necrose pulpar e lesão periapical crônica induzida, realizado em sessão única e em duas sessões, utilizando três diferentes curativos de demora [tese de livre docência]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2000.
14. Booth IR. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev*. 1985; 49: 359-78.
15. Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105: 85-91.
16. Carvalho RA, Lia RCC, Benatti Neto C, Oliveira MRB. Avaliação comparativa do potencial irritativo de misturas de paramonoclorofenol canforado utilizados como "medicação intracanal" no tratamento de canais radiculares: estudo histopatológico em dentes de cães. *Rev Odontol UNESP*. 1991; 20: 25-40.
17. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003; 36: 500-8.
18. Chong BS, Pitt Ford TR. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J*. 1992; 25: 87-106.
19. Cruz EV, Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *Int Endod J*. 2002; 35: 330-6.
20. Cruz HFO, Bonetti Filho I, Ampuero BPL. Evaluación "in vitro" de la asociación del efecto antimicrobiano del ozono unido a vehículos y medicamentos de acción prolongada. *Acta Odontol Venez*. 2008; 46: 159-64.
21. Cruz HFO. Avaliação in vitro da associação do efeito antimicrobiano do ozônio a veículos e curativos de demora em diferentes períodos de tempo de armazenagem [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de odontologia da UNESP; 2006.

22. Csako G, Elin RJ, Hochstein D, Tsai CH. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun.* 1983; 41: 190-6.
23. Dähnhardt JE, Gygax M, Martignoni B, Suter P, Lussi A. Treating sensitive cervical areas with ozone. A prospective controlled clinical trial. *Am J Dent.* 2008; 21: 74-6.
24. De Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99: 628-36.
25. Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odont Revy.* 1964; 15: 87-106.
26. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J.* 2001; 34: 341-5.
27. Estrela C, Bammann LL, Sydney GB, Moura J. Efeito antibacteriano de pastas de hidróxido de cálcio sobre bactérias aeróbias facultativas. *Rev Fac Odontol Bauru.* 1995; 3: 109-14.
28. Estrela C, Decurcio DA, Alencar AHG, Blitzkow G, Silva SJA. Efficacy of calcium hydroxide dressing in endodontic infection treatment: a systematic review. *Rev Odonto Ciênc.* 2008; 23: 82-6.
29. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J.* 2007; 40: 85-93.
30. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Silva JA, Bammann LL. Antimicrobial potencial of ozone in ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. *Bras Dent J.* 2006; 17: 134-8.
31. Estrela C, Pimenta FC, Yoko Ito I, Bammann LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998; 24: 15-7.
32. Estrela C, Pimenta FC, Yoko Ito I, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod.* 1999; 25: 416-8.
33. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Jr O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade de enzimática de bactérias anaeróbicas. *Rev Fac Odontol Bauru.* 1994; 2: 31-8.

34. Evans M, Davies JK, Sundquist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35: 221-8.
35. Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. I. Etiology. *J Endod.* 1988; 14: 363-71.
36. Faria IS, Ueno M, Koga-Ito CY, Urruchi WI, Balducci I, Jorge AOC. Effects of ozonated water on *Candida albicans* oral isolates. *Braz J Oral Sci.* 2005; 4: 783-86.
37. Garduño PG, Quijano JIG, Lara LGV, García SN, Muñoz EH. Efectos del agua ozonificada en la placadentobacteriana. *Assoc Dent Med.* 1995; 52: 305-8
38. Gomes BPFA, Drucker DB, Liley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996; 29: 69-75.
39. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FB. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32: 937- 40.
40. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA et al. Microbiological examination of infected dental in root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19: 71-6.
41. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza- Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34: 537- 40.
42. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Souza-Filho Jr FJ et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and polymerase chain reaction anlysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 247-53.
43. Guerra OC, Cepero SM, Jordán MEM, Vazquez TC. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. *Rev Cubana Estomatol.* 1997; 34: 21-4.
44. Güzel-seydim ZB, Greene AK, Seydim AC. Use of ozone in the food industry. *Lebensm Wiss Technol.* 2004; 37: 453-60.
45. Haapasalo M. *Bacterioides* spp. dental root canal infecctions. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5: 1-10.

46. Haas CN, Kaymak B. Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone. *Water Res.* 2003; 37: 2980-8.
47. Hancock III HH, Sigurdsson A, Trope MA, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in North America population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91: 579-86.
48. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Brit Endod Soc.* 1975; 8: 74-93.
49. 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.
50. Hidalgo MM, Kawana GRC, Gonçalves CEB, Oliveira RMW, Bersani-Amado CA. Avaliação da tolerância tecidual a algumas substâncias utilizadas como medicação intracanal no tratamento endodôntico. *Rev FOL.* 1999; 11: 5-15.
51. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Barnabé PFE, Dezan Jr E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2003; 29: 121-4.
52. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 435-40.
53. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R. Effectiveness ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J.* 2009; 42: 3-13.
54. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza Filho FB. Incidence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J.* 2006; 39: 62-70.
55. Jansen HJ, Hoeven JSVD. Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *Actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein cleaving oral bacteria in serum. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 346-53.
56. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2,0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994; 20: 276-8.

57. Katebzadeh N, Sigurdsson A, Trope M. Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study. *Int Endod J.* 2000; 33: 60-5.
58. Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repairs after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod.* 1999; 25: 364-8.
59. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 308-20.
60. Kontakiotis E, Nakou M, Georgopoulou M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora on the root canal. *Int Endod J.* 1995; 28: 285–9
61. Lana PE, Scelza MF, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J.* 2009; 20: 32-6.
62. Lapolli FR, Santos LF, Hassemer MEN, Aisse MM, Piveli RP. Desinfecção de efluentes sanitários por meio de ozonização. In: Gonçalves RF. Desinfecção de efluentes sanitários. Rio de Janeiro: RiMa Artes e Testos; 2003. p. 170-209. [citado 2009 Jul 19]. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabRicardo.pdf>.
63. Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, Silva LAB. (140) Radiographic and microbiologic evaluation of post treatment apical and periapical repair of root canals of dogs teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78: 232-8.
64. Leonardo MR, Hernandez MEFT, Silva LAB, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2006; 102: 680-85.
65. Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. (152) Calcium hydroxide root canal sealers – histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod.* 1997; 23: 428-32.
66. Leonardo MR, Silveira FF, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J.* 2002; 13:17- 22.

67. Leonardo MR, Simões Filho AP, Esberard RM, Bonetti Filho I, Leonardo RT. (105). Safe and easy way to use calcium hydroxide as a temporary dressing. *J Endod.* 1993; 19: 319-20.
68. Leonardo MR. Medicação intracanal. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares princípios técnicos e biológicos.* São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.997-1048.
69. Lopes HP, Estrela C, Elias CN. Comparative study of calcified bridge after pulpotomy and the use of calcium hydroxide associated with different vehicles. *Braz Endod J.* 1996; 1: 39-43.
70. Lopes HP, Siqueira Jr JF. *Endodontia: Biologia e Técnica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 650 p.
71. Love RM. *Enterococcus faecalis*: a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34: 399-405.
72. Marsh P, Martin MV. *Oral Microbiology.* London: Wright; 1999. 208 p.
73. Matsumiya S, Kitamura, M. Histopatological and histobacteriological studies of the relation between the condition of sterilization of the interior of the root canal and the healing process of periapical tissues in experimentally infected root canals. *Bull Tokyo Dental Coll.* 1960; 1: 1-19.
74. Mauricio CV, Lia RCC, Leonardo MR, Benatti Neto C. Estudo histomorfológico do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de pastas à base de hidróxido de cálcio, contidas em tubos de dentina humana. *Rev Odont UNESP.* 1986/87; 15/16: 23-38.
75. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod.* 2004; 30: 218-9.
76. Menezes MM. Ação do laser Nd:YAG, soluções irrigadoras e medicamentos sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* semeados em canais radiculares [tese de doutorado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2005.
77. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004; 37:311-9.
78. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31:1-7.

79. Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth: methodological studies. *Odontol Tidskr.* 1966; 74: 1-380.
80. Morgan LFSA, Albuquerque RC, Gonçalves PVAJ, Lanza LD, Poletto LTA. Eficácia antimicrobiana de óleos de copaíba e girassol ozonizados sobre o *S. mutans* – estudo in vitro. XVIII grupo brasileiro de professores de dentística. [citado 2009 Jul 17]. Disponível em: <http://www.gbpd.com.br/Arquivos/18encontro/hhaGGBoc.pdf>
81. Murakami H, Sakuma S, Nakamura K, Ito Y, Hattori M, Asai A, Noguchi T, Maeda H, Kameyama Y, Kimura Y, Nagao T, Kawai T, Hasegawa J. Disinfection of removable dentures using ozone. *Dent Mater J.* 1996; 15: 220-5.
82. 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.* 2004; 19: 240-6.
83. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod.* 2004; 30: 778-81.
84. Nagem Filho H, Nagem HD, Coutinho KQ, Carvalho PRMA, Fiuza CT. Propriedades do paramonoclorofenol canforado e paramonoclorofenol canforado associado ao hidróxido de cálcio. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr.* 2007; 7: 235-9.
85. Noetzel J, Nonhoff J, Bitter K, Wagner J, Neumann K, Kielbassa AM. Efficacy of calcium hydroxide, Er:YAG laser or gaseous ozone against *Enterococcus faecalis* in root canals. *Am J Dent.* 2009; 22: 14-8.
86. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9: 1-9.
87. Oizumi M, Suzuki T, Uchida M, Furuya J, Okamoto Y. In vitro testing of a denture cleaning method using ozone. *J Med Dent Sci.* 1998; 45: 135-9.
88. Oliveira LD, Carvalho CAT, Jorge AOC. Microrganismos causadores de infecções pulpares e peripicais. In: Jorge AOC *Microbiologia bucal.* São Paulo: Santos; 2007. p.127-42.
89. Oliveira LD. Efetividade *in vitro* de agentes irrigantes na neutralização de endotoxinas em canais radiculares [tese de doutorado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2005.

90. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6:142-9.
91. Padan E, Zilberstein D, Schuldiner S. pH Homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1981; 650: 151- 66.
92. Paraskeva P, Lambert SD, Graham NJD. Influence of ozonation conditions on the treatability of secondary effluents. *Ozone Sci Engineering.* 1998; 20:133-50.
93. Paz C. Some consequences of ozone exposure on health. *Archs Med Res.* 1997; 28:163-70.
94. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. *J Endod.* 2000; 26: 593-5.
95. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth canals with chronic apical periodontitis. *J Endod.* 2001; 43: 429-34.
96. Pereira AMVS. Comparação do efeito da medicação intracanal com pasta HPG (hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado e glicerina) e com óleo ozonizado, no tratamento endodôntico de dentes despolpados com lesão perirradicular associada: estudo radiográfico, histopatológico e histobacteriológico em cães [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia da UFRJ; 2002.
97. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB. Identification of Enterococci isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions and their antimicrobial susceptibility to different antibiotics. *Int Endod J.* 2004; 37: 346-47.
98. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Texeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36: 1-11.
99. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 100-3.
100. Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparasion with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 349-53.

101. Quillin BT, Dabirsiaghi CL, Krywolap GN, Dumsha TC. Antimicrobial effect of Ca(OH)<sub>2</sub> supplemented with metronidazole and chlorhexidine as intracanal medicaments. *J Endod.* 1992; 18: 187
102. Raymond CR, Paul JS, Paul JW. Handbook of pharmaceutical excipients, Washington: American Pharmaceutical Association (APhA). 2002; 521-23.
103. Restaino L, Framptom EW, Hemphill JB, Palnikar P. Efficacy of ozonated water against various food- Related microorganisms. *Appl Environm Microbiol.* 1995; 61: 3471-5.
104. Ricucci D, Siqueira Jr JF. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod.* 2008; 34: 1249-54.
105. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular disease. *J Endod.* 2004; 30: 315-20.
106. Rodriguez LM, Cerepo MS, Perdomo EO. Efectos Del ozono en el tratamiento de la gingivostomatitis herpética aguda. *Rev Cubana Estomatol.* 1994; 31: 14-7.
107. Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod.* 2008; 34: 541-45.
108. Sassone LM, Fidel RA, Figueiredo L, Fidel SR, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 390-7.
109. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Dupre I, Pinna A, Moliccotti P, Fadda G, Zanetti S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (oleozon). *J Applied Microbiol.* 2001; 90: 279-84.
110. Sedgley CM, Lennan SI, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005; 38: 735-42.
111. Sen BH, Safavi KE, Spanberg LSW. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod.* 1999; 25: 235-8.
112. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, PansaniC.A. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod.* 2002; 28: 94-8.
113. Silveira AMV, Lopes HP, Siqueira Jr JF, Macedo SB, Consolaro A. periradicular repair after two-visit endodontic treatment using two different intracanal medications compared to single-visit endodontic treatment. *Braz Dent J.* 2007; 18: 299-304.

114. Simon ST, Bhat KS, Francis R. Effect of four vehicles on the pH of calcium hydroxide and the release of calcium ion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995; 80: 459–64.
115. Siqueira Jr JF, Lopes HP, Magalhães FAC, Uzeda M. Atividade antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio/PMCC glicerina contendo diferentes proporções de iodofórmio sobre bactérias anaeróbicas estritas e facultativas. *Rev Paul Odontol.* 1997; 19: 17-21.
116. Siqueira Jr JF, Magalhães FAC; Uzeda M. Avaliação da atividade antimicrobiana de medicação intracanal: três bases fortes e pastas à base de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado. *RGO* 1996; 44: 271-4.
117. Siqueira Jr JF, Magalhães KM, Rôças IN. Bacterial Reduction in Infected Root Canals Treated With 2.5% NaOCl as an Irrigant and CalciumHydroxide/Camphorated Paramonochlorophenol Paste as an Intracanal Dressing. *J Endod.* 2007; 33: 667-72.
118. Siqueira Jr JF, Oliveira JCM, Magalhães FAC, Lopes HP. Efeitos do Hidróxido de cálcio associados a diferentes veículos sobre dentina contaminada. *Rev Bras Odont.* 2001; 58: 44-7.
119. Siqueira Jr JF, Roças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AC. *Actinomyces Species, Streptococci and Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J Endod.* 2002; 28:168-71.
120. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 85-94.
121. Siqueira Jr JF, Roças IN, Cardoso CC, Macedo SB, Lopes HP. Efeitos antibacterianos de um novo medicamento – o óleo ozonizado – comparados às pastas de hidróxido de cálcio. *Rev Bras Odontol.* 2000; 57: 252-6.
122. Siqueira Jr JF, Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22: 674-6.
123. Siqueira JR JF. A etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001; 34: 1-10.
124. Siqueira Jr JF, Rocas IN, Lopes HP, Magalhaes FAC, de Uzeda M. [Tese de Doutorado]. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *J Endod.* 2003; 29: 501-4.

125. Siqueira Jr JF. Infecções Endodônticas: controle, prevenção e estudo de patogenicidade [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia da UFRJ; 1998.
126. Siqueira Jr JF. Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29: 619-23.
127. Siqueira Jr JF. Tratamento das infecções endodônticas. Rio de Janeiro: Medsi; 1997. 196 p.
128. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24:119-25.
129. Souza V, Bernabé PFE, Holland R, Nery MJ, Mello W, Otoboni Filho JA. Tratamento não cirúrgico de dentes com lesões periapicais. *Rev Bras Odontol* 1989; 46: 39-46.
130. Steeg PFT, Hoeven JSVD. Development of periodontal microflora on human serum. *Microbial Ecol Health Dis.* 1989; 2: 1-10.
131. Stevens RH, Grossman LI. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod.* 1983; 9: 372-74.
132. Strockinger HE. Ozone *toxicity*. A review of research and industrial experience: 1954-1965. *Arch Environ Health.* 1965; 10: 719-31.
133. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2002; 28: 102-4.
134. Sulitzeanu A, Beutner EH, Epstein LI. Bacteriologic studies of pulp involved teeth by cultural and microscopic methods. *J Am Dent Assoc* 1964; 69: 300-7.
135. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod.* 2002; 28: 304-10.
136. Sundqvist G, Figdor D, Person S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85: 86-93.
137. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992; 18: 427-30.
138. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7: 257-62.

139. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod.* 2002; 28: 295-9.
140. Torneck CD, Smith JS, Grindall P. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth, IV, Effect of debridment procedures and calcium hydroxide-camphorated parachlorophenol paste in treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973; 35: 541-54.
141. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1990; 6: 73- 7.
142. Tronstad L. Recent development in endodontic research. *Scand J Dent Res.* 1992; 100: 52-9.
143. Turk BT, Sen BH, Ozturk T. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 297-301.
144. Valera MC, Rego JM, Jorge AOC. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod.* 2001; 27: 401-8.
145. Velano CEE, Velano HE, Nascimento LC. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da água ozonizada frente a *Escherichia coli*. *Rev Bras Clín Terap.* 2002; 8: 226-31
146. Velano HE, Nascimento LC, Barros LM, Panzeri H. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. *Pesqui Odontol Bras.* 2001; 15:18-22.
147. Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. In vitro yeast infection of human dentin. *J Endod.* 2000; 26: 207-9.
148. Waltimo TMT, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30: 96-101.
149. Waltimo TNT, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MPP. Suscetibility of oral *candida* species to calcium hydroxide *in vitro*. *Int Endod J.* 1999; 32: 94-8.
150. Weiger R, De Lucena J, Decker HE, Löst C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J.* 2002; 35: 166-7

## 9 Anexos

### Anexo 1 - Certificado do comitê de ética em pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Comitê de Ética em Pesquisa

# Certificado

**Certificamos** que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO BACTERICIDA DO OZÔNIO ASSOCIADO AO PROPILENOGLICOL EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM ENTEROCOCCUS FAECALIS EM DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO DE ARMAZENAGEM", sob o protocolo nº 42/08, de responsabilidade do Pesquisador (a) **IDOMEO BONETTI FILHO**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAR, com validade de 02 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

**Certify** that the research project titled "EVALUATION OF THE OZONE'S BACTERICIDA EFFECT ASSOCIATED WITH PROPILENOGLICOL ON INFECTED ROOT CANAL BY ENTEROCOCCUS FAECALIS IN DIFFERENTS PERIODS OF STORAGE TIME", protocol number 42/08, under Dr. **IDOMEO BONETTI FILHO**, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAR-UNESP. Approval is granted for 02 (two) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 13 de novembro de 2008.

  
Prof.ª Dr.ª *Mirian Aparecida Onofre*  
Coordenadora

Os resultados obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) em todas as coletas nos grupos I,II,III,IV e V estão representadas nas tabelas abaixo:.

**Tabela 2** – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. faecalis* do grupo I após 21 dias de contaminação, 7 dias e 14 dias após a medicação

<b>Dentes</b>	<b>21 dias após contaminação</b>	<b>7 dias após medicação</b>	<b>14 dias após medicação</b>
<b>1</b>	7.200.000	0	800
<b>2</b>	8.500.000	5.000	11.000
<b>3</b>	5.200.000	8.000	15.000
<b>4</b>	6.700.000	3.000	4000
<b>5</b>	4.500.000	0	220
<b>6</b>	9.400.000	7.000	7.000
<b>7</b>	5.500.000	12.000	17.000
<b>8</b>	8.900.000	0	530
<b>9</b>	4.800.000	0	0
<b>10</b>	9.400.000	1.000	4.000
<b>11</b>	6.300.000	3.000	6.000

*Grupo I – propilenoglicol + ozônio*

**Tabela 3** – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. faecalis* do grupo II após 21 dias de contaminação, 7 dias e 14 dias após a medicação

<b>Dentes</b>	<b>21 dias após contaminação</b>	<b>7 dias após medicação</b>	<b>14 dias após medicação</b>
<b>1</b>	10.800.000	0	0
<b>2</b>	9.300.000	0	0
<b>3</b>	7.700.000	8000	5000
<b>4</b>	7.800.000	0	0
<b>5</b>	8.300.000	0	0
<b>6</b>	9.800.000	0	0
<b>7</b>	8.500.000	0	0
<b>8</b>	7.000.000	1.000	800
<b>9</b>	7.200.000	0	0
<b>10</b>	4.500.000	0	0
<b>11</b>	10.300.000	0	0

*Grupo II – Calen PMCC*

**Tabela 4** – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. faecalis* do grupo IV após 21 dias de contaminação, 7 dias e 14 dias após a medicação

<b>Dentes</b>	<b>21 dias após contaminação</b>	<b>7 dias após medicação</b>	<b>14 dias após medicação</b>
<b>1</b>	5.800.000	71.000	104.000
<b>2</b>	11.500.000	89.000	94.000
<b>3</b>	10.300.000	62.000	11.000
<b>4</b>	6.300.000	48.000	54.000
<b>5</b>	4.200.000	49.000	62.000
<b>6</b>	10.200.000	83.000	14.000
<b>7</b>	5.700.000	39.000	1.000
<b>8</b>	7.900.000	57.000	82.000
<b>9</b>	8.700.000	66.000	73.000
<b>10</b>	7.400.000	31.000	1.350
<b>11</b>	9.600.000	11.000	44.000

*Grupo IV – Controle positivo*

**Tabela 5** – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. faecalis* do grupo III após 21 dias de contaminação, 7 dias e 14 dias após a medicação

<b>Dentes</b>	<b>21 dias após contaminação</b>	<b>7 dias após medicação</b>	<b>14 dias após medicação</b>
<b>1</b>	5.300.000	27.000	20.000
<b>2</b>	12.000.000	32.000	44.000
<b>3</b>	5.700.000	0	4.000
<b>4</b>	7.500.000	16.000	5.000
<b>5</b>	8.800.000	29.000	25.000
<b>6</b>	11.500.000	5.000	8.000
<b>7</b>	9.200.000	21.000	23.000
<b>8</b>	11.600.000	39.000	18.000
<b>9</b>	8.000.000	24.000	17.000
<b>10</b>	4.200.000	1.000	5.000
<b>11</b>	8.000.000	17.000	29.000

*Grupo III – propilenoglicol+ hidróxido de Ca+ ozônio*

**Tabela 6** – Resultados obtidos: médias de UFC/ml de *E. faecalis* do grupo V após 21 dias de contaminação, 7 dias e 14 dias após a medicação

<b>Dentes</b>	<b>21 dias após contaminação</b>	<b>7 dias após medicação</b>	<b>14 dias após medicação</b>
<b>1</b>	0	0	0
<b>2</b>	0	0	0
<b>3</b>	0	0	0
<b>4</b>	0	0	0
<b>5</b>	0	0	0
<b>6</b>	0	0	0

*Grupo V – Controle negativo*

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 29 de março de 2010.

Roberta Vieira Farac