

MARCELO GONÇALVES CARDOSO

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DA ÁGUA OZONIZADA
COMO SOLUÇÃO IRRIGADORA NA ELIMINAÇÃO DE
Candida albicans, *Enterococcus faecalis* E ENDOTOXINAS
DO CANAL RADICULAR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

MARCELO GONÇALVES CARDOSO

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA DA ÁGUA OZONIZADA
COMO SOLUÇÃO IRRIGADORA NA ELIMINAÇÃO DE
Candida albicans, *Enterococcus faecalis* E ENDOTOXINAS
DO CANAL RADICULAR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientador: Prof. Titular **Antonio Olavo Cardoso Jorge**

São José dos Campos

2006

DEDICATÓRIA

Primeiramente,

a ***DEUS***, minha fonte de paz e vida;

Especialmente,

à minha esposa ***Giselli Nascimento Neves*** pelo apoio e auxílio,
principalmente nas horas mais difíceis.

a toda minha ***Família*** que muito me incentivou.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Seu exemplo de pessoa e de profissional, me inspira integridade e referência;

Agradeço pelo apoio, seriedade, conhecimento, dedicação, paciência, e principalmente pela confiança depositada em mim, possibilitando a realização do Doutorado;

Agradeço não só pela orientação da tese, mas por todas orientações dadas à minha carreira profissional;

Por tudo, minha sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”*, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Paulo Villela Santos Junior, e do Vice Diretor Prof. Dr. José Roberto Rodrigues.

Ao *Programa de Biopatologia Bucal*, na pessoa da coordenadora Prof.^a Dr.^a. Rosilene Fernandes da Rocha por toda atenção e empenho ao programa.

Ao *Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal*, pela oportunidade da realização deste curso, e pela excelência na qualidade do ensino.

À *Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação* da Universidade de Taubaté, na pessoa da Pró-reitora *Prof.^a Dr.^a Maria Júlia Ferreira Xavier Ribeiro*, pela bolsa de estudo concedida durante a execução do trabalho.

Às *Professoras, Dr.^a Juliana Campos Junqueira*, e *Dr.^a Cristiane Yumi Koga Ito*, pela contribuição na confecção do trabalho.

À *Doutora Luciane Dias de Oliveira*, pelo apoio prestado durante a execução da etapa imunológica, da parte laboratorial.

À *Prof.^a Dr.^a Mariko Ueno*, pelo apoio prestado durante a execução da etapa microbiológica, da parte laboratorial.

Ao *Prof. Dr. Wilfredo Irrazabal Urruchi*, que cedeu o aparelho gerador de ozônio, para que o presente trabalho pudesse ser realizado.

À *Secretaria da Pós-Graduação*, por toda atenção dispensada durante todo o curso.

À *Silvia Scarpel*, pela disponibilidade, colaboração e auxílio.

À bibliotecária da *FOSJC*, *Ângela de Brito Bellini* pela contribuição na correção do trabalho.

A *EMBRARAD* (Empresa Brasileira de Radiação), pelos serviços oferecidos na colaboração do experimento.

Aos *funcionários, AMIGOS e AMIGAS do laboratório de Microbiologia da FOSJC*, por toda cooperação na fase laboratorial.

Aos *funcionários, AMIGOS e AMIGAS do laboratório de Microbiologia da UNITAU*, por toda cooperação na fase laboratorial.

À minha querida *Tia Juracy Cardoso Jorge*, pelas constantes palavras de incentivo, essenciais na confecção do trabalho.

Aos colegas Professores da Disciplina de *Clínica Integrada III* do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté, *Dr.^a Jane Mathias Kather, Dr. Edison Tibagy Dias de Carvalho Almeida, Ms Alexandre Cursino de Moura Santos*, pelo suporte e cooperação dentro da disciplina.

Aos *colegas* de *Pós-Graduação Silvinha, Francine, Patrícia e Christian* por toda convivência durante o curso.

Aos *colegas do curso de Mestrado e Doutorado*, por todos os momentos compartilhados.

À *todas as pessoas* que colaboraram, direta ou indiretamente, para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	11
	LISTA DE QUADROS.....	13
	LISTA DE TABELAS.....	14
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	17
	RESUMO.....	19
1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1	Microbiota pulpar e periapical.....	23
2.2	Endotoxina e sua ação sobre a polpa e os tecidos periapicais.....	31
2.3	Ação antimicrobiana de irrigantes endodônticos.....	35
2.4	Ação de irrigantes endodônticos sobre lipopolissacarídeo (LPS).....	43
2.5	2.5 Ozônio.....	47
3	PROPOSIÇÃO.....	56
4	MATERIAL E MÉTODO.....	57
4.1	Avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	58
4.1.1	Semeadura dos microrganismos.....	58
4.1.2	Preparo das suspensões dos microrganismos.....	58

4.1.3	Produção de água ozonizada.....	59
4.1.4	Ação da água ozonizada em diferentes tempos.....	61
4.2	Preparo e padronização dos dentes.....	63
4.2.1	Preparo biomecânico inicial das raízes.....	63
4.2.2	Vedamento apical e impermeabilização externa das raízes.	64
4.2.3	Inclusão dos espécimes em placas de polistireno.....	64
4.2.4	Divisão das placas.....	65
4.3	Ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> inoculada no interior dos canais radiculares.....	66
4.3.1	Divisão dos grupos.....	66
4.3.2	Contaminação dos espécimes com <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> (MENEZES ⁵² , 2005).....	66
4.3.3	Coleta de confirmação de contaminação.....	67
4.3.4	Instrumentação e irrigação final dos canais radiculares dos espécimes dos grupos ozônio e controle.....	68
4.3.5	Coleta das amostras dos espécimes dos grupos ozônio e controle.....	70
4.4	Ação da água ozonizada na neutralização de LPS de <i>Escherichia coli</i> inoculado no interior dos canais radiculares.....	72
4.4.1	Preparo das placas e materiais.....	72
4.4.2	Contaminação dos canais radiculares com LPS de <i>Escherichia coli</i> (OLIVEIRA ⁶¹ , 2005).....	72
4.4.3	Divisão das placas em grupos.....	73
4.4.4	Instrumentação e irrigação final dos canais radiculares dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.....	73
4.4.5	Coleta das amostras dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.....	74

4.4.6	Verificação da neutralização de LPS de <i>Escherichia coli</i> inoculado nos canais radiculares dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.....	76
4.4.6.1	Teste do lisado de amebócito de <i>Limulus</i> (OLIVEIRA ⁶¹ , 2005).....	76
4.4.6.2	Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B (OLIVEIRA ⁶¹ , 2005).....	79
4.4.6.3	Teste ELISA.....	80
4.5	Análise estatística.....	83
4.5.1	Análise estatística da avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	83
4.5.2	Análise estatística da ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> inoculada no interior dos canais radiculares.....	83
4.5.3	Análise estatística da ação da água ozonizada na neutralização de LPS de <i>Escherichia coli</i> inoculado no interior dos canais radiculares.....	84
4.5.3.1	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i> (análise qualitativa).....	85
4.5.3.2	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i> (análise semiquantitativa).	85
4.5.3.3	Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B - Teste ELISA - imunoenzimático (análise quantitativa).....	86
5	RESULTADOS.....	87
5.1	Avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	87
5.2	Avaliação da ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> inoculados no interior dos canais radiculares.....	89

5.2.1	Crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> após primeira e segunda coleta.....	89
5.2.2	Avaliação da distribuição estatística do crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> dos grupos ozônio e controle.....	91
5.2.3	Análise do crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> após primeira e segunda coleta.....	91
5.2.4	Comparação do crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> entre a primeira e segunda coleta.....	93
5.2.5	Comparação do crescimento de <i>Candida albicans</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> entre o grupo ozônio e grupo controle, após primeira e segunda coleta.....	94
5.3	Avaliação da ação da água ozonizada na neutralização de LPS de <i>Escherichia coli</i> inoculado no interior dos canais radiculares.....	95
5.3.1	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i> (análise qualitativa).....	95
5.3.2	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i> (análise semiquantitativa).	95
5.3.3	Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B - Teste ELISA - imunoenzimático (análise quantitativa).....	98
6	DISCUSSÃO.....	102
6.1	Da escolha do tema.....	102
6.2	Da metodologia e resultados.....	105
7	CONCLUSÕES.....	114
8	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO.....	128
	APÊNDICES.....	129
	ABSTRACT.....	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Aparelho gerador de ozônio, desenvolvido no Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) Departamento de Física: a) aspecto externo do aparelho conectado ao tubo de vidro; b) aspecto interno do aparelho.....	60
FIGURA 2 -	Esquema demonstrando a avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de <i>C. albicans</i> e <i>E. faecalis</i>	62
FIGURA 3 -	Inclusão dos espécimes em placas de polistireno: a) preparo da resina acrílica quimicamente ativada na cor azul; b) placas azuis após inclusão dos espécimes.....	65
FIGURA 4 -	Instrumentação dos espécimes com lima tipo Kerr e irrigação com água ozonizada.....	69
FIGURA 5 -	Coleta das amostras dos espécimes: a) com cone de papel; b) colocação em tubo Eppendorf contendo solução fisiológica.....	70
FIGURA 6 -	Esquema demonstrando preparo dos dentes, divisão dos grupos, preparo biomecânico e coleta das amostras na ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de <i>C. albicans</i> e <i>E. faecalis</i> inoculada no interior dos canais radiculares.....	71
FIGURA 7 -	Placas com os espécimes fixados com resina vermelha dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.....	73

FIGURA 8 -	Coleta das amostras dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.....	75
FIGURA 9 -	a) Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> (Charles River Endosafe); b) água apirogênica; c) pó do Lisado.....	77
FIGURA 10 -	a) Geleificação do lisado de amebócito de <i>Limulus</i> - presença de LPS. b) sem geleificação do lisado de amebócito de <i>Limulus</i> - ausência de LPS.....	77
FIGURA 11 -	a) Células do baço de camundongo sendo maceradas; b) células do baço de camundongo sedimentadas em meio RPMI.....	79
FIGURA 12 -	Esquema demonstrando preparo dos dentes, divisão dos grupos, preparo biomecânico e coleta das amostras na verificação da neutralização de LPS de <i>E. coli</i> inoculada no interior dos canais radiculares.....	82
FIGURA 13 -	Representação gráfica dos valores médios de densidade óptica obtidos pelos grupos na primeira e segunda coleta, pelo ELISA.....	101
FIGURA 14 -	Box-Plot referentes à comparação entre grupos na primeira e segunda coleta: A) ozônio - <i>E. faecalis</i> ; B) ozônio - <i>C. albicans</i> ; C) controle - <i>C. albicans</i> ; D) controle - <i>E. faecalis</i>	129
FIGURA 15 -	Box-Plot referente aos dados da densidade óptica (DO), segundo o teste imunoenzimático - ELISA, na coleta imediata.....	131
FIGURA 16 -	Box-Plot referente aos dados da densidade óptica (DO), segundo o teste imunoenzimático - ELISA, na segunda coleta.....	131

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Confirmação de contaminação dos espécimes dos grupos ozônio e controle.....	68
Quadro 2 -	Contaminação e instrumentação dos espécimes dos grupos ozônio e controle.....	69
Quadro 3 -	Contaminação e instrumentação dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.....	74
Quadro 4 -	Esquema representativo da quantidade de LPS presente no canal radicular após cada diluição em base de dois a partir da amostra inicial.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de crescimento de <i>C. albicans</i> em UFC/mL após exposição à água ozonizada (24 mg/L O ₃) em diferentes tempos.....	87
Tabela 2 -	Número de crescimento de <i>E. faecalis</i> em UFC/mL após exposição à água ozonizada (24 mg/L O ₃) em diferentes tempos.....	88
Tabela 3 -	Número de UFC/mL para cada espécime de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Candida albicans</i> , após a primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas do grupo ozônio.....	90
Tabela 4 -	Número de UFC/mL para cada espécime de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Candida albicans</i> , após a primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas do grupo controle.....	90
Tabela 5 -	Estatística descritiva de <i>C. albicans</i> em UFC/mL após primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas dos grupos ozônio e controle.....	92
Tabela 6 -	Estatística descritiva de <i>E. faecalis</i> em UFC/mL após primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas dos grupos ozônio e controle.....	92
Tabela 7 -	Comparação das amostras de <i>C. albicans</i> e <i>E. faecalis</i> (primeira e segunda coleta) dos grupos ozônio e controle (Teste de Wilcoxon - 5% de significância - dados pareados).....	93

Tabela 8 -	Teste de comparação entre os grupos ozônio e controle (Teste de Mann-Whitney - 5% de significância - dados independentes).....	94
Tabela 9 -	Resultados em escores para cada espécime do teste lisado de amebócito de Limulus, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo ozônio/LPS.....	96
Tabela 10 -	Resultados em escores para cada espécime do teste lisado de amebócito de Limulus, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo controle/LPS.....	96
Tabela 11 -	Estatística descritiva da neutralização de LPS de <i>E. coli</i> após primeira e segunda coleta dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.....	97
Tabela 12 -	Teste de comparação entre os grupos ozônio/LPS e controle/LPS na neutralização de LPS de <i>E. coli</i> (Teste de Mann-Whitney - 5% de significância - dados independentes)	97
Tabela 13 -	Valores médios de densidade óptica (DO) apresentado por cada espécime dos grupos (primeira coleta).....	99
Tabela 14 -	Valores médios de densidade óptica (DO) apresentado por cada espécime dos grupos (segunda coleta).....	99
Tabela 15 -	Valores médios de densidade óptica (DO) $\pm$ desvio-padrão apresentados por cada grupo na primeira coleta (imediata) e representação dos grupos homogêneos.....	100

Tabela 16 - Valores médios de densidade óptica (DO) $\pm$ desvio-padrão apresentados por cada grupo na segunda coleta (após sete dias) e representação dos grupos homogêneos.....	101
Tabela 17 - Teste de normalidade dos resultados de crescimento de <i>C. albicans</i> e <i>E. faecalis</i> (Método de Anderson Darling - 5% de significância).....	129
Tabela 18 - Resultado para cada espécime do teste lisado de amebócito de Limulus, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo submetido ao tratamento endodôntico com água ozonizada (grupo ozônio/LPS).	130
Tabela 19 - Resultado para cada espécime do teste lisado de amebócito de Limulus, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo submetido ao tratamento endodôntico com solução fisiológica apirogênica (grupo controle/LPS).....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de cérebro e coração)
BSA	soro albumina bovino
Ca(OH) ₂	hidróxido de cálcio
D.O.	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
ELISA	ensaio imuno absorvente ligado à enzima
EMBRARAD	Empresa Brasileira de Radiação
h	hora
HOCl	ácido hipocloroso
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL	interleucina
ITA	Instituto Tecnológico de Aeronáutica
KGy	kilogray
LAL	lisado do amebócito de <i>Limulus</i>
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
MEV	microscópio eletrônico de varredura
MET	microscópio eletrônico de transmissão
MIC	concentração inibitória mínima
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
MS	água <i>Mitis Salivarius</i>
NaCl	cloreto de sódio

NaOCl	hipoclorito de sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
O ₂	oxigênio
O ₃	ozônio
PAF	fator ativador de plaquetas
PBS	solução fisiológica tamponada com fosfato
PBS-T	solução fisiológica tamponada com fosfato acrescida de <i>tween</i>
PGE ₂	prostaglandina E ₂
pH	potencial hidrogênio iônico
PMCC	paramonoclorofenol canforado
ppm	partes por milhão
s	segundo
spp.	espécie
SFE	solução fisiológica estéril
TNF	fator de necrose tumoral
UFC	unidade formadora de colônia
UI	unidade internacional
<i>g</i>	gravidade
° C	grau Celsius
%	porcentagem
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro

CARDOSO, M.G. **Estudo da eficiência da água ozonizada como solução irrigadora na eliminação de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e endotoxinas do canal radicular**. 2006. 132f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

RESUMO

Primeiramente foi avaliada no estudo a ação antimicrobiana da água ozonizada frente suspensão composta por *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, verificando o tempo necessário de ozonização da água para eliminação destes microrganismos. Nas próximas etapas, foi avaliada a eficiência da água ozonizada como agente irrigante, durante o preparo biomecânico, tanto na eliminação de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, assim como na neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculados no interior de canais radiculares. Foram utilizados 48 dentes humanos unirradiculados, sendo que nos canais radiculares de 24 espécimes, foram inoculados 20 µL de uma suspensão contendo *C. albicans* e *E. faecalis*, e nos outros 24 espécimes, foram inoculados 10 µL LPS de *E. coli*, verificando-se a ação da água ozonizada como agente irrigante durante o preparo biomecânico. Foram realizadas coletas das amostras (imediate e após sete dias da instrumentação), e os dados foram submetidos à análise estatística. Como resultados, pode-se observar que a ação antimicrobiana da água ozonizada por dez minutos foi efetiva frente à suspensão microbiana. Como agente irrigante durante o preparo biomecânico, a água ozonizada apresentou efetividade frente à suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares na coleta imediata, porém, na segunda coleta apresentou pouco efeito residual. Na verificação da neutralização de endotoxina, a ação da água ozonizada como agente irrigante não apresentou efetividade na neutralização de LPS de *E. coli* inoculada nos canais radiculares, sendo que quantidades restantes de LPS apresentaram efeitos biológicos. Como conclusão, a água ozonizada foi eficiente na redução de *C. albicans* e *E. faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares, mas não apresentou efeito sobre LPS de *E. coli*.

PALAVRAS-CHAVE: Ozônio; água; uso terapêutico; *Candida albicans*; *Enterococcus faecalis*; LPS de *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos e seus produtos são os principais responsáveis pelas infecções pulpares e periapicais, sendo de fundamental importância sua eliminação durante o tratamento endodôntico (SUNDQVIST⁸⁷, 1992). A principal meta do tratamento endodôntico é a eliminação de microrganismos alojados nos canais radiculares, propiciando um ambiente favorável ao reparo das lesões, levando ao sucesso da terapia. Por outro lado, a persistência de microrganismos nos canais radiculares exerce papel fundamental nos insucessos do tratamento endodôntico (SUNDQVIST et al.⁸⁹, 1998). A eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares é auxiliada pelo emprego de soluções irrigadoras, durante a execução do preparo biomecânico, e complementado pela ação da medicação intracanal (SUNDQVIST⁸⁷, 1992; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁷⁸, 1998; LIMA et al.⁴⁷, 2001), contribuindo assim para o sucesso da terapia endodôntica.

Estima-se que aproximadamente cento e cinquenta espécies de microrganismos sejam capazes de colonizar os canais radiculares, sendo responsáveis pelas lesões endodônticas, associadas à necrose pulpar. A microbiota é geralmente mista, o que dificulta a avaliação do papel desempenhado por cada espécie, assim como de possíveis interações entre elas, fato que contribui para o estabelecimento de um ambiente seletivo no interior dos canais, com predomínio de microrganismos anaeróbios (BAUMGMARTNER & FALKLER JUNIOR⁸, 1991; SUNDQVIST⁸⁶, 1992; SUNDQVIST⁸⁷⁻⁸, 1992, 1994).

Dentre as espécies de microrganismos comumente isolados de canais, principalmente em lesões refratárias, *Enterococcus*

faecalis é freqüentemente relacionado aos insucessos endodônticos, possuindo importante habilidade em penetrar nos túbulos dentinários (MOLANDER et al.⁵⁴, 1998; SUNDQVIST et al.⁸⁹, 1998; SUNDE et al.⁸⁵, 2002), o que contribui para sua sobrevivência durante o preparo biomecânico. Além disso, demonstra resistência a soluções irrigadoras, comumente utilizadas durante a terapia endodôntica.

Grande parte das infecções endodônticas é de natureza polimicrobiana, sendo que leveduras podem ser encontradas nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar. Dentre as espécies de leveduras comumente isoladas dos canais radiculares, *Candida albicans* é bastante freqüente, principalmente em lesões refratárias. *Candida albicans* possui importantes fatores de virulência, os quais podem contribuir para a patogenia das doenças perirradiculares. Microrganismos não estão restritos a luz do canal, mas no interior dos túbulos dentinários e podem reinfetar o canal se não forem eliminados.

Entretanto, é possível que, mesmo após a remoção dos microrganismos, produtos microbianos com capacidade para induzir ou manter lesões periapicais, permaneçam no sistema de canais (BARTHEL et al.⁷, 1997), predispondo o caso ao insucesso. Desta forma, durante o tratamento endodôntico de canais radiculares, não se deve apenas eliminar microrganismos, mas também inativar endotoxinas e demais produtos tóxicos. Bactérias Gram-negativas apresentam endotoxinas na membrana externa da parede celular, que são complexos lipopolissacarídicos (LPS) com potente ação citotóxica, que representam um importante fator de virulência dessas bactérias (PETSCH & ANSPACH⁶⁹, 2000), e exercem vários efeitos biológicos fundamentais no desenvolvimento de reabsorções periapicais, envolvendo osso, cimento e dentina (WANG & STASHENKO⁹⁹, 1993).

Devido à presença de microrganismos e endotoxinas no interior dos canais radiculares, faz-se necessário o preparo biomecânico

associado a soluções irrigadoras com ação antimicrobiana, e da ação da medicação intracanal específica.

Na busca de novas substâncias com ação antimicrobiana, vem crescendo nos últimos tempos a utilização de soluções com ozônio. O ozônio é um gás incolor, apresentando odor característico, com capacidade antimicrobiana. Este gás, forma radicais oxidantes na presença de água, que atuam na membrana celular, afetando o equilíbrio osmótico, causando morte de microrganismos (GARDUÑO et al.²⁴, 1995).

A presença marcante de microrganismos e endotoxinas nos canais radiculares infectados sugerem a necessidade de novos estudos que avaliem a eficiência da água ozonizada como agente irrigante durante o preparo biomecânico do tratamento endodôntico, sobre microrganismos e LPS, a fim de eliminá-los ou neutralizá-los, podendo contribuir para o estabelecimento de procedimentos terapêuticos efetivos.

Neste contexto, parece-nos oportuno o desenvolvimento de um trabalho experimental, que avalie a eficiência da água ozonizada como agente irrigante, na eliminação de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, e neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculados no interior de canais radiculares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota pulpar e periapical

A microbiota do sistema de canais radiculares e da região periapical é de natureza mista, constituída de um grupo restrito se comparada a microbiota periodontal ou mesmo a microbiota da cavidade bucal. A maioria dos casos de necrose pulpar apresenta microbiota mista, decorrente da invasão de bactérias e de suas endotoxinas, alcançando a região periapical.

Os primeiros estudos sobre o papel da microbiota associada a etiopatogenia das lesões pulpares e periapicais foram confirmados em 1965 por Kakehashi et al⁴⁰, através de pesquisas expondo polpas de molares em ratos convencionais e assépticos, à cavidade bucal. Nos animais convencionais ocorreu o desenvolvimento de inflamação crônica resultando em necrose pulpar e abscesso na região periapical, enquanto que nos animais assépticos foi observada apenas leve inflamação sem necrose pulpar e abscesso.

Em 1992, Sundqvist⁸⁶ realizou um estudo microbiológico, no qual avaliou a microbiota de canais com lesão periapical, verificando no isolamento que existe uma associação de bactérias, que contribui para o estabelecimento de um ambiente seletivo no interior dos canais radiculares. Nair⁵⁸ (1987) estudou a microbiota endodôntica utilizando microscopia de luz e eletrônica, concluindo existir neste sistema uma microbiota heterogênea, composta por cocos, bacilos, formas filamentosas e espiroquetas.

Aproximadamente cento e cinquenta espécies foram identificadas como responsáveis pelo desenvolvimento das lesões endodônticas, geralmente em interações de espécies, com a prevalência de anaeróbias estritas devido à baixa tensão de oxigênio (SUNDQVIST⁸⁷⁻⁸, 1992, 1994; GOMES et al.²⁵⁻⁶, 1996; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸², 2002). A existência de interações de microrganismos após necrose pulpar no interior dos túbulos dentinários e nos canais acessórios, parecem atuar como reservatórios, representando fontes de reinfecção do canal principal (BAUMGMARTNER & FALKLER JUNIOR⁸, 1991; SUNDQVIST⁸⁶⁻⁸, 1992 e 1994; GOMES et al.²⁵, 1996). A existência de interações microbianas dificulta a avaliação do papel desempenhado por cada espécie, assim como do efeito de possíveis combinações entre elas.

Durante a evolução da infecção pulpar ocorrem interações entre espécies microbianas, onde as condições ecológicas presentes no íntimo do sistema de canais radiculares são baseadas nas relações nutricionais (SUNDQVIST⁸⁶, 1992; GOMES et al.²⁵, 1996), favorecendo a proliferação de microrganismos capazes de metabolizar aminoácidos e peptídeos, podendo ser estas relações o elemento primordial para sobrevivência destes microrganismos.

Gomes et al.²⁸ (2004) pesquisaram a microbiota do sistema de canais radiculares de 41 dentes com necrose pulpar, e 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 presença de um biofilme bacteriano aderente à estrutura da raiz dentária próximo ao ápice radicular de dentes submetidos à cirurgia paraendodôntica, no qual o tratamento convencional não obteve sucesso foi observada por Tronstad et al.⁹¹ (1990) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde em todos os dez casos estudados foram encontradas essas estruturas amorfas recobrimdo o ápice com a presença de microrganismos, e prevalência de bactérias anaeróbias. A presença de biofilme rico em material orgânico extracelular, pode atuar como substrato bacteriano como também barreira de difusão para fármacos (via sistêmica), colaborando para o fracasso dos antimicrobianos e dificultando o tratamento endodôntico.

Segundo Akpata & Blechman³ (1982), a penetração de microrganismos nos túbulos dentinários é dependente de alguns fatores como período de infecção, espécie de microrganismo, idade do elemento dentário, entre outros. A colonização bacteriana diferiu de acordo com a localização dos túbulos dentinários nas diferentes regiões do dente, existindo maior penetrabilidade na porção radicular, com predomínio de bactérias anaeróbias estritas. Sundqvist⁸⁸ (1984) observou que a baixa tensão de oxigênio, o suplemento nutricional e a interação bacteriana compunham os fatores determinantes dessa ecologia. Todos microrganismos que colonizam a cavidade bucal podem, a princípio, invadir a câmara pulpar e o sistema de canais radiculares, ganhando acesso aos tecidos periapicais.

Enterococcus faecalis é um microrganismo comumente isolado de canais radiculares, principalmente em lesões refratárias, sendo relacionado aos insucessos endodônticos. Peciulienė et al.⁶⁷ (2000) em pesquisa realizada em pacientes da Lituânia, avaliaram a presença de microrganismos nos canais radiculares obturados, e demonstraram ocorrência de *E. faecalis* associados a lesões de periodontite apical em tratamentos endodônticos mal sucedidos, necessitando de retratamento. Dos microrganismos isolados, *E. faecalis* foi o mais freqüente (70%),

tendo sido isolado em 14 amostras, estando presente isoladamente ou associado a outras bactérias. Uma nova coleta microbiológica foi efetuada após o preparo biomecânico do canal, onde foram encontradas em sete dentes culturas positivas, sendo que *E. faecalis* estava presente em cinco delas. Os autores concluíram que canais radiculares parcialmente obturados contribuem para o insucesso da terapia endodôntica, favorecendo a presença de *E. faecalis*.

Enterococcus faecalis apresenta importante habilidade em penetrar nos túbulos dentinários (MOLANDER et al.⁵⁴, 1998; SUNDQVIST et al.⁸⁹, 1998; SUNDE et al.⁸⁵, 2002), fato que contribui para sua sobrevivência durante o preparo biomecânico, demonstrando alta resistência aos medicamentos comumente utilizados na terapia endodôntica. No ano de 2000, Waltimo et al.⁹⁸ compararam a penetração dentinária de *C. albicans* com a penetração de *E. faecalis*. O tempo necessário para penetração de *C. albicans* variou de três até 14 dias, já nos casos de *E. faecalis* a penetração nos túbulos dentinários foi de um a cinco dias, evidenciando uma rápida velocidade de penetração nos túbulos dentinários em comparação à *C. albicans*.

Love⁴⁹ (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 (*Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*), demonstrando que *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mutans* apresentaram menor e significativa fixação ao colágeno em relação ao *Enterococcus faecalis*, sugerindo que esse processo de fixação ao colágeno seja em parte responsável pela inibição da migração desses microrganismos para os túbulos dentinários.

Peciulienė et al.⁶⁸ (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. *Enterococcus 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 2,5%), foi realizada uma segunda coleta de amostras microbiológicas e foram encontrados microrganismos em dez dos 33 dentes que apresentaram cultura positiva na primeira coleta. *Enterococcus 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*. Os autores salientaram a necessidade de emprego de medicação intracanal na eliminação desta espécie, para obtenção do sucesso no retratamento endodôntico.

Rôças et al.⁷³ (2004) investigaram a prevalência de *E. faecalis* em infecções endodônticas, verificando se existe associação destes microrganismos com tipos específicos de lesão perirradicular. Foram colhidas amostras de canais não tratados com lesão perirradicular crônica assintomática, periodontite apical, abscessos e lesões refratárias ao tratamento endodôntico. *E. faecalis* estava mais associado às lesões sintomáticas que as não sintomáticas, e os autores ressaltaram que o microrganismo encontrava-se mais relacionado com lesões refratárias responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico, do que com infecções primárias.

McHugh et al.⁵¹ (2004) realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de relacionar a resistência de *E. faecalis* ao pH alcalino. Os autores concluíram que o pH de dez a 11 retarda aparentemente o

crescimento de *E. faecalis*, e que em pH acima ou igual a 11,5, este microrganismo não cresce *in vitro*.

Pinheiro et al.⁷⁰ (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 freqüente neste tipo de lesão, estando presente em mais da metade dos canais com lesão refratária.

Grande parte das infecções endodônticas é de natureza polimicrobiana, sendo que outros microrganismos, inclusive leveduras, podem ser encontrados nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar. Leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal humana, compreendendo aproximadamente duzentas espécies, sendo *Candida albicans* freqüentemente isolada da cavidade bucal, onde usualmente são denominadas de fungos oportunistas, tornando-se patogênicas ao se aproveitarem de alguma condição debilitada do hospedeiro (MURRAY et al.⁵⁶, 2000). São comumente encontradas nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar, onde na maioria dos casos está associada a outros microrganismos.

A ação *in vitro* de vários medicamentos utilizados na terapia endodôntica sobre leveduras do gênero *Candida* isolados de canais radiculares foi avaliado por Kubo et al.⁴⁵ (1997). Para verificação da sensibilidade das amostras aos medicamentos foi utilizada a técnica de formação de halos de inibição. Somente o cresophene, o tricresol formalina e a clorexidina 2% atuaram de forma efetiva sobre cepas de *Candida*.

Waltimo et al.⁹⁷ (1997) analisaram a ocorrência de leveduras em casos de periodontites apicais persistentes ao tratamento

endodôntico convencional. Avaliaram 967 amostras colhidas após desinfecção dos canais radiculares infectados, sendo que foram isoladas 48 cepas de leveduras. Na maioria das amostras, ocorreu crescimento de leveduras associadas com bactérias do canal (principalmente Gram-positivas do gênero *Streptococcus*), concluindo que as leveduras possuem um importante papel, no agravamento dos casos de periodontite apical persistente, após terapia convencional do tratamento endodôntico.

Siqueira Junior et al.⁸² (2002) utilizando-se de microscopia eletrônica de varredura (MEV) investigaram o padrão de infecção bacteriana em canais radiculares não tratados e associados à lesão periapical, onde foram observadas bactérias sempre formando comunidade heterogênea, e em um espécime dos 15 dentes avaliados foi encontrada uma célula de levedura associada a bactérias, concluindo que leveduras podem ocasionalmente infectar dentes com lesões perirradiculares.

Sunde et al.⁸⁵ (2002) identificaram a microbiota de dentes com lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico em 36 pacientes. As amostras microbiológicas 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).

Siqueira Junior et al.⁷⁶ (2004) relataram que fungos possuem importantes fatores de virulência, os quais contribuem para a patogenia das doenças perirradiculares, ressaltando o potencial de adaptação às diferentes condições ambientais, capacidade de adesão em variados tipos de superfícies, formação de biofilme e produção de enzimas histolíticas. Relataram ainda, que fungos são mais freqüentes em

lesões refratárias nos casos de insucesso do tratamento endodôntico, podendo também ser ocasionalmente encontrados nas infecções primárias. Os autores relatam ser *Candida albicans* o fungo mais prevalente neste tipo de infecção.

Chávez de Paz et al.¹⁴ (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 (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.

Seguindo a busca pela microbiota de dentes com lesão periapical refratária ao tratamento endodôntico, Adib et al.¹ (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.

2.2 Endotoxina e sua ação sobre a polpa e os tecidos periapicais

Bactérias Gram-negativas apresentam endotoxinas, as quais são responsáveis pela organização e estabilidade da membrana externa da parede celular. São complexos lipopolissacarídicos (LPS), com potente ação citotóxica, liberados durante a duplicação ou morte celular bacteriana (PETSCH & ANSPACH⁶⁹, 2000) e exercem vários efeitos biológicos fundamentais na indução e no desenvolvimento de reabsorção óssea periapical (WANG & STASHENKO⁹⁹, 1993).

As endotoxinas constituem-se de três partes quimicamente distintas: um componente lipídico não-polar denominado lipídeo A, um corpo oligossacarídico e outro heteropolissacarídico (PETSCH & ANPACH⁶⁹, 2000), sendo o lipídeo A o principal responsável pela atividade endotóxica. Estudos correlacionaram endotoxinas com as reações teciduais apicais. As endotoxinas atuam sobre os efeitos biológicos pró-inflamatórios, como ativação do sistema complemento, ativação de linfócitos, indução da síntese de prostaglandinas e leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas (MATSUSHITA et al.⁵⁰, 1999). Representam um dos principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese e na manutenção da inflamação periapical, e reabsorção óssea (PITTS et al.⁷¹, 1982; YAMASAKI et al.¹⁰⁰, 1992; MURAKAMI et al.⁵⁵, 2001; HONG et al.³⁴, 2004).

Galanos et al.²³ (1985) compararam as atividades endotóxicas do lipídeo A quimicamente sintetizado com a endotoxina natural de *Escherichia coli*, verificando que tanto o lipídeo A quimicamente sintetizado como a endotoxina natural de *Escherichia coli*, foram indistinguíveis nos testes sem exceção, apresentando ambos os mesmos tipos de atividade.

A capacidade das endotoxinas de penetrarem e se difundirem nos túbulos dentinários com rápida velocidade em relação aos

microrganismos, foi demonstrada no estudo de Alves et al.⁴ (1998). Esses autores avaliaram *in vitro* a possibilidade da endotoxina derivada de uma comunidade mista de bactérias, penetrar através do material obturador do canal radicular, antes mesmo das células bacterianas, atingindo os tecidos periapicais. Os resultados demonstraram que tanto endotoxina como bactérias penetraram através do material obturador, porém a penetração da endotoxina ocorreu mais rapidamente (média de 23 dias) do que as células bacterianas (média de 62 dias).

Oliveira et al.⁶² (2003), avaliaram *in vitro* a capacidade e o tempo necessário para a endotoxina se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento. Foi inoculada uma solução de LPS de *Escherichia coli* no canal radicular de trinta dentes, e verificada a capacidade de penetração da endotoxina nos tempos de trinta minutos, duas, seis, 12, 24, 48, 72 horas e sete dias. Os autores concluíram que a endotoxina foi capaz de se difundir pelos túbulos dentinários em direção ao cimento, atingindo a região externa da raiz a partir de 24 horas.

Dhalén & Bergenholtz¹⁵ (1980) observaram que a atividade endotóxica das amostras dos canais radiculares de dentes com polpas necrosadas estavam correlacionadas com a presença e o número de bactérias Gram-negativas.

Estudos referentes aos níveis de endotoxina na indução de processos inflamatórios foram efetuados por Pitts et al.⁷¹ (1982). O papel da endotoxina na inflamação periapical foi investigado injetando endotoxina de *Salmonella minesota* R-595 em canais radiculares de cães. A avaliação histológica evidenciou maior resposta inflamatória nos espécimes contendo endotoxinas, indicando grande participação destas na inflamação periapical e destruição óssea.

A presença de endotoxina em canais radiculares com polpa necrosada foi verificada por Horiba et al.³⁵ (1990) que estudaram a distribuição da endotoxina na parede dentinária de canais radiculares infectados em trinta dentes recém-extraídos de pacientes com diagnóstico

de periodontite apical avançada. Endotoxina foi detectada em todas as amostras obtidas dos canais radiculares infectados. O conteúdo de endotoxina foi significativamente maior nas amostras da superfície pulpar do que nas amostras da parede cementária, demonstrando elevados níveis de endotoxinas em dentes com granuloma apical.

Estudos relacionaram a quantidade de endotoxina com a sintomatologia clínica, lesões apicais radiolúcidas, lesões cariosas e inflamação de tecidos pulpares (HORIBA et al.³⁶ 1991, KHABBAZ et al.⁴¹⁻² 2000, 2001). Os resultados demonstraram elevados níveis de endotoxinas em dentes com sintomatologia dolorosa, indicando a relação da quantidade de endotoxina na patogênese da doença pulpar, e severidade da dor.

Horiba et al.³⁶ (1991) coletaram amostras de trinta canais radiculares com periodontite apical, relacionando o conteúdo de endotoxina com sintomas clínicos ou áreas radiolúcidas das tomadas radiográficas. Os resultados demonstraram que os níveis de endotoxina foram maiores em dentes com sintomatologia, exsudação, e áreas radiolúcidas, do que nos dentes sem estas características.

Khabbaz et al.⁴¹ (2000) associaram a presença de endotoxinas em lesões cariosas, associando a sintomatologia dolorosa, e verificaram maiores quantidades de endotoxinas em dentes sintomáticos em comparação com os assintomáticos. Os mesmos autores (KHABBAZ et al.⁴²) em 2001 determinaram a presença de endotoxinas em tecidos pulpares de dentes cariados, obtendo como resultado a presença de endotoxinas nos tecidos pulpares de todos os dentes, sendo significativamente maior nos dentes sintomáticos.

Lindemann et al.⁴⁸ (1988) analisaram a produção de interleucina 1 (IL-1) e do Fator de Necrose Tumoral (TNF) pelos monócitos do sangue periférico humano, ativados por bactérias periodontais (*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus aphrophilus*, *Porphyromonas gingivalis*) e por

LPS. Os autores concluíram que LPS livre ou ligado às bactérias periodontais Gram-negativas, ativam os monócitos, e que suas citocinas induzem a reabsorção óssea através dos osteoclastos.

Yamasaki et al.¹⁰⁰ (1992), em lesões periapicais de ratos, quantificaram endotoxina e identificaram bactérias Gram-negativas, concluindo que a quantidade de endotoxina nos tecidos periapicais aumentou com o passar do tempo, e que o número de bactérias Gram-negativas isoladas da mesma região não aumentou na mesma proporção.

Matsushita et al.⁵⁰ (1999) avaliaram a indução de interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, e IL-8 por LPS de espécies de *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*. Concluíram que as endotoxinas das bactérias induziram elevada resposta de IL-8 nos indivíduos do grupo com mais lesões periapicais.

Murakami et al.⁵⁵ (2001) avaliaram o papel do LPS de *Porphyromonas endodontalis* na indução de citocinas, destacando IL-1 β , e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), mediadores que apresentam importantes funções na formação e desenvolvimento de abscesso maxilofacial. Na mesma linha de pesquisa, Hong et al.³⁴ (2004) avaliaram o papel do LPS na reabsorção óssea de lesões periapicais e concluíram que o LPS presente em canais radiculares com lesões apicais induziu a síntese de IL-1 β , e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), pelos macrófagos ativados, causando efeitos biológicos pró-inflamatórios.

Jiang et al.³⁸ (2003) demonstraram que LPS exerce efeitos diretos na gênese de osteoclastos e participa no processo de reabsorção óssea. LPS pode ser neutralizado com tratamento a base de hidróxido de cálcio, com significativa redução da diferenciação de osteoclastos. Além disso, LPS, IL-1 α e IL-1 β possuem capacidade de estimular a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) pelos fibroblastos, osteoblastos e macrófagos, que constitui importante ativador de osteoclastos

(LINDEMANN et al.⁴⁸, 1988; STASHENKO et al.⁸⁴, 1991; WANG & STASHENKO⁹⁹, 1993).

Diante dos fatores etiológicos envolvidos na patogênese e na manutenção da inflamação periapical, torna-se relevante durante o tratamento endodôntico à eliminação não apenas dos microrganismos, mas também da neutralização das endotoxinas do interior dos condutos radiculares, que podem predispor o caso ao insucesso, se não forem eliminadas ou neutralizadas.

2.3 Ação antimicrobiana de irrigantes endodônticos

A principal meta do tratamento endodôntico é a eliminação de microrganismos. Para ocorrer uma sanificação do sistema de canais radiculares, durante o tratamento endodôntico, além da ação cirúrgica, 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 (PAIVA & ANTONIAZZI⁶⁴, 1973; SUNDQVIST⁸⁶, 1992; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁷⁸, 1998; LIMA et al.⁴⁷, 2001).

As soluções irrigadoras utilizadas na terapia endodôntica devem apresentar mecanismos de ação na atividade antimicrobiana, capacidade de dissolver proteínas e tecidos, baixa tensão superficial, ser de fácil manuseio e não promover injúrias aos tecidos periapicais, entre outras características (PAIVA & ANTONIAZZI⁶⁴, 1973).

O emprego do hipoclorito de sódio como solução irrigadora na terapia endodôntica tornou-se rotina em razão dos seus importantes efeitos antimicrobianos e da dissolução de tecidos necróticos. Siqueira

Junior et al.⁷⁷ (1997) relataram a efetividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, quando em contato com restos orgânicos, resultando na formação de um ácido forte (ácido hipocloroso - HOCL), com efetiva ação oxidante sobre enzimas bacterianas, devido à presença do cloro ativo, inibindo definitivamente as funções metabólicas microbianas.

Devido elevado índice de agressão aos tecidos provocados pelo hipoclorito de sódio em concentrações mais altas, outras substâncias químicas auxiliares mais biocompatíveis e com efetiva ação antimicrobiana, vêm sendo utilizadas como alternativa no tratamento endodôntico, como a clorexidina, peróxido de hidrogênio, ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Em 1994, Jeansonne & White³⁷ compararam o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio 5,25% com a clorexidina 2,0%. Como resultados, ocorreram reduções significativas no número de colônias nas culturas pós-irrigação, comprovando a eficácia de ambas soluções, não existindo diferença estatisticamente significativa entre elas.

A eficácia dos agentes irrigantes vêm sendo confirmada em vários estudos, como o de Siqueira Junior et al.⁷⁸ (1998) que avaliaram a ação de irrigantes endodônticos, frente a quatro bactérias anaeróbias Gram-negativas produtoras de pigmentos negros e quatro anaeróbias facultativas. Foram empregadas as soluções de hipoclorito de sódio 4%, 2,5%, 0,5%, clorexidina 2%, 0,2%, EDTA 17% e ácido cítrico 10%. Após sete dias, as zonas de inibição de crescimento foram medidas e os resultados demonstraram que as soluções irrigantes testadas inibiram 100% das cepas bacterianas. Os autores verificaram que a eficiência antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorexidina foi significativamente reduzida após diluições do produto. Baseado no diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano, do maior para o menor, as soluções irrigantes podem assim ser classificadas da mais eficiente para a menos eficiente, ordenadas da seguinte forma: hipoclorito

de sódio 4%, hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina 2%, clorexidina 0,2%, EDTA, ácido cítrico e finalmente hipoclorito de sódio 0,5%.

Em estudo similar, D'Arcangelo et al.¹⁶ (1999) avaliaram a ação de vários agentes irrigantes e seu efeito em diferentes concentrações, utilizando hipoclorito de sódio, clorexidina e cetrimide na eliminação de microrganismos anaeróbios obrigatórios (*Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella melaninogenica*), anaeróbios facultativos (*Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, e *Streptococcus sanguis*), microaerófilos (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados demonstraram que todos os agentes irrigantes avaliados tiveram uma efetiva ação antimicrobiana, demonstrando eficácia de todas as soluções após dez, vinte e trinta minutos de contato direto. Os autores concluíram que nos casos em que o paciente é alérgico ao hipoclorito de sódio, a clorexidina deve ser empregada como escolha, porém o hipoclorito de sódio deve ser o agente irrigante de primeira escolha pela sua alta capacidade de dissolução tecidual.

Devido às controvérsias com relação à atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio, Siqueira Junior et al.⁸⁰ (2000) compararam *in vitro* a redução do número de *E. faecalis* intracanal, proporcionada pela instrumentação associada à irrigação do canal radicular, com soluções de hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5,25% e solução salina. Foram realizadas culturas das amostras obtidas antes e após o preparo biomecânico dos canais contaminados com *E. faecalis*. Todas as soluções testadas reduziram significativamente o número de *E. faecalis* do canal radicular, não existindo diferença estatisticamente significativa nos resultados entre as soluções de hipoclorito de sódio testadas.

O tempo necessário para eliminação de *E. faecalis* depende da concentração e do tipo de agente irrigante utilizado. Gomes

et al.²⁷ (2001) compararam *in vitro* a efetividade de diferentes concentrações do hipoclorito de sódio 0,5%, 1,0%, 2,5%, 4,0% e 5,25% e duas formas de clorexidina (gel e líquida) nas concentrações de 0,2%, 1,0% e 2%, na eliminação de *E. faecalis*. Todos os agentes irrigantes testados foram efetivos na eliminação de *E. faecalis*, em diferentes períodos de contato, sendo os mais efetivos o gluconato de clorexidina gel (1% e 2%) e o hipoclorito de sódio 5,25%, com um tempo de trinta segundos, havendo diferença estatística entre as outras concentrações. Siqueira Junior et al.⁸¹ (2002) pesquisando diferentes técnicas de instrumentação, avaliaram a eficácia das técnicas e dos agentes irrigantes, como hipoclorito de sódio 2,5% e gluconato de clorexidina 2%, na redução de *E. faecalis* do interior de canais radiculares. Os autores verificaram que as técnicas foram eficientes, e as soluções empregadas reduziram significativamente o número de bactérias, não havendo diferença significativa entre os grupos.

Em decorrência da citotoxicidade apresentada pelo hipoclorito de sódio, estudos comparativos de toxicidade foram desenvolvidos comparando o hipoclorito de sódio com a clorexidina. Öncag et al.⁶³ (2003) compararam a eficácia e a eficiência antimicrobiana do hipoclorito de sódio 5,25%, clorexidina 2% e da clorexidina 0,2% + cetrímide, frente à contaminação por *E. faecalis*, e a toxicidade de cada irrigante em tecido subcutâneo de ratos. Verificou-se que a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + cetrímide foram significativamente mais efetivos do que o hipoclorito de sódio 5,25%. Pela injeção dos irrigantes testados em tecido subcutâneo de ratos, verificaram-se os efeitos tóxicos das substâncias, onde a reação inflamatória no tecido injetado com hipoclorito de sódio foi significativamente maior do que a da clorexidina 2% e da clorexidina 0,2% + cetrímide. Como conclusão final dos autores, a clorexidina 2% e a clorexidina 0,2% + cetrímide foram significativamente mais efetivas e menos tóxicas do que o hipoclorito de sódio 5,25%.

Estrela et al.²¹ (2003) avaliaram a concentração inibitória mínima (MIC) de soluções irrigadoras utilizadas na terapia endodôntica para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e uma solução de cultura mista. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio a 1% foi à solução irrigadora que apresentou melhor efeito antimicrobiano para todos microrganismos, em todos os períodos experimentais. Os autores ressaltaram a importância do hipoclorito de sódio a 1% (em baixa concentração) com suas propriedades, como efetiva ação antimicrobiana, e dissolução de tecido orgânico. A clorexidina 2% foi efetiva para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Candida albicans* em todos os períodos, não atuando entretanto em *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e solução de cultura mista.

Vianna et al.⁹⁵ (2004) compararam *in vitro* a ação antimicrobiana de diferentes concentrações de clorexidina 0,2, 1, e 2% (gel e líquida) e hipoclorito de sódio 5,25% contra bactérias, e verificaram que o tempo requerido para a solução de clorexidina 2% eliminar todos os microrganismos avaliados foi o mesmo que do hipoclorito de sódio 5,25%.

Ercan et al.²⁰ (2004) avaliaram *in vivo* a atividade antimicrobiana da solução de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 5,25% em canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical. Foram colhidas amostras bacterianas de trinta canais antes e após o preparo biomecânico. Os autores verificaram que as soluções foram efetivas na redução microbiana, podendo ser empregadas como agentes irrigantes durante o preparo biomecânico, porém a solução de clorexidina 2% foi significativamente mais efetiva.

Em estudos na determinação do efeito antimicrobiano de medicações sobre *Candida albicans*, Sen et al.⁷⁵ (1999) investigaram *in vitro* a ação antifúngica do hipoclorito de sódio e da clorexidina sobre esse microrganismo inoculado no interior de canais radiculares de 266 dentes humanos unirradiculados, por dez dias. Foi verificado crescimento

microbiano após ação das soluções de hipoclorito de sódio 1%, hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 0,12% em um, cinco e trinta minutos. Os resultados demonstraram que na presença de *smear layer*, o hipoclorito de sódio 1%, hipoclorito de sódio 5% e clorexidina 0,12% não apresentaram eficiência nos três tempos testados, mas após uma hora de tratamento, os irrigantes apresentaram ação antifúngica. Na ausência de *smear layer*, somente o hipoclorito de sódio 5% foi efetivo em um, cinco e trinta minutos, o hipoclorito de sódio 1%, e clorexidina 0,12% não foram efetivos nos três tempos testados.

Valera et al.⁹² (2001) avaliaram *in vitro* o efeito do hipoclorito de sódio 1% e de cinco medicações intracanal sobre *Candida albicans*, semeadas no interior de canais radiculares de setenta dentes humanos unirradiculados. Observou-se que o paramonoclorofenol foi efetivo em 100% das amostras; a solução de hipoclorito de sódio 1% apresentou 70% de efetividade, e as outras três medicações apresentaram menores efetividades. Siqueira Junior et al.⁸³ (2003) avaliaram *in vitro* a efetividade de medicações intracanal sobre *Candida albicans*, semeadas em setenta dentes bovinos. Após a contaminação e incubação de *C. albicans* nos canais por 14 dias, foram colocadas as medicações por uma hora, dois e sete dias, verificando-se o crescimento microbiano. Após uma hora os espécimes tratados com Ca(OH)_2 + paramonoclorofenol e com clorexidina + óxido de zinco estavam livres de microrganismos, concluindo que estas duas medicações foram as mais efetivas na eliminação sobre *C. albicans*.

Menezes et al.⁵³ (2004) avaliaram a eficiência de soluções irrigadoras e de medicações intracanal na eliminação de *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados nos canais radiculares. Foram utilizados 96 dentes humanos que foram contaminados com *C. albicans* e *E. faecalis* por sete dias. Os grupos foram divididos conforme solução irrigadora ou medicação intracanal a ser avaliada:

a) grupo 1 – solução fisiológica estéril (SFE) e pasta de

hidróxido de cálcio Ca(OH)_2

- b) grupo 2 – SFE e paramonoclorofenol canforado (PMCC);
- c) grupo 3 – SFE e tricresol formalina;
- d) grupo 4 – SFE e pasta de CaOH + PMCC;
- e) grupo 5 – SFE e paramonoclorofenol furacin;
- f) grupo 6 – hipoclorito de sódio 2,5% sem medicação intracanal;
- g) grupo 7 – clorexidina 2% sem medicação intracanal;
- h) grupo 8 – SFE sem medicação intracanal (controle).

Foram realizadas coletas de amostras microbiológicas e pôde-se observar que para *C. albicans* os grupos 8 e 3 apresentaram efetividade estatisticamente menor do que os grupos 1, 2, 4 e 5. Para *E. faecalis*, os grupos 6 e 8 foram estatisticamente menos efetivos do que os grupos 1, 2, 3, 4 e 7. Concluiu-se que Ca(OH)_2 + paramonoclorofenol foi a medicação intracanal mais efetiva na eliminação dos microrganismos e que a solução de clorexidina 2,0% foi mais efetiva frente a *E. faecalis* do que o hipoclorito de sódio 2,5%.

Menezes⁵² (2005) avaliaram a ação do laser Nd:YAG, a efetividade de soluções irrigadoras e de medicações intracanal na eliminação de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* do canal radicular. Foram utilizados 84 dentes humanos que foram contaminados com *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* por 21 dias. Os grupos foram divididos conforme tratamento antimicrobiano a ser avaliado:

- a) grupo 1 – Laser Nd:YAG por quatro vezes por sete segundos, sem medicação intracanal;
- b) grupo 2 – hipoclorito de sódio 5,25% sem medicação intracanal;
- c) grupo 3 – clorexidina gel 2% como solução irrigadora sem medicação intracanal;

- d) grupo 4 – clorexidina gel 2% como medicação intracanal;
- e) grupo 5 – clorexidina gel 2% associada ao Ca(OH)_2 como medicação intracanal;
- f) grupo 6 – Pasta de Ca(OH)_2 como medicação intracanal;
- g) grupo 7 – SFE sem aplicação de laser ou medicação intracanal (controle).

Foram realizadas coletas de amostras microbiológicas e pôde-se observar que para *C. albicans* o grupo 1 apresentou efetividade estatisticamente menor do que os grupos 2, 3, 5 e 6 na primeira coleta, e menos efetivo que os grupos 2, 4, 5, e 6 na segunda coleta. Os grupos 4 e 7 não diferiram dos demais na primeira coleta, e os grupos 3 e 7 não diferiram dos demais na segunda coleta. Para *E. faecalis*, os grupos 1 e 7 foram estatisticamente menos efetivos do que os demais grupos na primeira coleta, e menos efetivo do que o grupo 5 na segunda coleta. Os grupos 2, 3, 4 e 6 não diferiram entre si na segunda coleta. Concluiu-se que a associação de clorexidina gel 2,0% + Ca(OH)_2 é uma medicação intracanal eficiente na eliminação dos microrganismos, e que clorexidina gel 2,0%, e hipoclorito de sódio 5,25%, possuem ação semelhante contra *C. albicans* e *E. faecalis*.

2.4 Ação de irrigantes endodônticos sobre lipopolissacarídeo (LPS)

A ação antimicrobiana, tanto do hipoclorito de sódio como da clorexidina, em diferentes concentrações, vem sendo comprovada quando utilizados como agentes irrigantes de canais radiculares infectados, entretanto, poucos estudos têm se preocupado com a efetividade desses irrigantes sobre os componentes estruturais das bactérias, como por exemplo as endotoxinas (LPS). Um dos primeiros estudos da eficiência das soluções do hipoclorito de sódio na neutralização de endotoxinas foi realizado por Buttler & Crawford¹² (1982). Os autores utilizaram três concentrações do hipoclorito de sódio (0,58%, 2,7% e 5,2%), e dois tipos de endotoxinas (*Escherichia coli* w O127:B8 e *Salmonella typhosa* w 0901), na avaliação da eficiência e da eficácia desta substância. Na avaliação da eficiência utilizaram um sistema (lisado de amebócito de *Limulus*), que foi adaptado para quantificar determinado efeito de neutralização de endotoxinas com as soluções empregadas. Na avaliação da eficácia utilizaram injeção intradérmica de endotoxinas em coelhos, e endotoxinas misturada ao hipoclorito de sódio, avaliando a reação. Os resultados indicaram que em uma hora, pequenas quantidades de endotoxinas foram neutralizadas pelas diluições do hipoclorito, porém maiores quantidades de endotoxinas não foram neutralizadas pelas concentrações 0,58% e 2,7% e, na concentração de 5,2% os resultados foram inconclusivos. Os autores admitiram que a metodologia aplicada pode ter sofrido alguns problemas técnicos, interferindo nos resultados.

Barthel et al.⁷ (1997) avaliaram a ação do hidróxido de cálcio sobre LPS de *Escherichia coli*, demonstrando que a incubação do LPS de *E. coli* com o hidróxido de cálcio, resultou na perda da capacidade da endotoxina bacteriana em estimular a produção de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α). Foi verificado também, que quanto mais elevadas às

concentrações de LPS, maiores quantidades de hidróxido de cálcio foram necessárias para inativação, sugerindo clinicamente trocas periódicas do curativo de demora, em função da quantidade de LPS residual presentes no interior do sistema de canais.

Haight-Ponce et al.³³ (1999) avaliaram a presença de endotoxina (*Escherichia coli* 0111) no pó de dentina previamente tratada com hipoclorito de sódio 10% e peróxido de hidrogênio 3% por períodos de tempo de um, dez e trinta minutos. Foram utilizados neste estudo vinte dentes humanos unirradiculados anteriores e as amostras de pó de dentina foram coletadas utilizando limas tipo Kerr. A endotoxina foi diluída em concentração de 100 ng/mL. Uma microplaca foi dividida em três grupos e nos orifícios da placa foram colocados 100 µL da solução contendo o pó de dentina. Foram adicionados ao primeiro grupo 100 µL de peróxido de hidrogênio 3%, ao segundo grupo 100 µL de hipoclorito de sódio 10% e ao grupo controle 100 µL de água destilada. O teste do lisado de Limulus foi empregado para quantificar as endotoxinas presentes nas amostras de dentina. O nível de endotoxina ativa foi significativamente menor no pó de dentina tratada com hipoclorito de sódio 10% em relação à dentina tratada com peróxido de hidrogênio 3% nos tempos de um e dez minutos, enquanto os níveis de endotoxina foram menores no tempo de trinta minutos em todos os grupos experimentais.

Aibel & Stevens² (1999), avaliaram a capacidade da clorexidina na inativação de endotoxinas. Verificaram a indução de produção de IL-6 por macrófagos na presença de LPS (*Escherichia coli*), e de LPS tratado com clorexidina 1,2% por quarenta minutos, onde a endotoxina foi diluída em concentração de 150 ng/mL. O resultado da indução de produção de IL-6 por macrófagos foi mensurado pelo teste ELISA. De posse dos resultados, os autores concluíram que o tratamento

com clorexidina 1,2% causou pouca ou nenhuma inativação do LPS na sua habilidade de induzir produção de IL-6 por macrófagos.

Em 2002, Oliveira⁶⁰, avaliou a efetividade de curativos intracanal (hidróxido de cálcio, polimixina B pura ou associada ao sulfato de neomicina e hidroclotisona) na neutralização de endotoxinas. Foram utilizados 75 dentes unirradiculados, sendo que após preparo biomecânico, foi inoculada LPS de *Escherichia coli* no interior do canal radicular de sessenta dentes, que foram divididos em cinco grupos experimentais de acordo com a medicação, com 15 dentes cada. Decorridos sete dias, foi verificada a neutralização de endotoxinas, utilizando-se o método do lisado de amebócito de *Limulus*, e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os resultados demonstraram que a polimixina B associada ao sulfato de neomicina e a hidroclotisona não apresentaram efetividade neutralizadora sobre LPS de *Escherichia coli*. Já o hidróxido de cálcio foi o melhor neutralizador, seguido pela polimixina B pura.

Tanomaru et al.⁹⁰ (2003), avaliaram *in vivo* em dentes de cães, o efeito biomecânico de diferentes soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5% e digluconato de clorexidina 2%), e da medicação intracanal com hidróxido de cálcio, utilizadas no preparo biomecânico do canal radicular. Dentes pré-molares de sete cães foram contaminados com LPS de *Escherichia coli*, pelo período de dez dias. Decorrido o preparo biomecânico dos canais, e após sessenta dias de medicação intracanal, os animais foram sacrificados e os dentes extraídos onde foram avaliados os parâmetros de inflamação e reabsorção óssea. Como resultados na neutralização de endotoxinas, as soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio 1%, 2,5%, 5% e digluconato de clorexidina 2%) não inativaram os efeitos da endotoxina em induzir resposta inflamatória com reabsorção óssea na região periapical de cães, enquanto a medicação intracanal de espera com hidróxido de cálcio por sessenta dias

apresentou eficiente atividade em inativar os efeitos causados pelas endotoxinas.

Oliveira⁶¹ (2005) avaliou a efetividade das soluções de hipoclorito de sódio, clorexidina, hidróxido de cálcio e polimixina B, como agentes irrigantes na neutralização de endotoxinas nos canais radiculares. Foram utilizados 98 dentes unirradiculados, onde foi inoculada LPS de *Escherichia coli* no interior do canal radicular de 84 dentes. Após 24 horas, os espécimes foram instrumentados até a lima K 50, escalonados até K 80, e divididos em sete grupos experimentais de acordo com a solução irrigadora, com 14 dentes cada. Foram realizadas duas coletas do conteúdo do canal radicular para verificar a neutralização de LPS; a primeira logo após a instrumentação (coleta imediata), e a segunda após o período de sete dias. A neutralização foi verificada utilizando-se o método do lisado de amebócito de *Limulus*, e produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Os resultados demonstraram que na coleta imediata o hipoclorito de sódio 2,5%, 5,25%, e clorexidina 2% não apresentaram efetividade sobre LPS. As soluções de hidróxido de cálcio e polimixina B, neutralizaram LPS. Na segunda coleta após sete dias, foi detectada presença de endotoxina nos grupos do hidróxido de cálcio e polimixina B, sendo significativamente inferior à apresentada pelos grupos do hipoclorito de sódio 2,5%, 5,25%, e clorexidina 2%. O autor concluiu que as soluções de hipoclorito de sódio e clorexidina não apresentaram efetividade sobre LPS, somente as soluções de hidróxido de cálcio e polimixina B reduziram significativamente a quantidade de LPS presentes nos canais radiculares.

Como evidenciado, microrganismos e seus produtos (endotoxinas) estão envolvidos na etiologia das reações inflamatórias do periápice dentário, com importante papel na indução da reabsorção óssea. Sendo assim, durante o tratamento endodôntico, deve ser avaliada a ação de novos agentes irrigantes no processo de sanificação dos

canais, eliminando microrganismos e neutralizando endotoxinas, sem causar injúrias aos tecidos periapicais.

2.5 Ozônio

Na busca de novas substâncias com ação antimicrobiana, vêm crescendo nos últimos tempos o desenvolvimento de pesquisas com ozônio. O ozônio (O_3) 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. Este gás é encontrado de forma natural nas camadas superiores da atmosfera, denominada camada de ozônio, que fica aproximadamente entre 25 e 35 quilômetros de altura, com importante papel de absorver a radiação ultravioleta dos raios solares, extremamente prejudiciais ao homem (GARDUÑO et al.²⁴, 1995). O ozônio pode ser produzido por geradores, sendo que o método de produção é realizado através da associação de um átomo de oxigênio com uma molécula de O_2 , expressa por $O + O_2$, formando o ozônio (O_3). Esta molécula instável pode ser gerada pela passagem de uma descarga elétrica através do oxigênio puro (BRADY & HUMISTON¹⁰, 1996; KIRCHHOFF⁴³, 2002).

A trajetória dos processos de construção de aparelhos utilizados na produção de ozônio deu-se a partir de 1857, onde Werner von Siemens desenhou um gerador de ozônio a partir de um aparelho cilíndrico dielétrico, e Oudshoorn em 1893, construiu o primeiro projeto na Holanda (DEINNINGER et al.¹⁷, 1998). O ozônio é um agente oxidante poderoso, tendo uma alta instabilidade, característica a qual impede sua armazenagem, tornando-se necessária sua geração *in situ*, ou seja, deve ser produzido no local de aplicação, necessitando assim do gerador e do sistema de ar processado ou oxigênio.

Dentre os processos utilizados para a geração de ozônio, o método de descarga dielétrica por efeito corona, vêm sendo atualmente utilizado em praticamente todos os ozonizadores disponíveis industrialmente. Através deste método, o ozônio é gerado pela passagem de oxigênio puro entre dois eletrodos, a uma elevada diferença de potencial elétrico, causando dissociação de oxigênio, sendo a formação do ozônio consequência da recombinação de espécies radiculares de oxigênio com moléculas de oxigênio presentes no sistema (KUNZ et al.⁴⁶, 1999). A concentração do ozônio vai depender da composição do gás empregado na produção (O₂ ou ar), frequência, fluxo de distribuição do sistema e voltagem aplicada nos eletrodos. Velano⁹³ (2001) e Hass & Kayamak³² (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, expostos a água ozonizada (BAYSAN et al.⁹ 2000).

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.²⁴, 1995; OIZUMI et al.⁵⁹, 1998; VELANO et al.⁹³, 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.⁷⁴, 1994).

O ozônio pode apresentar efeito maléfico, dependendo de sua concentração, tempo de exposição, e da capacidade do metabolismo celular do organismo para regular a produção de radicais livres, que são capazes de produzir danos às moléculas biológicas (CALDERON-

GUZMÁN et al.¹³, 2000). Quando inalado em altas concentrações pode produzir danos com conseqüências prejudiciais à saúde como deficiências neurológicas, fadiga, cefaléia e insônia (PAZ ⁶⁶, 1997). O padrão Nacional de Qualidade do Ar recomenda que em locais fechados onde se gera ozônio, não se deve permanecer por mais de oito horas.

Em estudos abrangendo aerobiologia, Villegas et al.⁹⁶ (1995) relataram em pesquisas na cidade do México, considerado como região de máxima contaminação de ozônio atmosférico, a influência do ozônio na população microbiana encontrada no ar da cidade. Foram comparadas amostras do ar em dias de alta e baixa concentração de ozônio, onde os autores concluíram que quanto maior a concentração de ozônio, menor é a diversidade e quantidade destes microrganismos. Ainda em aerobiologia, Brook et al.¹¹ (2002) afirmaram que a inalação dentro de um meio ambiente urbano, de partículas de ar poluído e ozônio em concentrações bastante elevadas, pode causar danos a saúde de indivíduos saudáveis, em conseqüência da vasoconstrição arterial aguda provocada por estas partículas altamente concentradas.

Anderson et al.⁵ (2001) investigaram se mudanças na concentração do ozônio no ambiente, poderiam estar associadas ao quadro clínico de asma em indivíduos, e constataram que o aumento da exposição ao ozônio, associado a fatores aeroalergênicos ambientais (pólen, fungos), pode resultar na exacerbação dos sintomas da asma. Estudos das mudanças que ocorrem nos mediadores inflamatórios no pulmão humano, em dependência do tempo à exposição a 0,4 ppm por duas horas do ozônio foram realizados por Devlin et al.¹⁸ (1996), concluindo que esta exposição, elevou os níveis dos mediadores inflamatórios após a primeira hora de exposição.

Em vários países da Europa, há mais de oitenta anos, o ozônio é empregado no tratamento de água potável (BARROS & FIORINI⁶, 2000). Paraskeva et al.⁶⁵ (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.

Deininger et al.¹⁷ (1998) relataram o emprego do ozônio no tratamento de água da cidade de Ann Arbor (Michigan, USA) na inativação de microrganismos, inclusive vírus, comparando com outros tipos de desinfetantes, como o cloro, cloraminas, e dióxido de cloro, sendo que com o emprego destes desinfetantes, seriam necessárias altas doses, que causariam maiores concentrações de subprodutos. O ozônio foi o desinfetante mais potente e de ação mais rápida, na inativação de vírus e outros microrganismos, como por exemplo, *Cryptosporidium*.

Jyoti & Pandit³⁹ (2004) relataram que o ozônio é um oxidante poderoso, que pode ser utilizado na desinfecção da água, sendo bem menos tóxico que o cloro, devido a menor formação de subprodutos, na eliminação de coliformes totais e coliformes fecais.

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.⁷² (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.³¹ (2004) relataram o emprego do ozônio como agente antimicrobiano, utilizado na higiene de superfície de frutas e vegetais, aumentando a validade dos produtos.

Güzel-Seydim et al.³⁰ (2004) pesquisaram a eficácia do ozônio, verificando a redução da população bacteriana (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas), na presença de gordura, proteínas, e carboidratos, exposto ao ozônio a 0,4 ppm por dez minutos, registrando a eficiência deste gás frente à população bacteriana, podendo este ser empregado na indústria alimentícia.

Komanapalli & Lau⁴⁴ (1998) pesquisaram *in vitro* o emprego da água ozonizada exposta a 600 ppm de ozônio, sobre suspensão de microrganismos contendo Bacteriófago lambda, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, resultando na inativação completa do Bacteriófago em cinco minutos de exposição, enquanto a viabilidade de *Escherichia coli* continuou inalterada. Após quarenta minutos de exposição, foram inativadas concentrações celulares de 10^4 de *Candida albicans* e de 10^5 de *Escherichia coli*. Os autores concluíram, que fatores como tempo de exposição dos microrganismos ao ozônio, diferença da permeabilidade da membrana celular, e do meio associado em que estes estão presentes, podem alterar a ação do ozônio em cada microrganismo, ocorrendo de maneira diferente.

Velano et al.⁹³ (2001) pesquisaram *in vitro* o efeito antibacteriano da água ozonizada, sobre *Staphylococcus aureus*, com concentrações variando de 10^6 a 10^{16} microrganismos/mL. Os resultados demonstraram que o tempo máximo para inativação total das bactérias tratadas com água previamente ozonizada (0,6 mg/mL O_3) foi de cinco minutos e 25 segundos. Ressalta-se ainda neste estudo, que na metodologia empregada, a quantidade de ozônio transferida à água pelo borbulhamento, proporcionou condições fundamentais para a efetividade da solução.

Velano et al.⁹⁴ (2002) avaliaram *in vitro* a atividade antibacteriana da água ozonizada em *Escherichia coli*. Foram preparadas suspensões de concentrações variando de 10^8 a 10^{13} UFC/mL. De cada suspensão foi retirado 1 mL e adicionado a 99 mL de água destilada estéril em reator de cristal. Os resultados demonstraram que o tempo máximo para inativação total de *Escherichia coli* em água previamente ozonizada (0,6 mg/mL O_3) foi de dois minutos e trinta segundos. Diao et al.¹⁹ (2004) verificaram a ação antimicrobiana do ozônio a 0,4 ppm frente à água contaminada por cultura de *Escherichia coli*, onde foi observada a lise celular por meio de microscopia eletrônica de varredura.

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 das espécies microbianas encontradas na cavidade bucal (BARROS & FIORINI⁶, 2000), e como método de desinfecção de próteses (OIZUMI et al.⁵⁹ 1998).

Rodriguez et al.⁷⁴ (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. O óleo de girassol ozonizado foi também empregado no tratamento da alveolite. Guerra et al.²⁹ (1997) compararam este medicamento com um método tradicional (Alvogil + antibiótico por via oral). O critério de cura foi tomado em conta da formação do tecido de cicatrização e da diminuição e eliminação da dor. Os resultados demonstraram cura nos dois grupos, sem diferença significativa entre eles, porém os indivíduos do grupo que utilizaram óleo de girassol

ozonizado não necessitaram fazer uso de antibiótico por via oral. O emprego de óleo de girassol ozonizado, tanto no tratamento da gengivoestomatite herpética aguda quanto no tratamento de alveolite, mostrou-se eficaz, devido suas propriedades antimicrobianas com alto poder de oxigenação dos tecidos, estimulando a regeneração tecidual.

Faria et al.²² (2005) avaliaram os efeitos oxidativos da água ozonizada (3,3 mg/ml O₃) frente 49 cepas de *Candida albicans* recém isoladas da saliva e cepas padrão (ATCC 18804). Foram preparadas suspensões na concentração de 5 X10⁸ células/mL, que foram submetidas água ozonizada pelos tempos de vinte, quarenta, sessenta, oitenta, cem, cento e vinte, cento e quarenta, cento e sessenta, cento e oitenta e trezentos segundos. Os resultados demonstraram redução de *Candida albicans* nas suspensões, e que a completa inativação ocorreu após trezentos segundos de exposição à água ozonizada.

Estudos em periodontia constataram o efeito da água ozonizada sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus viridans* no biofilme dentário supragengival. Garduño et al.²⁴ (1995) estudaram os efeitos de bochechos da água ozonizada, na redução de *Streptococcus mutans* do biofilme dentário. Os resultados indicaram que os efeitos dos bochechos com a água ozonizada reduziram *Streptococcus mutans* do biofilme dentário, sendo que quanto maior o tempo de exposição, maior redução bacteriana. Na mesma linha, Barros & Fiorini⁶ (2000) compararam os efeitos antimicrobianos do gluconato de clorexidina a 0,12% com a água ozonizada na concentração de 4,5 mg/L O₃, na redução de *Streptococcus viridans* do biofilme dentário supragengival. Os autores concluíram que a clorexidina mostrou-se mais efetiva, enquanto a água ozonizada apresentou resultados variados, necessitando portanto de novas pesquisas, com o objetivo de determinar a concentração ideal de ozônio a ser borbulhado na água, na redução de microrganismos do biofilme dentário supragengival.

Em dentística restauradora, Baysan et al.⁹ (2000), avaliaram os efeitos antimicrobianos da água ozonizada sobre lesões primárias de cárie radicular, frente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus 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 *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* das amostras das lesões primárias de cárie radicular, em dez e vinte segundos de tratamento pela água ozonizada, em comparação as amostras do grupo controle. A aplicação do ozônio pelo período de dez segundos na saliva humana, também resultou na redução dos microrganismos testados.

Em endodontia, Siqueira Junior et al.⁷⁹ (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 as pastas de hidróxido de cálcio associado à glicerina, ao hidróxido de cálcio associado 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), foram ineficazes em inibir o crescimento de várias espécies bacterianas anaeróbias estritas e facultativas.

Nagayoshi et al.⁵⁷ (2004), avaliaram o efeito antimicrobiano da água ozonizada como agente irrigante durante o preparo biomecânico da terapia endodôntica, sobre *E. faecalis* e *S. mutans* inoculados no interior dos canais radiculares de dentes bovinos. Após irrigação com

água ozonizada (4 mg/L O₃), a viabilidade de *E. faecalis* e *S. mutans* inoculados no interior dos canais radiculares, diminuiu significativamente, sugerindo que a água ozonizada pode ser empregada como agente irrigante durante a terapia endodôntica.

Várias soluções têm sido utilizadas como irrigantes endodônticos, entretanto, a ação da solução irrigadora de água ozonizada sobre microrganismos e LPS durante o preparo biomecânico do canal radicular, ainda não está bem estabelecida.

A presença marcante de microrganismos e endotoxinas nos canais radiculares infectados sugerem a necessidade de novos estudos que avaliem a eficácia da água ozonizada, sobre os microrganismos e endotoxinas, a fim de eliminá-los ou neutralizá-los, podendo contribuir para o estabelecimento de procedimentos terapêuticos efetivos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência da água ozonizada como agente irrigante, durante o preparo biomecânico, na eliminação de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e na neutralização de LPS de *Escherichia coli*, inoculados no interior dos canais radiculares.

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP (Anexo A), sob protocolo nº 095/2004-PH/CEP

Para facilitar a compreensão e entendimento do trabalho, a metodologia foi dividida nas seguintes fases:

- a) avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.
- b) ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares.
- c) ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado no interior dos canais radiculares.

4.1 Avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*

4.1.1 Semeadura dos microrganismos

Os procedimentos a seguir foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar (Veco, Piracicaba, SP, Brasil), a qual foi primeiramente submetida à desinfecção com álcool 70% e incidência de luz ultravioleta durante trinta minutos. Os materiais e instrumentais utilizados foram todos esterilizados. Foi utilizada cepa de *Candida albicans* (F-72) isolada de paciente com estomatite por prótese total, e cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), que foram previamente cultivadas em caldo Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) e caldo TSB (*Tryptic Soy Broth* - Difco, Detroit, USA) respectivamente, por 48 horas. A seguir, a partir da cultura em caldo, as cepas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco, Detroit, USA) para *C. albicans* e ágar *Mitis Salivarius* (Difco, Detroit, USA) para *E. faecalis*. As placas contendo *C. albicans* foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas e as placas contendo *E. faecalis* foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 48 horas.

4.1.2 Preparo das suspensões dos microrganismos

Após crescimento dos microrganismos, foram preparadas suspensões de cada microrganismo, em tubos com 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,9%), baseando-se na escala de Mac Farlane (15×10^8 células/mL). A seguir, as suspensões de *C. albicans* e *E.*

faecalis foram misturadas em um único tubo, obtendo-se uma suspensão com os dois microrganismos. A partir da suspensão, foram obtidas diluições decimais e alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^1 até 10^8 foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e ágar *Mitis Salivarius*, em duplicata, e incubadas durante 48 horas a 37°C em estufa microbiológica para *C. albicans* e estufa de CO₂ 5% para *E. faecalis*. A seguir foram calculadas as UFC/mL dos microrganismos presentes na suspensão.

4.1.3 Produção de água ozonizada

Foi utilizado um gerador de ozônio (Ozone, modelo MVO-UV, marca ANCEROS), desenvolvido no Departamento de Física do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA). O ozônio neste sistema foi gerado pela ação de corrente elétrica sobre as moléculas de oxigênio de alta pureza, fornecido por um cilindro contendo válvula redutora com manômetro, dimensionado para 0,4 L/min de O₂. Para produção da água ozonizada, foi colocado 250 mL de água destilada autoclavada em um sistema com tubo de vidro acoplado ao gerador de ozônio, no qual foi borbulhado o gás na água, produzindo assim 24 mg/L de O₃ (concentração do ozônio).

Para assegurar a esterilização e limpeza do sistema, foi ozonizado o volume de 250 mL de água destilada autoclavada contida no tubo de vidro, por vinte minutos. Após este tempo, esta água foi desprezada, e igual volume foi recolocado no tubo de vidro acoplado ao gerador de ozônio, para produção da água a ser utilizada no experimento.



FIGURA 1 - Aparelho gerador de ozônio, desenvolvido no Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) Departamento de Física: a) aspecto externo do aparelho conectado ao tubo de vidro; b) aspecto interno do aparelho.

4.1.4 Ação da água ozonizada em diferentes tempos

Na produção da água ozonizada, foram colocados 250 mL de água destilada autoclavada em um tubo de vidro, que recebeu tratamento com ozônio por até trinta minutos, na concentração de 24 mg/L O₃. Após os tempos de cinco, dez, quinze, vinte, vinte e cinco, e trinta minutos de ozonização, 9 mL da água ozonizada foram retiradas do sistema do tubo de vidro com auxílio de seringa apirogênica de 20 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) e sonda de aspiração traqueal nº 16 (Embramed, São Paulo, SP, Brasil) acoplada ao sistema do tubo de vidro, e colocadas em seis tubos de ensaio, contendo em cada tubo 1 mL da suspensão de microrganismos (15×10^8 células/mL), totalizando 10 mL. Após 15 minutos, foi adicionado a cada tubo 1 mL de tiosulfato de sódio a 0,01 M para inativação do ozônio. Alíquotas de 0,1 mL de cada tubo foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose e ágar *Mitis Salivarius*. Após 48 horas foi realizada a verificação do crescimento dos microrganismos, sendo que colônias características de *C. albicans* e *E. faecalis* foram contadas (UFC/mL) e confirmadas através do método de coloração de Gram e microscopia de luz. Para as próximas fases do trabalho, foi utilizado o tempo padrão de vinte minutos de ozonização da água, referente ao tempo de dois tubos acima do último em que ocorreu crescimento microbiano (tubo de cinco minutos).

Para facilitar o entendimento, os passos realizados na avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis*, estão sumarizados na Figura 2.

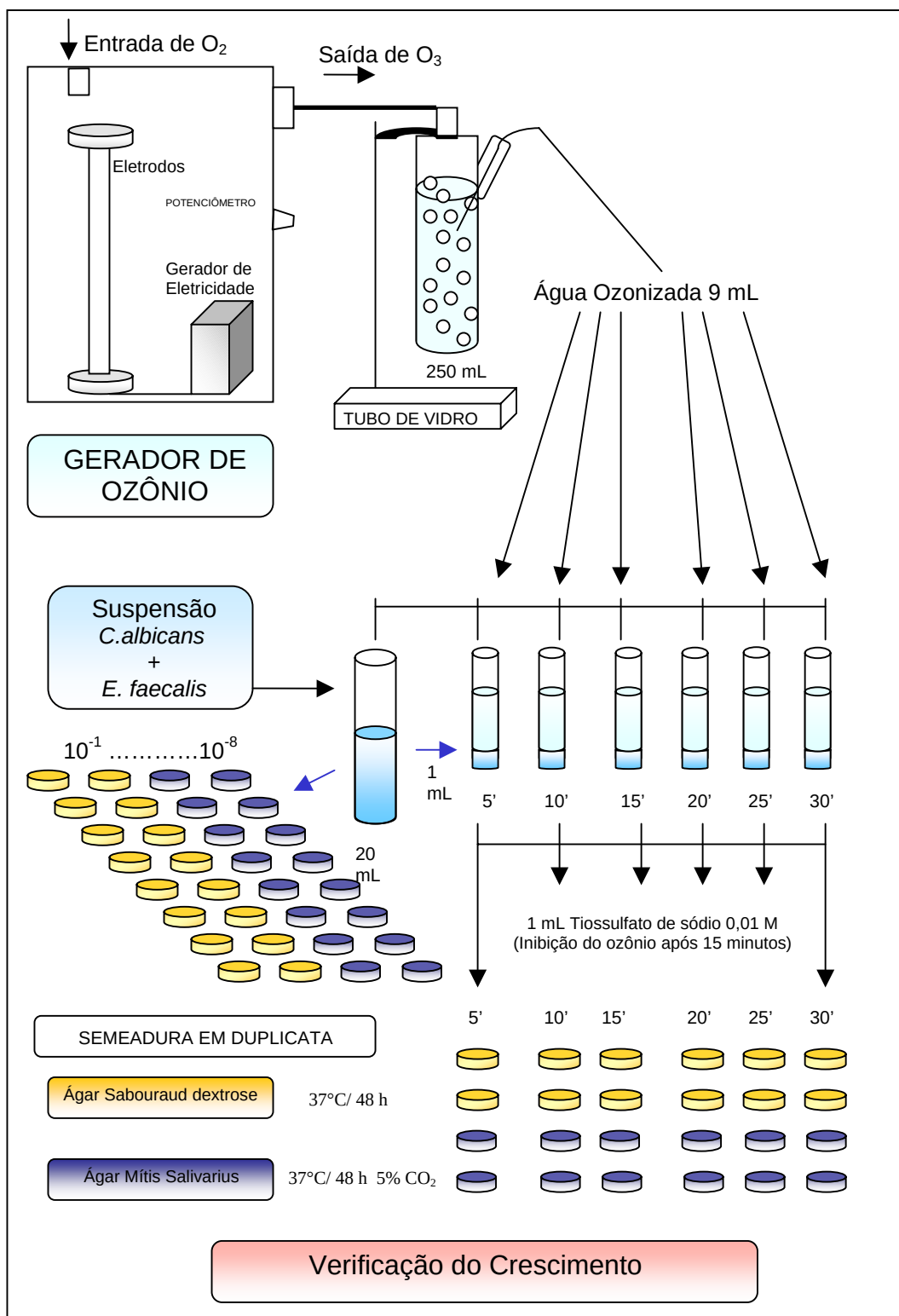


FIGURA 2 - Esquema demonstrando a avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis*.

4.2 Preparo e padronização dos dentes

Para dar início as próximas fases do trabalho, foi primeiramente necessário realizar os procedimentos de preparo e padronização dos dentes. Foram utilizados 48 dentes humanos, unirradiculados (incisivo central superior), provenientes do acervo do Banco de Dentes do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté. Os dentes permaneceram 24 horas em solução de formol a 10% para desinfecção e fixação da matéria orgânica, e posteriormente, foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso.

As coroas foram seccionadas com disco de carborundum (Carbodont - Gysi S.A., Buenos Aires, Argentina) acoplados a um mandril em micromotor, próximo à junção cimento-esmalte, padronizando o tamanho dos espécimes em aproximadamente 14 mm.

4.2.1 Preparo biomecânico inicial das raízes

Foram utilizadas brocas Gates-Glidden nº 3 para preparo da região de entrada do conduto (3 mm). A partir da localização do canal radicular e forame apical com uma lima tipo Kerr (K) nº 10 (Maillefer - S.A., Swiss), foi realizada a instrumentação seriada inicial dos canais radiculares. Raízes com diâmetro menor que a lima K nº 10, ou maior que a lima K nº 20 foram descartadas. O preparo biomecânico foi realizado desde o diâmetro anatômico do canal até a lima K nº 35. Os canais foram irrigados com 3 mL de solução de hipoclorito de sódio a 1% (Farmácia de Manipulação Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) a cada troca de instrumento, sendo a irrigação realizada com auxílio de seringa apirogênica de 5 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) com agulha apirogênica 20 X 5,5 mm (BD, PR, Brasil). Após instrumentação inicial e preparo dos

condutos, os canais radiculares foram preenchidos com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% (Farmácia de Manipulação Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) por 3 minutos, seguido de irrigação final com 5 mL de solução fisiológica.

4.2.2 Vedamento apical e impermeabilização externa das raízes

Em seguida, foi realizado vedamento da região apical, utilizando-se resina composta fotopolimerizável (Z-100 - 3M, Sumaré, SP, Brasil). A impermeabilização externa das raízes foi realizada com auxílio de um pincel, com duas camadas de adesivo epóxi Araldite (Brascola, Taboão da Serra, SP, Brasil), exceto a região cervical de abertura da entrada do canal.

Após o preparo biomecânico inicial, vedamento da região apical, e impermeabilização externa das raízes, todos os espécimes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

4.2.3 Inclusão dos espécimes em placas de polistireno

Os procedimentos a seguir foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar conforme item 4.1.1. Todos os 48 espécimes foram distribuídos aleatoriamente em quatro placas de polistireno de 24 poços (Costar, New York, USA), com 12 espécimes em cada placa, fixados nos poços mais externos (borda) com resina acrílica quimicamente ativada (Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil), recobrando os espécimes em aproximadamente 10 mm a partir do ápice. Foi empregada resina acrílica da cor azul na fixação dos espécimes em duas placas, e resina da cor vermelha nas outras duas. Após fixação

dos espécimes, as quatro placas (duas azuis e duas vermelhas) foram fechadas, seladas com fita adesiva e embaladas em papel kraft.



FIGURA 3 - Inclusão dos espécimes em placas de polistireno: a) preparo da resina acrílica quimicamente ativada na cor azul; b) placas azuis após inclusão dos espécimes.

4.2.4 Divisão das placas

As duas placas azuis foram empregadas na ação antimicrobiana da água ozonizada sobre *C. albicans* e *E. faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares, e as duas placas vermelhas na ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *E. coli* inoculado no interior dos canais radiculares.

4.3 Ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares

4.3.1 Divisão dos grupos

Nas duas placas azuis empregadas na ação antimicrobiana da água ozonizada sobre *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares, contendo os espécimes devidamente preparados, foi realizada uma divisão aleatória, sendo que uma placa originou o grupo 1 (grupo ozônio), e a outra placa o grupo 2 (grupo controle). Todos procedimentos a seguir foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar.

4.3.2 Contaminação dos espécimes com *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* (MENEZES⁵², 2005).

Foi preparada uma suspensão contendo os microrganismos (*C. albicans* e *E. faecalis*), obtidos conforme descritos nos itens 4.1.1 e 4.1.2, para ser empregada na contaminação dos espécimes. Após preparo, 20 µL da suspensão de microrganismos foram inoculados nos canais radiculares dos espécimes dos grupos ozônio e controle com auxílio de micropipeta automática, e fechados com bolinha de algodão estéril na entrada dos canais. Em seis poços do centro das duas placas, foram colocados chumaços de algodão umedecidos em água destilada autoclavada, para que fosse mantida a umidade das mesmas. As placas foram fechadas e vedadas com fita adesiva, incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 21 dias. Durante este período, foi adicionado após 24 horas da contaminação, e depois de três em três dias, meio de

cultura TSB (*Tryptic Soy Broth* - Difco, Detroit, USA) no interior dos canais radiculares de todos os espécimes, com auxílio de seringa de insulina (Injex, Ourinhos, SP, Brasil), e água destilada nos poços que continham os chumaços de algodão com auxílio de micropipeta.

4.3.3 Coleta de confirmação de contaminação

Após 21 dias da contaminação, foi realizada coleta de confirmação de contaminação do interior dos canais contaminados dos dois grupos. Foram utilizados para coleta das amostras microbiológicas, cones de papel esterilizado número trinta e cinco (Tanariman, Manacapuru, AM, Brasil), que foi colocado e deixado no interior do canal radicular por um minuto. Os cones retirados dos canais foram colocados no interior de tubos de polipropileno do tipo Eppendorf contendo 1 mL de solução fisiológica esterilizada, agitados por trinta segundos em agitador de tubos (Vortex Ap 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) e alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e ágar *Mitis Salivarius*.

As placas de ágar Sabouraud dextrose para crescimento de *C. albicans* foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C, e as placas de ágar *Mitis Salivarius* para crescimento de *E. faecalis*, foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. Após 48 horas foi realizada a verificação do crescimento dos microrganismos, e contadas as colônias (UFC/mL) de *C. albicans* e *E. faecalis*, confirmando assim a contaminação dos canais radiculares de todos os espécimes após 21 dias.

Quadro 1 - Confirmação de contaminação dos espécimes dos grupos ozônio e controle

GRUPOS	Contaminação Suspensão de microrganismos	Confirmação da Contaminação (após 21 dias)
Grupo 1 - Ozônio 12 espécimes	Suspensão de <i>C. albicans</i> + Suspensão de <i>E. faecalis</i>	Positiva - 100% <i>C. albicans</i> e <i>E. faecalis</i>
Grupo 2 - Controle 12 espécimes	Suspensão de <i>C. albicans</i> + Suspensão de <i>E. faecalis</i>	Positiva - 100% <i>C. albicans</i> e <i>E. faecalis</i>

A coleta de confirmação de crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis* inoculados no interior dos canais radiculares, obteve o valor médio de 6×10^4 UFC/mL nos espécimes dos grupos ozônio e controle.

4.3.4 Instrumentação e irrigação final dos canais radiculares dos espécimes dos grupos ozônio e controle

Após confirmação de contaminação, os canais dos dois grupos foram instrumentados até a lima K nº 50 e escalonados até a lima K nº 80, sendo empregado no preparo biomecânico um conjunto de limas para cada dois espécimes. A cada troca de instrumento foi utilizado 3 mL do agente irrigante correspondente ao grupo. No grupo ozônio foi empregada água ozonizada por vinte minutos como agente irrigante durante todo preparo biomecânico, e no grupo controle foi empregada solução fisiológica estéril como agente irrigante. A irrigação foi realizada com auxílio de seringa apirogênica de 5 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) com agulha apirogênica 20 X 5,5 mm (BD, PR, Brasil), e a aspiração com

agulha metálica 20/30 acoplada a um intermediário unido à mangueira da bomba a vácuo.

Quadro 2 - Contaminação e instrumentação dos espécimes dos grupos ozônio e controle

GRUPOS	CONTAMINAÇÃO	Preparo biomecânico final Agente irrigante
Grupo 1 - Ozônio 12 espécimes	Suspensão de <i>C. albicans</i> + Suspensão de <i>E. faecalis</i>	Água ozonizada por 20 minutos
Grupo 2 - Controle 12 espécimes	Suspensão de <i>C. albicans</i> + Suspensão de <i>E. faecalis</i>	Solução fisiológica estéril

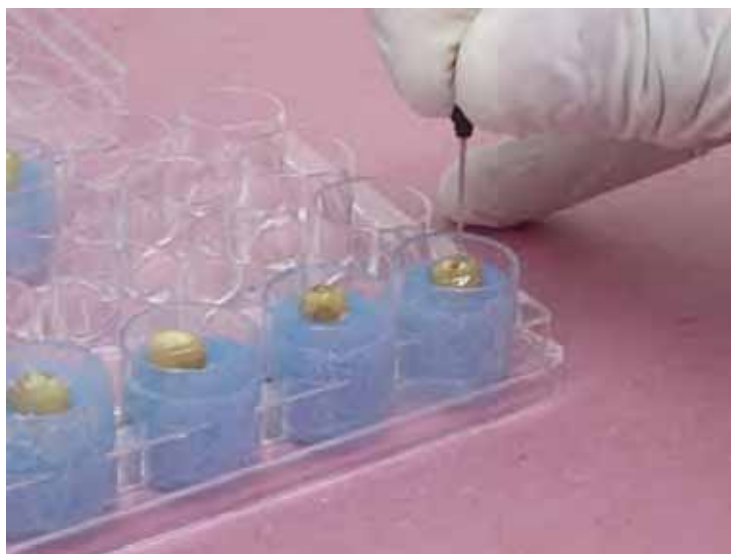


FIGURA 4 - Instrumentação dos espécimes com lima tipo Kerr e irrigação com água ozonizada.

4.3.5 Coleta das amostras dos espécimes dos grupos ozônio e controle

Imediatamente após o término da instrumentação foi realizada a primeira coleta do interior dos canais radiculares, com cone de papel estéril número cinquenta que foi colocado e deixado no interior do canal radicular por um minuto e repetidos os procedimentos anteriormente descritos no item 4.3.3. Após 48 horas foi verificado o crescimento dos microrganismos, sendo que as colônias de *C. albicans* e *E. faecalis* foram contadas (UFC/placa), e confirmadas através do método de coloração de Gram e microscopia de luz. Após coleta imediata, foi colocada bolinha de algodão embebida em água ozonizada na entrada dos canais do grupo ozônio, e bolinha de algodão embebida em solução fisiológica estéril na entrada dos canais do grupo controle. As placas foram incubadas novamente pelo período de sete dias a 37°C em estufa microbiológica. Após este período, novas amostras foram coletadas (segunda coleta), com os mesmos procedimentos e cuidados da primeira coleta, e foi verificada a permanência de microrganismos viáveis no interior dos canais radiculares decorridos sete dias da instrumentação final.

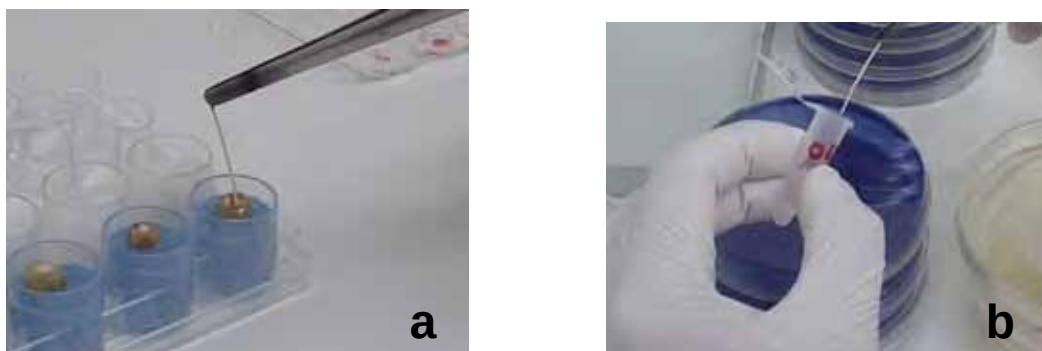


FIGURA 5 - Coleta das amostras dos espécimes: a) com cone de papel; b) colocação em tubo Eppendorf contendo solução fisiológica.

Os procedimentos realizados na ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares estão sumarizados na Figura 6.

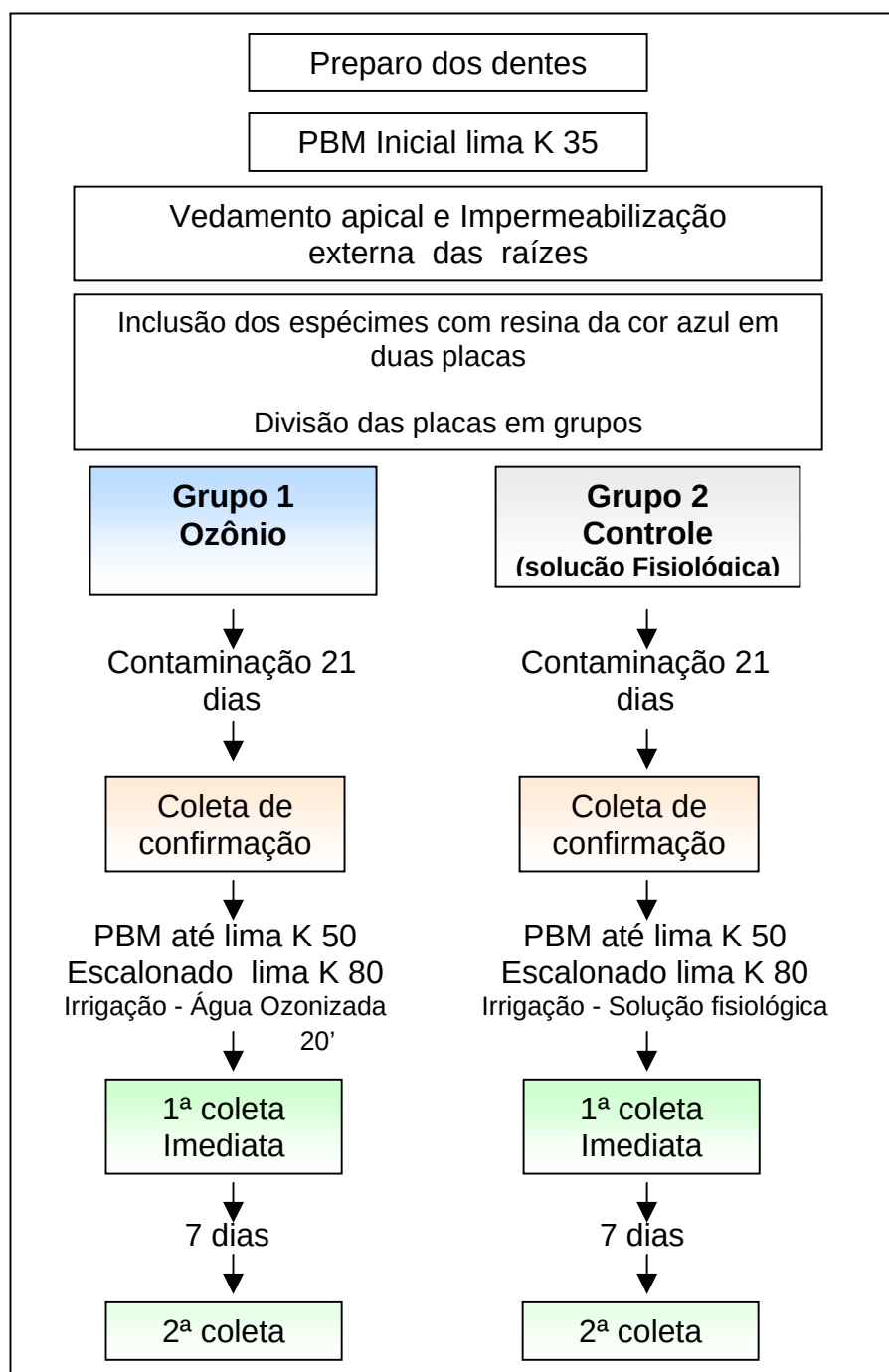


FIGURA 6 -Esquema demonstrando preparo dos dentes, divisão dos grupos, preparo biomecânico (PBM) e coleta das amostras na ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares.

4.4 Ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado no interior dos canais radiculares

4.4.1 Preparo das placas e materiais

Após preparo, padronização e inclusão dos dentes (conforme descrito no item 4.2), as duas placas vermelhas foram enviadas a Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD, Cotia, SP, Brasil), para esterilização por radiação gama com cobalto 60 (25 KGy por seis horas), juntamente com todos materiais utilizados para esta fase (pinças, exploradores, espátulas, limas, tesouras, ponteiras, seringas, tubos, cones de papel, gaze, algodão, luvas, máscaras e gorros), para neutralização das toxinas pré-existentes. Todos os itens descritos foram embalados duas vezes em papel Kraft, selados com fita adesiva, e acondicionados em caixa fechada.

4.4.2 Contaminação dos canais radiculares com LPS de *Escherichia coli* (OLIVEIRA⁶¹, 2005)

Após retorno das placas, e de todos materiais enviados a EMBRARAD, foi realizada a contaminação dos canais radiculares de todos os espécimes com LPS de *Escherichia coli*, no interior de câmara de fluxo laminar. Os espécimes foram contaminados com a inoculação de 10 µL (40 UI) de LPS de *Escherichia coli* (nº 055:B5, Sigma, St Louis, USA), no interior dos canais radiculares dos vinte e quatro espécimes (doze espécimes de cada placa), com o auxílio de micropipeta. A seguir foi colocada bolinha de algodão estéril na abertura da entrada dos canais, os quais permaneceram em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas.

4.4.3 Divisão das placas em grupos

Nas duas placas vermelhas contendo os espécimes contaminados com LPS de *E. coli*, foi realizada uma divisão aleatória, sendo que uma placa originou o grupo 3 (grupo ozônio/ LPS), e a outra placa o grupo 4 (grupo controle/LPS).



FIGURA 7 - Placas com os espécimes fixados com resina vermelha dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.

4.4.4 Instrumentação e irrigação final dos canais radiculares dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.

No dia seguinte, foi realizado o preparo biomecânico final. Os canais dos dois grupos foram instrumentados até a lima K nº 50 e escalonados até a lima K nº 80, sendo empregado no preparo um conjunto de limas para cada dois espécimes. Foram utilizados 3 mL do agente irrigante correspondente ao grupo, a cada troca de instrumento.

No grupo ozônio/LPS foi empregado a água ozonizada por vinte minutos como agente irrigante durante todo preparo biomecânico, e no grupo controle/LPS foi empregado como agente irrigante a solução fisiológica apirogênica (NaCl a 0,9%, Beker Produtos Fármaco Hospitalares). A irrigação foi realizada com auxílio de seringa apirogênica de 5 mL (Injex, Ourinhos, SP, Brasil) com agulha apirogênica 20 X 5,5 mm (BD, PR, Brasil), e a aspiração com agulha metálica 20/30 acoplada a um intermediário unido a mangueira da bomba a vácuo.

Quadro 3 - Contaminação e instrumentação dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS

GRUPOS	CONTAMINAÇÃO	Preparo biomecânico final Agente irrigante
Grupo 3 Ozônio / LPS 12 espécimes	Suspensão de LPS de <i>E. coli</i>	Água ozonizada por 20 minutos
Grupo 4 Controle / LPS 12 espécimes	Suspensão de LPS de <i>E. coli</i>	Solução fisiológica apirogênica

4.4.5 Coleta das amostras dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS

Imediatamente após o preparo biomecânico final dos espécimes, foi realizada a coleta imediata (primeira coleta) das amostras do conteúdo do canal radicular, onde todos os canais foram preenchidos com água apirogênica (Charles River Endosafe, Alko do Brasil, RJ, Brasil), e em seguida coletados 230 µL do conteúdo do canal radicular,

com auxílio de uma seringa tipo insulina de 1 mL, para verificar a permanência de LPS de *E. coli* no interior dos canais radiculares. A seguir os espécimes do grupo ozônio/LPS foram preenchidos com água ozonizada, e os espécimes do grupo controle/LPS com solução fisiológica apirogênica (NaCl a 0,9%, Beker Produtos Fármaco Hospitalares), seguidos de bolinha de algodão estéril na entrada dos canais. As placas foram fechadas, seladas com fita adesiva, embaladas em PVC onde permaneceram em estufa microbiológica a 37°C, por sete dias. Decorrido este período, foi realizada a segunda coleta do conteúdo do canal radicular, seguindo os mesmos procedimentos e cuidados da primeira coleta, e verificada novamente a permanência de LPS de *E. coli* no interior dos canais radiculares.



FIGURA 8 - Coleta das amostras dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS.

4.4.6 Verificação da neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado nos canais radiculares dos espécimes dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS

Para a verificação da neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado no interior dos canais radiculares foram realizados dois testes:

- a) o lisado de amebócito de *Limulus* (análise qualitativa e semiquantitativa); (coleta imediata e após sete dias)
- b) produção de anticorpos em cultura de linfócitos B; (coleta imediata e após sete dias)

Todos procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar, conforme item 4.1.1, sendo a câmara forrada com duas camadas de gaze apirogênica.

4.4.6.1 Teste do lisado de amebócito de *Limulus* (OLIVEIRA⁶¹, 2005)

A neutralização do conteúdo de LPS foi verificada utilizando-se o método de geleificação do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL), que é um teste semiquantitativo do laboratório Charles River Endosafe (Alko do Brasil, RJ, Brasil), e possui sensibilidade para detectar endotoxinas a partir de 0,125 UI/mL. Este lisado quando exposto a pequenas quantidades de endotoxinas aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro. O produto é composto por um frasco contendo o lisado em pó, o qual foi ressuscitado em 5,2 mL de água apirogênica e, em seguida, distribuído em tubos de vidro apirogênicos 10x75 mm (Charles River Endosafe, Alko do Brasil, RJ, Brasil) sendo colocados 100 µL do lisado em cada tubo. Estes tubos contendo o lisado podem ser armazenados no congelador por no máximo trinta dias, a partir de seu preparo.



FIGURA 9 - a) lisado de amebócitos de Limulus (Charles River Endosafe); b) água apirrogênica; c) pó do Lisado.

Imediatamente após o término do preparo biomecânico (primeira coleta), e após sete dias (segunda coleta), foi utilizada uma alíquota de 100 μ L das 230 μ L que foram removidas do conteúdo do canal, sendo colocada em tubo apirrogênico contendo 100 μ L do lisado de Limulus. O tubo foi agitado levemente e mantido a banho-maria a 37°C por uma hora. Estes procedimentos foram repetidos para todos os vinte e quatro espécimes onde foram inoculadas LPS de *E. coli*. Decorridos este período, foi verificada a formação ou não de gel inclinando-se os tubos (análise qualitativa).



FIGURA 10 - a) Geleificação do lisado de amebócito de Limulus - presença de LPS. b) sem geleificação do lisado de amebócito de Limulus - ausência de LPS.

Nos tubos em que foi detectada a presença de LPS, o conteúdo final do canal radicular foi diluído várias vezes até não haver mais a formação de gel. A diluição foi feita da seguinte forma: em uma placa apirogênica de polistireno de 96 poços foram colocados 100 µL de água apirogênica em cada poço da placa, sendo que no primeiro poço foi adicionado 100 µL do conteúdo removido do canal radicular, sendo repassado 100 µL desta mistura para o poço seguinte e, assim, foram realizadas diluições em base de dois para cada espécime. Desta forma, o valor aproximado da quantidade de LPS presente no conteúdo coletado do canal radicular pôde ser obtido como demonstrado no Quadro 4 (análise semiquantitativa).

Quadro 4 - Esquema representativo da quantidade de LPS presente no canal radicular após cada diluição em base de dois a partir da amostra inicial.

Escores	Diluições	LPS (UI)
0	Puro (zero)	<0,125
1	1:2	0,125 - 0,249
2	1:4	0,250 - 0,499
3	1:8	0,5 - 0,999
4	1:16	1 - 1,999
5	1:32	2,0 - 3,999
6	1:64	4,0 - 7,999
7	1:128	8,0 - 15,999
8	1:256	16,0 - 31,999
9	1:512	32,0 – 40,0

4.4.6.2 Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B (OLIVEIRA⁶¹, 2005)

Um camundongo (*Mus musculus*) Swiss macho de aproximadamente três meses de idade foi sacrificado e o baço foi retirado e macerado em um tubo cônico de plástico, esterilizado e aprotogênico, com 3 mL de meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), pH 7.2, para obtenção dos linfócitos B. A seguir, foi acrescentado ao tubo 27 mL de meio RPMI e este foi centrifugado por dez minutos a 500 Xg. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado mais 30 mL de meio RPMI e novamente centrifugado por dez minutos a 500 Xg. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 30 mL de meio RPMI completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Sigma, St. Louis, USA).

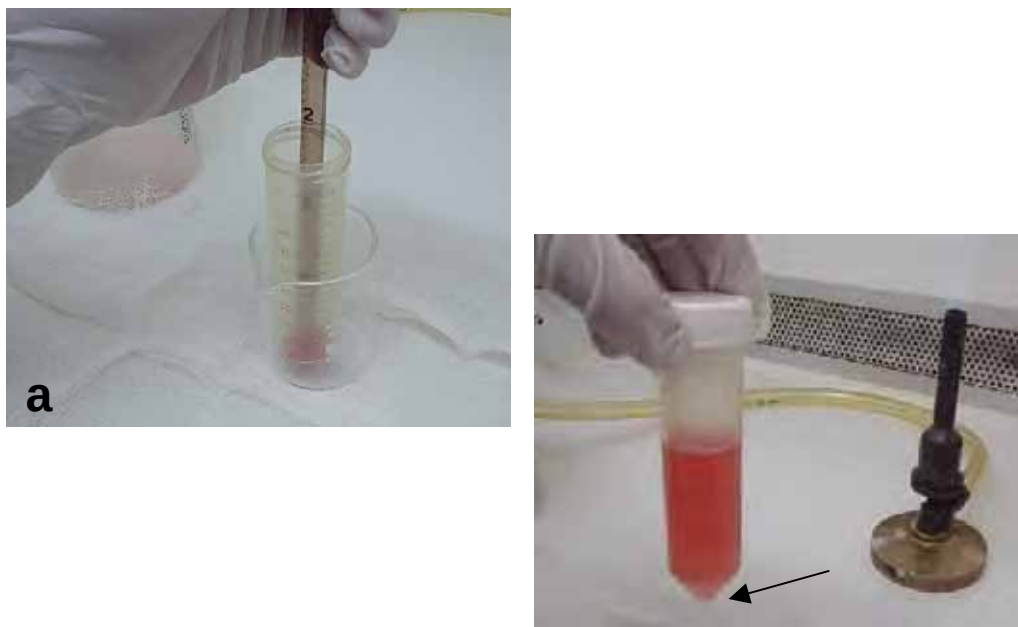


FIGURA 11 - a) Células do baço de camundongo sendo maceradas; b) células do baço de camundongo sedimentadas em meio RPMI.

Em seguida, foi realizada a contagem dos linfócitos em câmara de Neubauer, utilizando-se corante azul tripan (Sigma, St. Louis, USA) e um tampão para promover o rompimento de eritrócitos, obtendo-se o total de $4,16 \cdot 10^6$ células/mL. A seguir, foi colocada aproximadamente um milhão (1×10^6) de células viáveis (250 μ L da cultura preparada) em cada poço de três placas de polistireno (apirrogênica) de 24 poços (Costar, New York, USA), acrescentado de 250 μ L de meio RPMI completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino, e incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de teor de CO₂, por 24 horas. Após este período, foram colocados 30 μ L do conteúdo aspirado de cada canal radicular nos orifícios das placas contendo a cultura de linfócitos B, e as placas foram novamente incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Decorridos quatro dias, foi realizado teste imunoenzimático ELISA para detectar a produção de anticorpos (IgM) pelas células na presença de LPS de *Escherichia coli*.

4.4.6.3 Teste ELISA

Duas placas de microtitulação, de plástico flexível e fundo chato (Hemobag, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com 96 poços, foram sensibilizadas com conjugado anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase (Sigma, St. Louis, USA) na concentração de 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por duas horas e, em seguida, foi realizada inibição da peroxidase com azida 0,1% em PBS por uma hora em temperatura ambiente.

No dia do teste, as placas foram bloqueadas com 0,5% de gelatina em PBS por 45 minutos a 37°C, e a seguir com soro albumina bovino (BSA) 0,2%, também permanecendo 45 minutos em estufa a 37°C. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,2% de Tween-20 (PBS-T) e foram colocados 100 µL do sobrenadante de cada poço da cultura de linfócitos nos orifícios da placa. Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por duas horas e, logo após, foram lavadas abundantemente com PBS-T. A seguir, foram colocados 50 µL do conjugado anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase (Sigma, St Louis, USA) na concentração 1/2000. As placas ficaram uma hora em estufa a 37°C e em seguida, foram novamente lavadas abundantemente com PBS-T. Após, a reação foi revelada com reagente composto de 36 mL de tampão citrato ácido cítrico 0,1 M, 24 mg de ortofenildiamino (OPD, Sigma, USA) e 30 µL de H₂O₂ a 30% (100 µL em cada poço da placa) e, após cinco a dez minutos, a reação foi bloqueada com 50 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Biorad, Modelo 3550, Hercules, CA) com comprimento de onda de 490 nm. Obtendo-se os valores da densidade óptica, tanto da primeira coleta (coleta imediata) como da segunda coleta, sendo realizadas as médias para cada espécime, para posterior análise estatística.

Os procedimentos realizados na ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado no interior dos canais radiculares estão sumarizados na Figura 12.

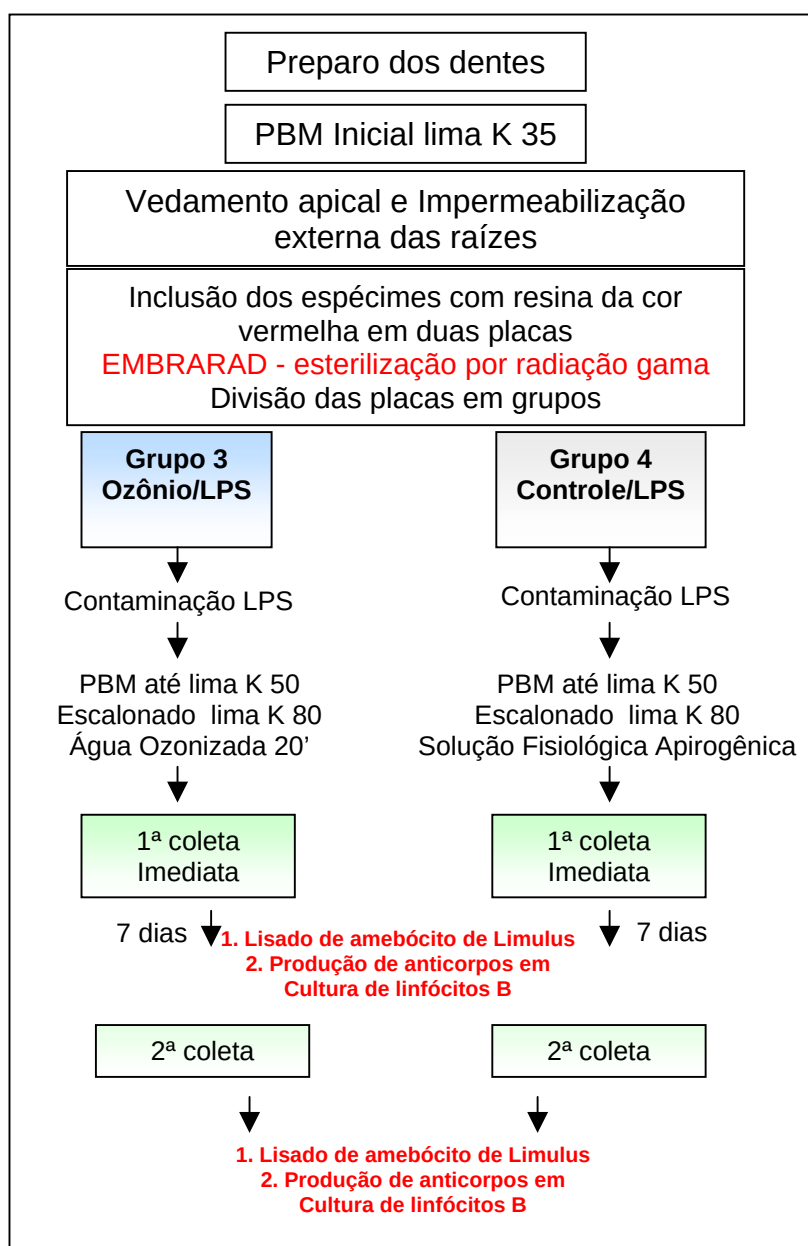


FIGURA 12 - Esquema demonstrando preparo dos dentes, divisão dos grupos, preparo biomecânico e coleta das amostras na verificação da neutralização de LPS de *E. coli* inoculada no interior dos canais radiculares.

4.5 Análise estatística

4.5.1 Análise estatística da avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*

Foi avaliada a influência da variável experimental (tempo necessário de ozonização da água destilada), conferindo propriedades antimicrobianas sobre a variável resposta (UFC/mL da suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis*).

Os valores obtidos do crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis* em diferentes tempos, foram analisados por um estatístico, e foi constatada, a não necessidade da análise estatística por programas computacionais na comprovação dos resultados, pois a variável experimental foi o tempo necessário de ozonização da água empregada, sobre suspensão contendo os microrganismos, determinando os resultados diretamente pela coleta dos dados.

4.5.2 Análise estatística da ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares

Foi avaliada a influência da variável experimental (agente irrigante - água ozonizada) sobre a variável resposta (UFC/mL da suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis*).

Os valores relativos às contagens de microrganismos, dos grupos ozônio e controle, tanto para o conteúdo do canal radicular coletado imediatamente (primeira coleta), como para o conteúdo coletado após sete dias da instrumentação (segunda coleta), foram submetidos

(após transformação logarítima de 0,1 mL para 1 mL) ao programa computacional MINITAB for Windows (versão release 14.1, Statistical Software Inc., 2003).

Na análise, os valores encontrados foram submetidos aos testes estatísticos de comparação de Wilcoxon (dados pareados - comparação entre as coletas imediata e após sete dias), e teste de comparação de Mann-Whitney (dados independentes - comparação entre os grupos ozônio e controle), todos com nível de significância de 5%.

4.5.3 Análise estatística da ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado no interior dos canais radiculares

Os escores relativos ao teste: lisado de amebócito de *Limulus* (análise qualitativa e semiquantitativa), tanto para o conteúdo do canal radicular coletado imediatamente (primeira coleta), como para o conteúdo coletado após sete dias da instrumentação (segunda coleta), foram submetidos ao programa computacional MINITAB for Windows (versão release 14.1, Statistical Software Inc., 2003).

Os valores da densidade óptica relativos ao teste ELISA: produção de anticorpos em cultura de linfócitos B (análise quantitativa), tanto para o conteúdo do canal radicular coletado imediatamente (primeira coleta), como para o conteúdo coletado após sete dias da instrumentação (segunda coleta), foram submetidos ao programa computacional STATISTICA for Windows (versão 5.5, Statistical Software Inc., 2000) e STATISTIX for Windows (versão 8.0, Analytical Software, 2003).

4.5.3.1 Lisado de amebócito de *Limulus* (análise qualitativa)

Foi avaliada a influência da variável experimental (agente irrigante - água ozonizada) sobre a variável resposta (presença de LPS de *E. coli* em unidades internacionais - UI).

Na análise qualitativa, o sinal positivo (+) significou presença de LPS, e o sinal negativo (-) significou ausência de LPS, ou quantidade inferior a 0,125 UI.

4.5.3.2 Lisado de amebócito de *Limulus* (análise semiquantitativa)

Foi avaliada a influência da variável experimental (agente irrigante - água ozonizada) sobre a variável resposta (quantidade aproximada em escores de LPS de *E. coli*).

Nos espécimes em que foi detectada a presença de LPS (positivo), foram atribuídos escores após diluições, com o valor aproximado da quantidade de LPS presente no conteúdo coletado do canal radicular.

Na análise semiquantitativa os valores encontrados foram submetidos ao teste de comparação de Mann-Whitney (dados independentes - comparação entre os grupos), todos com nível de significância de 5%.

4.5.3.3 Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B - Teste ELISA - imunoenzimático (análise quantitativa)

Foi avaliada a influência da variável experimental (agente irrigante - água ozonizada) sobre a variável resposta (produção de anticorpos em cultura de linfócitos B pelo LPS de *E. coli*), conferida pela densidade óptica das amostras, através do leitor de ELISA.

Na análise, os valores encontrados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e ao teste de comparação múltipla de Tukey, todos com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*

Foram observados os efeitos antimicrobianos da água destilada ozonizada pelos tempos de cinco, dez, quinze, vinte, vinte e cinco e trinta minutos, sobre suspensão contendo *C. albicans* e *E. faecalis*. Os valores de crescimento dos microrganismos em UFC/mL, estão expressos através das Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Número de crescimento de *C. albicans* em UFC/mL após exposição à água ozonizada (24 mg/L O₃) em diferentes tempos

Número de realizações	Contagem inicial	Número de UFC/mL de <i>C. albicans</i> submetidos à ação da água ozonizada pelos tempos determinados					
		5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	7,80x10 ⁶	0	0	0	0	0	0
2	1,30x10 ⁷	0	0	0	0	0	0
3	1,60x10 ⁷	0	0	0	0	0	0
4	7,00x10 ⁷	300	0	0	0	0	0
5	1,20x10 ⁷	0	0	0	0	0	0
6	2,00x10 ⁷	0	0	0	0	0	0
7	3,20x10 ⁷	200	0	0	0	0	0
8	5,80x10 ⁷	300	0	0	0	0	0
9	2,50x10 ⁷	100	0	0	0	0	0
10	1,75x10 ⁷	0	0	0	0	0	0
Média		90	0	0	0	0	0

Tabela 2 – Número de crescimento de *E. faecalis* em UFC/mL após exposição à água ozonizada (24 mg/L O₃) em diferentes tempos

Número de realizações	Contagem inicial	Número de UFC/mL de <i>E. faecalis</i> submetidos à ação da água ozonizada pelos tempos determinados					
		5'	10'	15'	20'	25'	30'
1	1,40x10 ⁸	200	0	0	0	0	0
2	3,30x10 ⁸	300	0	0	0	0	0
3	4,10x10 ⁶	0	0	0	0	0	0
4	4,20x10 ⁷	0	0	0	0	0	0
5	1,10x10 ⁸	100	0	0	0	0	0
6	1,70x10 ⁸	200	0	0	0	0	0
7	1,33x10 ⁸	200	0	0	0	0	0
8	2,30x10 ⁷	0	0	0	0	0	0
9	4,20x10 ⁸	300	0	0	0	0	0
10	3,00x10 ⁶	0	0	0	0	0	0
Média		130	0	0	0	0	0

Pode-se observar, que durante as dez vezes em que foi realizado o experimento, ocorreu crescimento de *C. albicans* exposta à água ozonizada pelo tempo de cinco minutos (24 mg/L O₃), correspondente a quarta, sétima, oitava e nona vez. Já para *E. faecalis*, exposto à água ozonizada pelo tempo de cinco minutos (24 mg/L O₃), ocorreu crescimento na primeira, segunda, quinta, sexta, sétima, e nona vez em que foi realizado o experimento. Porém mesmo ocorrendo crescimento microbiano (pelo tempo de cinco minutos), a ação antimicrobiana da água ozonizada, promoveu acentuada diminuição.

Já na exposição dos microrganismos à água ozonizada pelo tempo de dez minutos, ocorreu eliminação dos mesmos, assim como nos tempos de quinze, vinte, vinte e cinco e trinta minutos.

Os resultados obtidos nesta fase foram analisados por estatístico, o qual constatou que não seria necessária a análise estatística por programas computacionais na comprovação dos resultados, pois a variável experimental foi o tempo necessário de ozonização da água destilada, empregada na inibição do crescimento da suspensão contendo *C. albicans* e *E. faecalis*, determinando os resultados diretamente pela coleta dos dados.

5.2 Avaliação da ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares

5.2.1 Crescimento de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* após primeira e segunda coleta

Foi considerada a presença destes microrganismos, no interior dos canais radiculares, após o preparo biomecânico, nos diferentes grupos. As Tabelas 3 e 4, expressam os valores de crescimento de cada microrganismo em UFC/mL, após primeira (imediate) e segunda coleta (após sete dias), do grupo ozônio e controle.

Tabela 3 - Número de UFC/mL para cada espécime de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, após a primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas do grupo ozônio

Amostras do grupo Ozônio	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	1ª Coleta	2ª Coleta	1ª Coleta	2ª Coleta
1	820	4240	220	1320
2	10	10	10	1020
3	0	220	0	0
4	20	2460	0	660
5	20	1340	0	680
6	0	800	0	840
7	120	1220	0	280
8	1100	6000	480	2880
9	20	1920	0	380
10	200	3800	40	1060
11	10	2400	0	860
12	10	1100	10	760
Média	194	2126	63,3	895

Tabela 4 - Número de UFC/mL para cada espécime de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, após a primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas do grupo controle

Amostras do grupo Controle	<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	1ª Coleta	2ª Coleta	1ª Coleta	2ª Coleta
1	3100	15200	1960	9600
2	2860	9600	1880	6320
3	8800	34600	7380	29040
4	2100	8400	2160	8640
5	2040	9200	1770	8000
6	4500	16400	2130	7760
7	4200	28000	2400	16000
8	4000	15680	3920	15360
9	1460	6000	1300	5360
10	1260	5280	1240	5200
11	2200	8640	2000	7840
12	4000	18880	1980	9360
Média	3377	14657	2510	10707

5.2.2 Avaliação da distribuição estatística do crescimento de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* dos grupos ozônio e controle

O método de Anderson Darling foi utilizado para investigar a normalidade da distribuição dos dados relativos ao crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis* dos grupos ozônio e controle.

Os resultados obtidos são apresentados no Apêndice A - Tabela 17. A grande maioria das distribuições estudadas segue uma distribuição não-normal ao nível de significância de 5% justificando o emprego da estatística não-paramétrica nos testes de inferência.

5.2.3 Análise do crescimento de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* após primeira e segunda coleta

Foi realizada a análise descritiva dos valores obtidos do crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis*, apresentada pelos valores de tendência central (média e mediana) e valores de dispersão (desvio-padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo e a faixa interquartil), objetivando-se caracterizar os resultados em valores de interesse estatístico.

A estatística descritiva dos valores de crescimento de *C. albicans*, após primeira e segunda coleta, do grupo ozônio e controle, está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Estatística descritiva de *C. albicans* em UFC/mL após primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas dos grupos ozônio e controle

Estatística Descritiva	<i>Candida albicans</i> 1ª coleta		<i>Candida albicans</i> 2ª coleta	
	Grupo Ozônio	Grupo Controle	Grupo Ozônio	Grupo Controle
Média	63,3	2510	895	10707
Desvio Padrão	145,4	1675	722	6711
Mínimo	0	1240	0	5200
1º quartil (25%)	0	1798	450	6680
Mediana	0	1990	800	8320
3º quartil (75%)	32,5	2340	1050	13920
Máximo	480,0	7380	2880	29040

A estatística descritiva dos valores de crescimento de *E. faecalis*, após primeira e segunda coleta, do grupo ozônio e controle, está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Estatística descritiva de *E. faecalis* em UFC/mL após primeira e segunda coleta de amostras microbiológicas dos grupos ozônio e controle

Estatística Descritiva	<i>Enterococcus faecalis</i> 1ª coleta		<i>Enterococcus faecalis</i> 2ª coleta	
	Grupo Ozônio	Grupo Controle	Grupo Ozônio	Grupo Controle
Média	194	3377	2126	14657
Desvio Padrão	368	2032	1780	9003
Mínimo	0	1260	10	5280
1º quartil (25%)	10	2055	875	8460
Mediana	20	2980	1630	12400
3º quartil (75%)	180	4150	3465	18260
Máximo	1100	8800	6000	34600

5.2.4 Comparação do crescimento de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* entre a primeira e segunda coleta

Mediante teste de comparação de Wilcoxon para dados pareados (nível de significância 5%), verificou-se que para as amostras de *C. albicans* (primeira e segunda coleta) ocorreram diferenças estatísticas significantes, tanto no grupo ozônio como controle, o mesmo sendo observado para as amostras de *E. faecalis* (primeira e segunda coleta).

Tabela 7 – Comparação das amostras de *C. albicans* e *E. faecalis* (primeira e segunda coleta) dos grupos ozônio e controle (Teste de Wilcoxon - 5% de significância - dados pareados)

COMPARAÇÕES Primeira coleta X Segunda coleta	Valor de p	Diferença Significante	
		Sim	Não
1 – <i>C. albicans</i> ; Grupo ozônio	0,004	X	
2 - <i>C. albicans</i> ; Grupo controle	0,003	X	
3 - <i>E. faecalis</i> ; Grupo ozônio	0,004	X	
4 – <i>E. faecalis</i> ; Grupo controle	0,003	X	

Os baixos valores encontrados para p ($p < 0,05$) indicam que as coletas comparadas (primeira e segunda coleta), tanto do grupo ozônio como controle, são significativamente diferentes. As diferenças entre os grupos comparados estão apresentadas graficamente na Figura 14 do Apêndice A.

5.2.5 Comparação do crescimento de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* entre os grupos ozônio e controle, após primeira e segunda coleta

Esta análise foi realizada mediante teste de comparação de Mann-Whitney para dados independentes (nível de significância de 5%). Verificou-se que na comparação do grupo ozônio com o grupo controle para as amostras de *C. albicans* (primeira e segunda coleta) ocorreram diferenças estatísticas significantes. Para as amostras de *E. faecalis* (primeira e segunda coleta), também ocorreram diferenças estatísticas significantes, com grau de confiança de 95%.

Tabela 8 – Teste de comparação entre os grupos ozônio e controle (Teste de Mann-Whitney - 5% de significância - dados independentes)

COMPARAÇÕES Grupo ozônio x Grupo controle	Valor de p	Diferença Significante	
		Sim	Não
1 - <i>C. albicans</i> ; Primeira coleta	0,000	X	
2 - <i>C. albicans</i> ; Segunda coleta	0,000	X	
3 - <i>E. faecalis</i> ; Primeira coleta	0,000	X	
4 - <i>E. faecalis</i> ; Segunda coleta	0,000	X	

Os valores nulos encontrados para p ($p < 0,05$) indicam que os grupos comparados são significativamente diferentes ao nível de significância de 5%.

5.3 Avaliação da ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado no interior dos canais radiculares

5.3.1 Lisado de amebócito de Limulus (análise qualitativa)

O sinal positivo (+) significou presença de LPS (geleificação do lisado), e o sinal negativo (-) significou ausência de LPS, ou quantidade inferior a 0,125 UI (sem geleificação do lisado). Os resultados obtidos pela análise qualitativa do teste lisado de amebócito de Limulus, após primeira e segunda coleta dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS foi positivo para todas as amostras, e encontra-se no apêndice B através das Tabelas 18 e 19.

5.3.2 Lisado de amebócito de Limulus (análise semiquantitativa)

Nos tubos em que foi detectada a presença de LPS (positivo), o conteúdo final do canal radicular foi diluído várias vezes, até não haver mais a formação de gel. Desta forma, o valor aproximado da quantidade de LPS presente no conteúdo coletado do canal radicular, pôde ser obtido aplicando-se os escores de acordo com o número de diluições, como demonstrado no Quadro 4 (análise semiquantitativa).

Após diluições do conteúdo removido dos canais radiculares dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS, os resultados obtidos pela análise semiquantitativa, após primeira e segunda coleta estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Resultados em escores para cada espécime do teste lisado de amebócito de *Limulus*, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo ozônio/LPS

Amostras do Grupo Ozônio/LPS	LPS de <i>E. coli</i>	
	Primeira coleta	Segunda coleta
1	4	5
2	5	5
3	6	6
4	5	5
5	6	5
6	6	5
7	5	7
8	5	5
9	5	5
10	6	7
11	5	5
12	5	6
Média	5,2	5,5

Tabela 10 – Resultados em escores para cada espécime do teste lisado de amebócito de *Limulus*, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo controle/LPS

Amostras do Grupo Controle/LPS	LPS de <i>E. coli</i>	
	Primeira coleta	Segunda coleta
1	5	6
2	5	6
3	3	4
4	5	5
5	5	4
6	5	7
7	5	7
8	4	7
9	5	7
10	5	6
11	5	6
12	5	7
Média	4,7	6

A análise descritiva dos valores obtidos no teste lisado de amebócito de *Limulus*, foi apresentada pelo valor de tendência central (mediana), valores de dispersão (mínimo e máximo), objetivando-se os resultados em valores de interesse estatístico, e está apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 – Estatística descritiva da neutralização de LPS de *E. coli* após primeira e segunda coleta dos grupos ozônio/LPS e controle/LPS

Estatística Descritiva	LPS de <i>E. coli</i> Primeira coleta		LPS de <i>E. coli</i> Segunda coleta	
	Grupo 3 Ozônio/LPS	Grupo 4 Controle/LPS	Grupo 3 Ozônio/LPS	Grupo 4 Controle/LPS
Mínimo	4	3	5	4
Mediana	5	5	5	6
Máximo	6	5	7	7

Foi realizada a análise quanto à igualdade ou diferença significativa entre os grupos ozônio/LPS e controle/LPS, mediante teste de comparação de Mann-Whitney para dados independentes (nível de significância de 5%).

Tabela 12 – Teste de comparação entre os grupos ozônio/LPS e controle/LPS na neutralização de LPS de *E. coli* (Teste de Mann-Whitney - 5% de significância - dados independentes)

Comparações na neutralização de LPS de <i>E. coli</i> do teste lisado de amebócito de <i>Limulus</i> Grupo 3 Ozônio/LPS x Grupo 4 Controle/LPS	Valor de p	Diferença Significante	
		Sim	Não
1 - Ozônio/LPS x Controle/LPS; Primeira coleta	0,060		X
2 - Ozônio/LPS x Controle/LPS; Segunda coleta	0,172		X

Verificou-se que na comparação entre os grupos ozônio/LPS e controle/LPS na neutralização de LPS de *E. coli*, não ocorreram diferenças estatísticas significantes, tanto na primeira coleta, assim como na segunda coleta, com grau de confiança de 95%.

Os valores encontrados para p do grupo ozônio/LPS e controle/LPS ($p > 0,05$) mostram que as coletas comparadas não são significativamente diferentes.

5.3.3 Produção de anticorpos em cultura de linfócitos B - Teste ELISA - imunoenzimático (análise quantitativa)

Foi realizado o teste imunoenzimático - ELISA na verificação da produção de anticorpos em cultura de linfócitos B. Através do leitor de ELISA, foram obtidos os valores médios da densidade óptica (DO) das amostras dos grupos 3 (ozônio/LPS) e 4 (controle/LPS), na primeira e segunda coleta, através das Tabelas 13 e 14. Para este teste, foi adicionado um grupo de controle celular, contendo apenas a cultura celular pura, sem estimulação pelo conteúdo coletado dos canais radiculares.

Tabela 13 – Valores médios de densidade óptica (DO) apresentado por cada espécime dos grupos (primeira coleta)

Amostras dos grupos	Ozônio/LPS	Controle/LPS	Controle da cultura de células
1	0,568	0,544	0,216
2	0,485	0,579	0,221
3	0,448	0,515	0,293
4	0,588	0,548	0,169
5	0,528	0,572	0,228
6	0,562	0,495	0,243
7	0,554	0,532	0,271
8	0,545	0,606	0,283
9	0,524	0,618	0,234
10	0,592	0,513	0,268
11	0,546	0,576	0,252
12	0,562	0,567	0,285
Média	0,541	0,555	0,246

Tabela 14 – Valores médios de densidade óptica (DO) apresentado por cada espécime dos grupos (segunda coleta)

Amostras dos grupos	Ozônio/LPS	Controle/LPS	Controle da cultura de células
1	0,546	0,539	0,221
2	0,575	0,579	0,198
3	0,554	0,642	0,285
4	0,654	0,575	0,266
5	0,581	0,587	0,245
6	0,522	0,575	0,268
7	0,669	0,622	0,252
8	0,594	0,682	0,302
9	0,569	0,648	0,271
10	0,542	0,497	0,234
11	0,507	0,539	0,256
12	0,513	0,528	0,214
Média	0,568	0,584	0,251

Foi realizada estatística descritiva, sendo os valores médios de densidade óptica (DO) e os desvios-padrão obtidos por cada grupo na primeira e segunda coleta demonstrada na Tabela 15. Pela

Análise de Variância (ANOVA), verificou-se diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Para identificar estas diferenças foi realizado o teste de comparação múltipla de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Analisando-se os resultados da primeira coleta (imediata), pôde-se verificar que os grupos 3 (ozônio/LPS) e 4 (controle/LPS) apresentaram valores de densidade óptica (DO) semelhantes entre si ($p > 0,05$) e significativamente superiores ao grupo de controle da cultura celular ($p < 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores médios de densidade óptica (DO) $\pm$ desvio-padrão apresentados por cada grupo na primeira coleta (imediata) e representação dos grupos homogêneos

GRUPOS	DO $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
Ozônio/LPS	0,541 $\pm$ 0,041	A
Controle/LPS	0,555 $\pm$ 0,037	A
Controle cultura de células	0,246 $\pm$ 0,035	B

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Essas semelhanças e diferenças são visualizadas no gráfico de Box-Plot dos grupos (Figura 15), que se encontra no apêndice C.

Analisando-se os resultados da segunda coleta (após sete dias da instrumentação), também pôde-se verificar que os grupos 3 (ozônio/LPS) e 4 (controle/LPS) apresentaram valores de densidade óptica (DO) semelhantes entre si ($p > 0,05$) e significativamente superiores ao grupo de controle da cultura celular ($p < 0,05$) (Tabela 16).

Tabela 16 - Valores médios de densidade óptica (DO) $\pm$ desvio-padrão apresentados por cada grupo na segunda coleta (após sete dias) e representação dos grupos homogêneos

GRUPOS	DO $\pm$ desvio-padrão	Grupos homogêneos*
Ozônio/LPS	0,571 $\pm$ 0,048	A
Controle/LPS	0,584 $\pm$ 0,055	A
Controle cultura de células	0,251 $\pm$ 0,030	B

*letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

Essas semelhanças e diferenças são visualizadas no gráfico de Box-Plot dos grupos (Figura 16), que se encontra no apêndice C.

Comparando-se os grupos em função do tempo (imediatos e após sete dias), pôde-se verificar que não houve diferenças significativas entre os grupos entre a primeira e segunda coleta ($p > 0,05$).

A Figura 13 apresenta os valores médios de densidade óptica obtidos pelos grupos experimentais na primeira e segunda coleta.

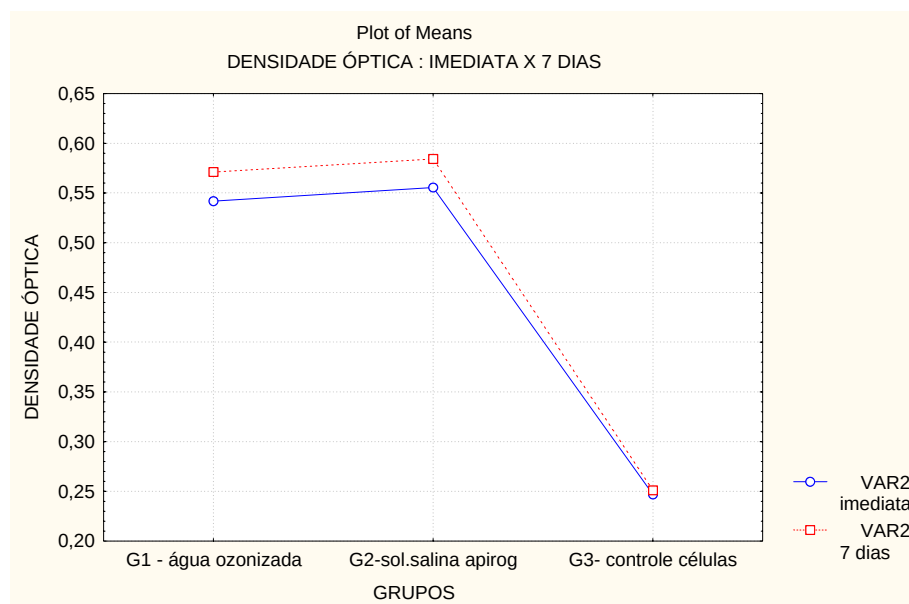


FIGURA 13 - Representação gráfica dos valores médios de densidade óptica obtidos pelos grupos na primeira e segunda coleta, pelo ELISA.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da escolha do tema

A maioria das infecções endodônticas é de natureza polimicrobiana (NAIR et al.⁵⁸, 1987; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸², 2002; SUNDE et al.⁸⁵, 2002) decorrentes da invasão de microrganismos e de seus subprodutos (endotoxinas), 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 (SUNDQVIST⁸⁷⁻⁸, 1992, 1994; GOMES et al.²⁵⁻⁶, 1996; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸², 2002). Componentes microbianos e seus subprodutos, induzem reações inflamatórias nos canais radiculares e na região periapical (KAKEHASHI et al.⁴⁰, 1965), apresentando efeitos biológicos na indução e manutenção da inflamação (PITTS et al.⁷¹, 1982; YAMASAKI et al.¹⁰⁰, 1992; MURAKAMI et al.⁵⁵, 2001; HONG et al.³⁴, 2004), e no desenvolvimento de reabsorção óssea periapical (STASHENKO et al.⁸⁴, 1991; WANG & STASHENKO⁹⁹, 1993).

Bactérias Gram-negativas apresentam endotoxinas, na membrana externa da parede celular (DHALÉN & BERGENHOLTZ¹⁵, 1980), que são complexos lipopolissacarídicos (LPS), com potente ação citotóxica, liberadas durante a duplicação ou morte celular bacteriana, representando importante fator etiológico na patogênese e na manutenção da inflamação periapical (PITTS et al.⁷¹, 1982; YAMASAKI et al.¹⁰⁰, 1992; MURAKAMI et al.⁵⁵, 2001; HONG et al.³⁴, 2004). Estudos relacionaram uma maior quantidade de endotoxina, em dentes com

sintomatologia clínica, lesões apicais radiolúcidas, lesões cariosas e inflamação de tecidos pulpare (HORIBA et al.³⁶, 1991; KHABBAZ et al.⁴¹⁻², 2000, 2001), indicando a relação da quantidade de endotoxina na patogênese da doença pulpar, e severidade da dor.

Desta forma, o sucesso do tratamento endodôntico dependerá da máxima eliminação de restos teciduais necróticos, microrganismos, e de seus subprodutos (endotoxinas). Durante o tratamento endodôntico, além da ação cirúrgica (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 (SUNDQVIST⁸⁶, 1992; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁷⁸, 1998; LIMA et al.⁴⁷, 2001).

A ação antimicrobiana, tanto do hipoclorito de sódio como da clorexidina, empregada na terapia endodôntica vem sendo comprovada em diversos estudos (JEANSONNE & WHITE³⁷, 1994; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁷⁷⁻⁸, 1997, 1998; D'ARCANGELO et al.¹⁶, 1999; SEN et al.⁷⁵, 1999; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸⁰, 2000; GOMES et al.²⁷, 2001; VALERA et al.⁹², 2001; ÖNÇAG et al.⁶³, 2003; ESTRELA et al.²¹, 2003; ERCAN et al.²⁰, 2004; MENEZES et al.⁵³, 2004; VIANNA et al.⁹⁵, 2004), sendo estes medicamentos os mais comumente utilizados na prática endodôntica. A ação de neutralização de endotoxinas também foi pesquisada, onde os resultados apontaram ineficiência na neutralização de endotoxinas destes medicamentos (BUTTLER & CRAWFORD¹², 1982; HAIGHT-PONCE et al.³³, 1999; AIBEL & STEVENS², 1999; OLIVEIRA⁶⁰, 2002; TANOMARU et al.⁹⁰, 2003; OLIVEIRA⁶¹, 2005).

Na busca de uma nova substância com ação antimicrobiana, foi avaliado no estudo a ação da água ozonizada, tanto como agente irrigante de canais radiculares durante o preparo biomecânico, como de medicamento de espera entre sessões. O ozônio

(O₃) é um gás bastante reativo, que forma radicais oxidantes na presença de água, que atuam na membrana celular, e dependendo da extensão das reações causam lise, conferindo-lhe propriedades antimicrobianas (GARDUÑO et al.²⁴, 1995; OIZUMI et al.⁵⁹, 1998; VELANO et al.⁹³, 2001). Estas propriedades são empregadas em alguns países no tratamento de água potável (PARASKEVA et al.⁶⁵, 1998; DEINNINGER et al.¹⁷, 1998; JYOTI & PANDIT³⁹, 2004), em estudos abrangendo a aerobiologia (VILLEGAS et al.⁹⁶, 1995; DEVLIN et al.¹⁸, 1996; ANDERSON et al.⁵, 2001; BROOK et al.¹¹, 2002), em estudos microbiológicos (RESTAINO et al.⁷², 1995; KOMANAPALLI & LAU⁴⁴, 1998; VELANO et al.⁹³⁻⁴, 2001, 2002; DIAO et al.¹⁹, 2004), e na indústria alimentícia (GÜZEL-SEYDIM et al.³⁰⁻¹, 2004).

O efeito antimicrobiano do ozônio na odontologia, ainda é pouco difundido, mas tem atraído alguns pesquisadores em determinadas áreas. Em periodontia (GARDUÑO et al.²⁴, 1995; BARROS & FIORINI⁶, 2000), em dentística restauradora (BAYSAN et al.⁹, 2000), em endodontia (SIQUEIRA JUNIOR et al.⁷⁹, 2000; NAGAYOSHI et al.⁵⁷, 2004), no tratamento de lesões bucais, (RODRIGUEZ et al.⁷⁴, 1994; GUERRA et al.²⁹, 1997), na ação sobre *C. albicans* da saliva humana (FARIA et al.²², 2005).

Estudos comprovando o efeito antimicrobiano do ozônio são encontrados na literatura, (RODRIGUEZ et al.⁷⁴, 1994; GARDUÑO et al.²⁴, 1995; RESTAINO et al.⁷², 1995; GUERRA et al.²⁹, 1997; KOMANAPALLI & LAU⁴⁴, 1998; BAYSAN et al.⁹, 2000; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁷⁹, 2000; VELANO et al.⁹³⁻⁴, 2001, 2002; DIAO et al.¹⁹, 2004; GÜZEL-SEYDIM et al.³⁰⁻¹, 2004; NAGAYOSHI et al.⁵⁷, 2004; FARIA et al.²², 2005), porém não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a eficiência do ozônio sobre LPS.

Várias soluções têm sido utilizadas como irrigantes endodônticos, e como medicamentos de espera entre as sessões, entretanto, a ação da água ozonizada sobre microrganismos e LPS

durante o preparo biomecânico do canal radicular, ainda não está bem estabelecida, justificando assim a escolha do tema.

6.2 Da metodologia e resultados

Em relação à questão ética, no que diz respeito ao emprego *in vitro* de dentes humanos, foram utilizados nesta pesquisa dentes provenientes do acervo do Banco de Dentes Humanos do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté, com prévia autorização dos pacientes às disciplinas de onde foram realizadas as extrações. Referente à padronização dos espécimes, a seleção dos dentes foi feita de acordo com a anatomia da raiz, que deveria apresentar um único canal reto, existindo dificuldades relativas à idade do dente, quantidade de dentina esclerosada e variações anatômicas.

Foi realizado o preparo da região de entrada do conduto com broca Gates-Glidden nº 3, sendo que os espécimes foram instrumentados até a lima tipo K nº 35, padronizando o diâmetro do canal radicular, obtendo-se assim espaço para inoculação de 20 µL da suspensão de microrganismos nos grupos 1 e 2, (MENEZES et al.⁵², 2005), e 10 µL (40 UI) de LPS de *Eschericia coli* nos grupos 3 e 4 (OLIVEIRA⁶¹, 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 e/ou LPS no momento da contaminação dos canais, como também favorece a efetividade dos agentes irrigantes (SEN et al.⁷⁵, 1999; WALTIMO et al.⁹⁸, 2000).

Após preparo biomecânico inicial, foi realizada vedação da região apical com resina fotopolimerizável, para impossibilitar a saída de microrganismos, LPS e dos agentes irrigantes durante a contaminação e preparo biomecânico. 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 nas cores azul e vermelho (OLIVEIRA⁶¹, 2005). A inclusão dos espécimes nas placas com resinas de cores diferentes permitiu a separação dos grupos experimentais, assim como a identificação de cada espécime devido à numeração dos poços, facilitando os procedimentos de coleta das amostras.

Após preparo, padronização e inclusão dos espécimes em placas, as duas placas vermelhas empregadas na ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *E. coli* inoculado no interior dos canais radiculares, juntamente com todos materiais utilizados para esta fase, foram esterilizadas pela radiação gama com cobalto 60 (25 KGy por seis horas), para neutralização das toxinas pré-existentes. Nas outras etapas do trabalho onde não se utilizou LPS, os materiais empregados foram autoclavados, não necessitando do processo de esterilização pela radiação gama.

Na seleção dos microrganismos a serem empregados, optou-se por *Enterococcus faecalis*, pois constitui-se microrganismo freqüentemente encontrado em canais infectados, apresentando importante habilidade em penetrar nos túbulos dentinários (MOLANDER et al.⁵⁴, 1998; SUNDQVIST, et al.⁸⁹, 1998; WALTIMO et al.⁹⁸, 2000; SUNDE et al.⁸⁵, 2002), fator que contribui para sua sobrevivência durante o preparo biomecânico, demonstrando alta resistência a medicamentos comumente utilizados na terapia (McHUGH et al.⁵¹, 2004), sendo bastante relacionado com os casos de insucessos endodônticos (SUNDQVIST⁸⁶,

1992; GOMES et al.²⁵, 1996; PECIULIENE et al.⁶⁷, 2000; LOVE⁴⁹, 2001; PECIULIENE et al.⁶⁸, 2001; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸², 2002; ADIB et al.¹, 2004, CHÁVEZ DE PAZ et al.¹⁴, 2003; RÔÇAS et al.⁷³, 2004; PINHEIRO et al.⁷⁰, 2004).

A maioria das infecções endodônticas é de natureza polimicrobiana (NAIR et al.⁵⁸, 1987; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸², 2002; SUNDE et al.⁸⁵, 2002), sendo que leveduras podem ser encontradas nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar. Optou-se por *Candida albicans* na contaminação dos espécimes, por ser este microrganismo freqüentemente isolado da cavidade bucal, tornando-se patogênico quando da ocorrência de condições debilitantes do hospedeiro (MURRAY et al.⁵⁶, 2000). Esse microrganismo é comumente encontrado nos canais radiculares de dentes com necrose pulpar (KUBO et al.⁴⁵, 1997; WALTIMO et al.⁹⁷, 1997; SEN et al.⁷⁵, 1999; PECIULIENE et al.⁶⁸, 2001; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸², 2002; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁷⁶, 2004), onde na maioria dos casos está associada a outros microrganismos (WALTIMO et al.⁹⁷, 1997; PECIULIENE et al.⁶⁸, 2001; SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸², 2002).

Trabalhos relataram variados períodos de contaminação dos canais radiculares por microrganismos: 48 horas (VALERA et al.⁹², 2001), cinco dias (WALTIMO et al.⁹⁸, 2000), sete dias (MENEZES et al.⁵³, 2004), 14 dias (SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸³, 2003) e 21 dias (MENEZES⁵², 2005). O período de contaminação adotado após inoculação da suspensão contendo *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* 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 dos microrganismos, pois segundo Menezes et al.⁵² (2005) este é o período de tempo necessário para que a suspensão de microrganismos se difunda em direção ao cemento pelos túbulos dentinários. A contaminação dos canais radiculares foi confirmada por uma coleta de amostras microbiológicas realizada após os 21 dias da

contaminação, na qual foi verificado que todas as raízes estavam contaminadas. Somente após a confirmação da contaminação de 21 dias, iniciou-se a instrumentação dos canais radiculares dos grupos 1 e 2.

A endotoxina utilizada foi de *Escherichia coli*, por ser endotoxina padrão, bastante empregada em experimentos relatados na literatura (GALANOS et al.²³, 1985; BARTHEL et al.⁷, 1997; HAIGHT-PONCE et al.³³, 1999; PETSCH & ANPACH⁶⁹, 2000; OLIVEIRA⁶⁰, 2002; OLIVEIRA et al.⁶², 2003; OLIVEIRA⁶¹, 2005). Galanos et al.²³ (1985) compararam as atividades endotóxicas do lipídeo A quimicamente sintetizado com a endotoxina natural da *Escherichia coli*, apresentando como resultado os mesmos tipos de atividade, podendo ser empregada a endotoxina sintetizada em estudos. Mesmo que *Escherichia coli* não seja uma bactéria comumente isolada de canais radiculares com polpa necrosada, sua endotoxina apresenta estrutura básica, com um componente lipídico não-polar denominado lipídio A (PETSCH & ANPACH⁶⁹, 2000) principal responsável pela atividade endotóxica, sendo que diversos estudos relacionam endotoxinas com as reações teciduais apicais (PITTS et al.⁷¹, 1982; YAMASAKI et al.¹⁰⁰, 1992; MURAKAMI et al.⁵⁵, 2001; HONG et al.³⁴, 2004).

O período de contaminação, após inoculação da endotoxina no interior do canal radicular dos espécimes, foi de 24 horas, pois segundo Oliveira et al.⁶² (2003), este é o período de tempo necessário para que a endotoxina se difunda em direção ao cemento pelos túbulos dentinários. Somente após o período de contaminação de 24 horas, iniciou-se a instrumentação dos canais radiculares dos grupos 3 e 4.

Com relação aos agentes irrigantes, houve interesse em avaliar a água ozonizada na concentração de 24 mg/L de O₃. Esta concentração corresponde ao máximo oferecido pelo aparelho, pois quanto maior dissociação de oxigênio, maior recombinação de espécies radiculares, com maior formação de ozônio (KUNZ et al.⁴⁶, 1999;

CALDERON-GUZMÁN et al.¹³, 2000; HASS & KAYAMAK ³², 2003). A escolha da concentração saturada de ozônio na água foi proposital, pois o objetivo era avaliar a solução sobre microrganismos e LPS, buscando assim o máximo de concentração de ozônio na água que o aparelho poderia oferecer, melhorando assim sua eficiência.

O ozônio pode apresentar efeito maléfico quando inalado em altas concentrações, podendo produzir danos com consequências prejudiciais à saúde em indivíduos saudáveis (DEVLIN et al.¹⁸, 1996; PAZ⁶⁶, 1997; CALDERON-GUZMÁN et al.¹³, 2000; ANDERSON et al.⁵, 2001; BROOK et al.¹¹, 2002). O padrão Nacional de Qualidade do Ar recomenda 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.

A escolha do tempo de ozonização da água (concentração de 24 mg/L O₃), foi referente ao tempo de dois tubos acima do último em que ocorreu crescimento microbiano (tubo de cinco minutos), verificado na fase de avaliação do tempo de ozonização da água destilada necessário para inativar a suspensão dos microrganismos. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Garduno et al.²⁴ (1995), Velano et al.⁹³⁻⁴ (2001, 2002), e Faria et al.²² (2005). De posse destes resultados, foi padronizado o tempo em vinte minutos de ozonização da água destilada, nas demais fases do trabalho. O outro agente irrigante empregado no estudo, foi a solução fisiológica apirogênica e esterilizada (NaCl 0,9%) com a função exclusiva de controle.

Na metodologia da contaminação dos canais radiculares do presente estudo, foram utilizados dentes humanos, já Nagayoshi et al.⁵⁷ (2004) utilizou dentes bovinos e obtiveram diminuição significativa de microrganismos, após preparo biomecânico com a água ozonizada. Os

resultados deste estudo estão de acordo com esses autores, 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 é facilitada.

No estudo de Siqueira Junior et al.⁷⁹ (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 do agente irrigante, tornando a comparação com os resultados do presente trabalho dificultada.

Outro fator importante a ser considerado na efetividade da água ozonizada como agente irrigante durante a terapia endodôntica, é que mesmo sendo bastante efetiva sobre os microrganismos, houve um maior crescimento de *E. faecalis*, em relação a *C. albicans*, provavelmente devido a habilidade do *E. faecalis* em penetrar nos túbulos dentinários, fator que contribui para sua sobrevivência durante o preparo biomecânico, dificultando a ação da solução irrigadora. Komanapalli & Lau⁴⁴ (1998), Baysan et al.⁹ (2000), Calderon-Guzmán et al.¹³ (2000), Velano⁹³ (2001) e Hass & Kayamak³² (2003) já relatavam este fato de que a ação antimicrobiana do ozônio é dependente de várias relações, justificando a ocorrência de diferenças na ação em cada microrganismo.

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 polipropileno do tipo Eppendorf contendo solução fisiológica esterilizada, agitado, e semeado em placas de Petri contendo meio de cultura (SIQUEIRA JUNIOR et al.⁸⁰, 2000; VALERA et al.⁹², 2001). Na coleta imediata (primeira coleta) das amostras de *C. albicans* e *E. faecalis*, o emprego da água ozonizada como agente irrigante dos canais

radiculares, mostrou-se bastante eficiente na redução da população microbiana. Este resultado está de acordo a um estudo similar realizado por Nagayoshi et al.⁵⁷ (2004), que verificaram redução de *E. faecalis* e *S. mutans* inoculados no interior dos canais radiculares de dentes bovinos, sugerindo que a água ozonizada pode ser empregada como agente irrigante durante a terapia endodôntica.

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 instrumentação, e verificada a permanência de microrganismos viáveis no interior dos canais radiculares, permitindo também avaliar o efeito residual dos agentes irrigantes empregados (JEANSONNE & WHITE³⁷, 1994). A água ozonizada não apresentou efeito residual, visto resultado positivo da segunda coleta das amostras de *C. albicans* e *E. faecalis*, comprovando a limitação do emprego da água ozonizada como curativo de espera entre sessões, indicando que microrganismos localizados mais profundamente nos túbulos dentinários, não foram atingidos pela água ozonizada e foram capazes de recolonizar a luz do canal radicular em sete dias.

O método utilizado para detectar endotoxinas no interior dos canais radiculares, foi o método de geleificação do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL), por ser um método simples, rápido, e bastante sensível (PETSCH & ANSPACH⁶⁹, 2000), com capacidade para detectar endotoxina a partir de 0,125 UI/mL. Sendo assim, foi desenvolvido um método capaz de semiquantificar endotoxina restante no conteúdo final do canal radicular, através de escores com base no Quadro 4 (OLIVEIRA⁶¹, 2005), sendo que o conteúdo final do canal radicular em que foi detectada endotoxina, foi diluído várias vezes até não haver mais a formação de gel, dando o resultado em quantidade aproximada. Nos casos, como por exemplo, em que foram necessárias 16 diluições (escore 4) do conteúdo do canal para não haver mais geleificação do lisado,

pôde-se afirmar que a quantidade restante de endotoxina do canal radicular equivale ao intervalo de 1 a 1,999 UI/mL.

De acordo com os resultados obtidos na primeira coleta, a água ozonizada como agente irrigante não apresentou ação sobre LPS, ocorrendo formação de gel duro em todos os espécimes, referente à presença de endotoxina, apresentando valores similares ao grupo controle/LPS, sem diferença estatística. Na segunda coleta, a água ozonizada não reduziu a quantidade de LPS dos espécimes, ocorrendo formação de gel duro em todos, novamente apresentando valores similares ao grupo controle/LPS, sem diferença estatística.

Um outro teste de lisado de Limulus (cromogênico) permite quantificar endotoxinas com maior precisão (HAIGHT-PONCE et al.³³, 1999; KHABBAZ et al.⁴¹⁻², 2000 e 2001), entretanto não foi empregado nesta pesquisa por requerer equipamentos específicos, e ser bastante dispendioso. Porém, para atender a proposta desta etapa da pesquisa, a análise semiquantitativa foi suficiente para verificar se a água ozonizada foi eficiente na neutralização de LPS de *Escherichia coli*.

Foi utilizado também, o teste de produção de anticorpos em cultura de linfócitos B, que é um teste de ativação celular. Um dos efeitos biológicos causados pelas endotoxinas é a ativação de linfócitos B, sendo que estas células na presença de endotoxinas, proliferam e produzem anticorpos, que são detectados pelo teste ELISA.

O teste de produção de anticorpos em cultura de linfócitos B, foi um método de avaliação muito importante na ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *Escherichia coli* inoculado no interior dos canais radiculares, pois na verificação do teste de lisado de Limulus foi constatada presença de LPS, entretanto não saberíamos sem a aplicação deste teste, se esta quantidade restante ainda poderia causar efeitos biológicos, como a ativação celular.

No teste biológico de ativação celular, foram apresentados os valores de densidades ópticas similares entre os grupos 3

(ozônio/LPS) e 4 (controle/LPS), sem diferença estatística tanto na primeira coleta como na segunda, indicando uma produção de anticorpos bastante semelhante entre eles. Porém, foi adicionado nas comparações um grupo de controle celular, contendo apenas a cultura celular pura, sem estimulação pelo conteúdo coletado dos canais radiculares, sendo que este grupo diferiu significativamente dos grupos 3 (ozônio/LPS) e 4 (controle/LPS).

Estes resultados demonstraram que, tanto a água ozonizada, como a solução fisiológica apirogênica, não foram capazes de neutralizar o LPS de *E. coli* inoculado no interior de canais radiculares, e não reduziram sua capacidade de induzir efeitos biológicos.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada, e com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, pôde-se concluir que:

- a) a água destilada ozonizada pelo tempo de 10 minutos apresentou eficiência na eliminação dos microrganismos de uma suspensão contendo *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* ;
- b) a água ozonizada como agente irrigante, reduziu significativamente o número de UFC/mL de uma suspensão contendo *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*, inoculados no interior de canais radiculares;
- c) apesar da redução significativa na primeira coleta dos microrganismos, foi observado aumento nas contagens de UFC/mL de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* após sete dias (segunda coleta), sugerindo que a água ozonizada apresentou pouco efeito residual por este período;
- d) a água ozonizada não foi capaz de neutralizar LPS de *Escherichia coli*, inoculado no interior de canais radiculares, sendo que quantidades restantes de LPS, apresentaram efeitos biológicos (estimulação celular).

8 REFERÊNCIAS *

- 1 ADIB, V.; SPRATT, Y. L.; GULABIVALA, K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. **Int Endod J**, v.37, n.8, p.542-51, 2004.
- 2 AIBEL, K.; STEVENS, R. Effect of chlorhexidine on IL-6 induction by LPS. **J Endod**, v.25, n.4, p.282, Apr. 1999. (Trabalho apresentado na 56ª Seção Anual da Associação Americana de Endodontistas).
- 3 AKPATA, E.S.; BLECHMAN, H. Bacterial invasion of pulp dentin wall in vitro. **J Dent Res**, v.61, n.2, p.435-8, Feb. 1982.
- 4 ALVES, J.; WALTON, R.; DRAKE, D. Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. **J Endod**, v.24, n.9, p.587-91, Sept. 1998.
- 5 ANDERSON, W. et al. Asthma admissions and thunderstorms: a study of pollen, fungal spores, rainfall, and ozone. **Q J M**, v.94, n.8, p.429-33, Aug. 2001.

* Baseado em:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informações e documentação:** referências, elaboração, NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 23p.

- 6 BARROS, L.M.; FIORINI, J.E. Efeito da clorexidina e da água ozonizada sobre os *S. viridans* da placa supragengival. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, v.54, n.1, p.47-52, jan/fev. 2000.
- 7 BARTHEL, C.R. et al. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. **Int Endod J**, v.30, n.3, p.155-9, May 1997.
- 8 BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER JUNIOR, W.A. Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. **J Endod**, v.17, n.8, p.380-3, Aug. 1991.
- 9 BAYSAN, A.; WHILEY, R.A.; LYNCH, E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. **Caries Res**, v.34, n.6, p.498-501, 2000.
- 10 BRADY, J.E.; HUMISTON, G.E. **Química geral**, 2.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996. v.1, p.332.
- 11 BROOK, R.D. et al. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. **Brief Rapid Communications**, 2002. Disponível em: <http://www.hcanc.org.br/ozon1.html>. Acesso em: 30 abr. 2002.
- 12 BUTTLER, T.K.; CRAWFORD, J.J. The detoxifying effect of varying concentrations of sodium hypochlorite on endotoxins. **J Endod**, v.8, n.2, p.59-66, Feb. 1982.
- 13 CALDERON-GUSMÁN, D. et al. El ozono como molécula reactiva. Concepto actual. **Perinatol Reprod Hum**, v.14, n.2, p.115-23, Abr./Jun. 2000.
- 14 CHÁVEZ DE PAZ, L. E. et al. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int Endod J**, v.36, n.7, p.500-8, 2003.

- 15 DAHLÉN, G.; BERGENHOLTZ, G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. **J Dent Res**, v.59, n.6, p.1033-40, June 1980.
- 16 D'ARCANGELO, C.; VARVARA, G.; DE FAZIO, P. An evaluation of the action of different root canal irrigants of facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. **J Endod**, v.25, n. 5, p.351-3, May 1999.
- 17 DEININGER, R.A. et al. Desinfecção del água com ozono. In: Simpósio regional sobre calidad del água: desinfecção efectiva. **XXVI Congreso de la Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental**. Lima, Peru: 27-9 Oct. 1998. Disponível em: <http://www.cepis.ops-oms.org>. Acesso em: 20 mar. 2002.
- 18 DEVLIN, R.B. et al. Time-dependent changes of inflammatory mediators in the lungs of humans exposed to 0.4 ppm ozone for 2 hr: a comparison of mediators found in bronchoalveolar lavage fluid 1 and 18 hr after exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.138, n.111, p.176-85, 1996.
- 19 DIAO, H.F. et al. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. **Process Biochem**, v.39, p.1421-6, 2004.
- 20 ERCAN, E. et al. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. **J Endod**, v.30, n.2, p.84-7, Feb. 2004.
- 21 ESTRELA, C. R. A. et al. Control of microorganisms *in vitro* by endodontic irrigants. **Braz Dent J**, v.14, n.3, p.187-92, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 22 jun. 2004.
- 22 FARIA, I. S. et al. Effects of ozonated water on *Candida albicans* oral isolates. **Braz J Oral Sci**, v.4, n.14, p.783-86, July/Sept. 2005.

- 23 GALANOS, C. et al. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid a express identical endotoxic activities. **Eur J Biochem**, v.148, n.1, p.1-5, Apr. 1985.
- 24 GARDUÑO, P.G. et al. Efectos del agua ozonificada en la placa dentobacteriana. **Assoc Dent Med**, v.52, n.6, p.305-8, nov./dic. 1995.
- 25 GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int Endod J**, v.29, n.2, p.69-75, 1996.
- 26 GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora of biomechanical procedures. **Int Endod J**, v.29, n.4, p.235-41, 1996.
- 27 GOMES, B.P.F.A. et al. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J**, v.34, n.6, p.424-8, 2001.
- 28 GOMES, B. P. F. A. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, v.19, n.2, p.71-6, 2004.
- 29 GUERRA, O.C. et al. Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. **Rev Cubana Estomatol**, v.34, n.1, p.21-4, 1997.
- 30 GÜZEL-SEYDIM, Z.B.; BEVER JUNIOR. P.I.; GREENE, A.K. Efficacy of ozone to reduce bacterial populations in the presence of food components. **Food Microbiol**, v. 21, n.4, p.475-9, 2004.
- 31 GÜZEL-SEYDIM, Z.B.; GREENE, A.K.; SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensm Wiss Technol**, v. 37, n.7, p.453-60, 2004.

- 32 HAAS, C.N.; KAYMAK, B. Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone. **Water Res**, v.37, n.12, p.2980-8, 2003.
- 33 HAIGHT-PONCE, E.; ENDO, H.; HORIUCHI, H. Endotoxin activity measured by limulus assay. **Endod Dent Traumatol**, v.15, n.3, p.109-12, June 1999.
- 34 HONG, C.Y. et al. The role of lipopolysaccharide in infections bone resorption of periapical lesion. **J Oral Pathol Med**, v.33, n.3, p.162-9, Mar. 2004.
- 35 HORIBA, N. et al. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **J Endod**, v.16, n.7, p.331-4, July 1990.
- 36 HORIBA, N. et al. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.71, n.4, p.492-5, Apr. 1991.
- 37 JEANSONNE, M.J.; WHITE, R.R. A comparison of 2,0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. **J Endod**, v.20, n.6, p.276-8, June 1994.
- 38 JIANG, J. et al. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.95, n.3, p.348-54, Mar. 2003.
- 39 JYOTI, K.K.; PANDIT, A.B. Ozone cavitation for water disinfection. **J Biochem Engineering**, v.18, n.1, p.9-19, 2004.
- 40 KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.P.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.20, n.3, p.340-9, Sept .1965.

- 41 KHABBAZ, M.G.; ANASTASIADIS, P.L.; SYKARAS, S.N. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. **Int Endod J**, v.33, n.2, p.132-7, Mar. 2000.
- 42 KHABBAZ, M.G.; ANASTASIADIS, P.L.; SYKARAS, S.N. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.91, n.5, p.587-93, May 2001.
- 43 KIRCHHOFF, V.W.J.H. **Atmosfera terrestre camada de ozônio e raio ultravioletas**. São José dos Campos: INPE/ Laboratório de Ozônio. Disponível em: <http://www.hcanc.org.br/ozon1.html>. Acesso em: 30 abr. 2002.
- 44 KOMANAPALLI, I.R.; LAU, B.H.S. Inactivation of bacteriophage lambda, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.49, n.6, p.766-9, 1998.
- 45 KUBO, C.H.; GOMES, A.P.; JORGE, A.O.C. Isolamento de *Candida* de canais radiculares e verificação de sua sensibilidade a medicamentos utilizados na prática endodôntica. **Rev Odontol UNICID**, v.9, n. 2, p.119-30, jul./dez.1997.
- 46 KUNZ, A. et al. Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório. **Quím Nova**, v.22, n.3, p.1-8, 1999.
- 47 LIMA, K.C. et al. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. **J Endod**, v.27, n.10, p.616-9, Oct. 2001.
- 48 LINDEMANN, R.A.; ECONOMOU, J.S.; ROTHERMEL, H. Production of interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. **J Dent Res**, v.67, n.8, p.1131-5, Aug. 1988.

- 49 LOVE, R.M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**, v.34, n.5, p.399-405, Jul. 2001.
- 50 MATSUSHITA, K. et al. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. **J Endod**, v.25, n.12, p.795-9, Dec. 1999.
- 51 McHUGH, C. et al. pH required to kill *Enterococcus faecalis* *in vitro*. **J Endod**, v.30, n.4, p.218-9, Apr. 2004.
- 52 MENEZES, M. M. **Ação do laser Nd:YAG, soluções irrigadoras e medicamentos sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* semeados em canais radiculares.** 2005. 162 f. Tese (Doutorado em Odontologia, Especialidade Endodontia) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.
- 53 MENEZES, M.M. et al. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **Int Endod J**, v.37, n.5, p.311-9, May 2004.
- 54 MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v.31, n.1, p.1-7, 1998.
- 55 MURAKAMI, Y. et al. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.6, p.321-5, May 2001.
- 56 MURRAY, P.R. et al. *Candida albicans*. In: ____: **Microbiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 66, p.461.

- 57 NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **J Endod**, v.30, n.11, p.778-81, Nov. 2004.
- 58 NAIR, P.N.R. Light and eletron microscope studies of root canal flora and periapical lesions. **J Endod**, v.13, n.1, p.29-39, Jan. 1987.
- 59 OIZUMI, M. et al. *In vitro* testing of a denture cleaning meted using ozone. **J Med Dent Sci**, v.45, n.2, p.135-9, Apr. 1998.
- 60 OLIVEIRA, L.D. **Estudo *in vitro* da efetividade do hidróxido de cálcio e da polimixina B na eliminação das endotoxinas presentes nos canais radiculares**. 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração, Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2002.
- 61 OLIVEIRA, L.D. **Efetividade *in vitro* de agentes irrigantes na neutralização de endotoxinas em canais radiculares**. 2005. 100f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração, Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.
- 62 OLIVEIRA, L.D. et al. Avaliação *in vitro* da capacidade de difusão da endotoxina pelos túbulos dentinários. **Pesq Odontol Bras**, v.17, Supl.2, p.173, 2003 (Trabalho apresentado à 20º Reunião SBPqO - Resumo Pb113).
- 63 ÖNÇAG, O. et al. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. **Int Endod J**, v.36, n.6, p.423-32, 2003.

- 64 PAIVA, J.C.; ANTONIAZZI, J.H. O uso de uma associação de peróxido de uréia e detergente (Tween-80) no preparo químico mecânico dos canais radiculares. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, v.27, n.7, p.416-22, nov./dez. 1973.
- 65 PARASKEVA, P.; LAMBERT, S.D.; GRAHAM, N.J.D. Influence of ozonation conditions on the treatability of secondary effluents. **Ozone Sci Engineering**, v.20, n.2, p.133-50, 1998.
- 66 PAZ, C. Some consequences of ozone exposure on health. **Archs Med Res**, v.28, n.2, p.163-70, Dec. 1997.
- 67 PECIULIENE, V. et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endod**, v.26, n.10, p.593-5, Oct. 2000. Disponível em: <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>. Acesso em: 12 set. 2002.
- 68 PECIULIENE, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J**, v.34, n.6, p.429-34, 2001.
- 69 PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. **J Biotechnol**, v.76, n.2-3, p.97-119, Jan. 2000.
- 70 PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B. Identification of *Enterococci* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions and their antimicrobial susceptibility to different antibiotics. **Int Endod J**, v.37, p.346, 2004. (Trabalho apresentado em 2004 Spring Scientific Meeting of the British Endodontic Society - Abstract).
- 71 PITTS, D.L.; WILLIAMS, B.L.; MORTON JUNIOR, T.H. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. **J Endod**, v.8, n.1, p.10-8, Jan. 1982.

- 72 RESTAINO, L. et al. Efficacy of ozonated water against various food- Related microorganisms. **Appl Environm Microbiol**, v.61, n.9, p.3471-5, Sept. 1995.
- 73 RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v.30, n.5, p.315-20, May 2004.
- 74 RODRIGUEZ, L.M.; CEREPO, M.S.; PERDOMO, E.O. Efectos del ozono en el tratamiento de la gingivoestomatitis herpética aguda. **Rev Cubana Estomatol**, v.31, n.1, p.14-7, Jan./June 1994.
- 75 SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPANBERG, L.S.W. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. **J Endod**, v.25, n.4, p.235-8, Apr. 1999.
- 76 SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; SEN, B.H.; TURKEY, I. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.97, n.5, p.632-41, May 2004.
- 77 SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, *in vitro*. **Int Endod J**, v.30, n.4, p.279-82, 1997.
- 78 SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **J Endod**, v.24, n.6, p.414-6, June 1998.
- 79 SIQUEIRA JUNIOR, J.F. et al. Efeitos antibacterianos de um novo medicamento – o óleo ozonizado – comparados às pastas de hidróxido de cálcio. **Rev Bras Odontol**, v.57, n.4, p.252-6, Jul.-Ago. 2000.

- 80 SIQUEIRA JUNIOR, J. F. et al. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. **J Endod**, v.26, n.6, p.414-6, June 2000.
- 81 SIQUEIRA JUNIOR, J.F et al. Efficacy of instrumentation technique and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. **J Endod**, v.28, n.3, p.181-4, Mar. 2002.
- 82 SIQUEIRA JUNIOR, J. F. et al. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.93, n.2, p.174-8, Feb. 2002.
- 83 SIQUEIRA JUNIOR, J. F. et al. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. **J Endod**, v.29, n.8, p.501-4, Aug. 2003.
- 84 STASHENKO, P. et al. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.18, n.7, p.548-54, Aug. 1991.
- 85 SUNDE, P.T. et al. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. **J Endod**, v.26, n.4, p.304-10, Apr. 2002.
- 86 SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol Immunol**, v.7, n.5, p.257-62, 1992.
- 87 SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod**, v.18, n.9, p.427-30, Sept. 1992.
- 88 SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.78, n.4, p.522-30, Oct. 1994.

- 89 SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, n.1, p.86-93, Jan. 1998.
- 90 TANOMARU, J.M. et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. **J Endod**, v.36, n.11, p.733-9, 2003.
- 91 TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; CERVONE, F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. **Endod Dent Traumatol**, v.6, n.2, p.73-7, 1990.
- 92 VALERA, M.C.; REGO, J.M.; JORGE, A.O.C. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. **J Endod**, v.27, n.6, p.401-8, June 2001.
- 93 VELANO, H.E. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesq Odontol Bras**, v.15, n.1, p.18-22, jan./mar. 2001.
- 94 VELANO, H.E. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente a *Escherichia coli*. **Rev Bras Clín Terap**, v.28, n.6, p.28-6, Nov. 2002.
- 95 VIANNA, M. E. et al. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.97, n.1, p.79-84, Jan. 2004.
- 96 VILLEGAS, D.H. et al. El ozono como agente bactericida en la atmósfera. **Rev Inst Nal Ení Resp Méx**, v.8, n.3, p.192-5, July/Sept. 1995.

- 97 WALTIMO, T.M.T. et al. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **Int Endod J**, v.30, n.2, p.96-101, 1997.
- 98 WALTIMO, T.M.T. et al. *In vitro* yeast infection of human dentin. **J Endod**, v.26, n.4, p.207-9, Apr.2000.
- 99 WANG, C.; STASHENKO, P. The role of interleukin-1 α in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. **Oral Microbiol Immunol**, v.8, n.1, p.50-6, Feb.1993.
- 100 YAMASAKI, M. et al. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. **J Endod**, v.18, n.10, p.501-4, Oct. 1992.

Anexo A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

	 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA
	
Comitê de Ética em Pesquisa-Local	
São José dos Campos, 29 de novembro de 2005	
Ofício nº 076/05-CEP	

Prezado(a) Sr.(a)	MARCELO GONÇALVES CARDOSO
Projeto	ESTUDO IN VITRO DA EFETIVIDADE DA ÁGUA OZONIZADA COMO SOLUÇÃO IRRIGADORA NA ELIMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS E ENDOTOXINAS DO CANAL RADICULAR
Parecer	
	Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a <u>ALTERAÇÃO DO TÍTULO</u>, passando para ESTUDO DA EFICIÊNCIA DA ÁGUA OZONIZADA COMO SOLUÇÃO IRRIGADORA NA ELIMINAÇÃO DE CANDIDA ALBICANS, ENTEROCOCCUS FAECALIS E ENDOTOXINAS DO CANAL RADICULAR Convalidando dessa forma o Protocolo nº 095/2004-PH/CEP, emitido em 07/12/2004

Sem mais, despedimos atenciosamente,


Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Apêndice A - Dados complementares da etapa da ação antimicrobiana da água ozonizada sobre suspensão de *C. albicans* e *E. faecalis* inoculada no interior dos canais radiculares

Tabela 17 - Teste de normalidade dos resultados de crescimento de *C. albicans* e *E. faecalis* (Método de Anderson Darling - 5% de significância)

Grupos	p-value	Normalidade
Ozônio - <i>C. albicans</i> / Primeira coleta	<0,005	NN
Ozônio - <i>C. albicans</i> / Segunda coleta	<0,005	NN
Ozônio - <i>E. faecalis</i> / Primeira coleta	0,045	NN
Ozônio - <i>E. faecalis</i> / Segunda coleta	0,072	N
Controle - <i>C. albicans</i> / Primeira coleta	<0,005	NN
Controle - <i>C. albicans</i> / Segunda coleta	0,020	NN
Controle - <i>E. faecalis</i> / Primeira coleta	<0,005	NN
Controle - <i>E. faecalis</i> / Segunda coleta	0,302	N

NN – distribuição não normal a 5% de significância

N – distribuição normal a 5% de significância

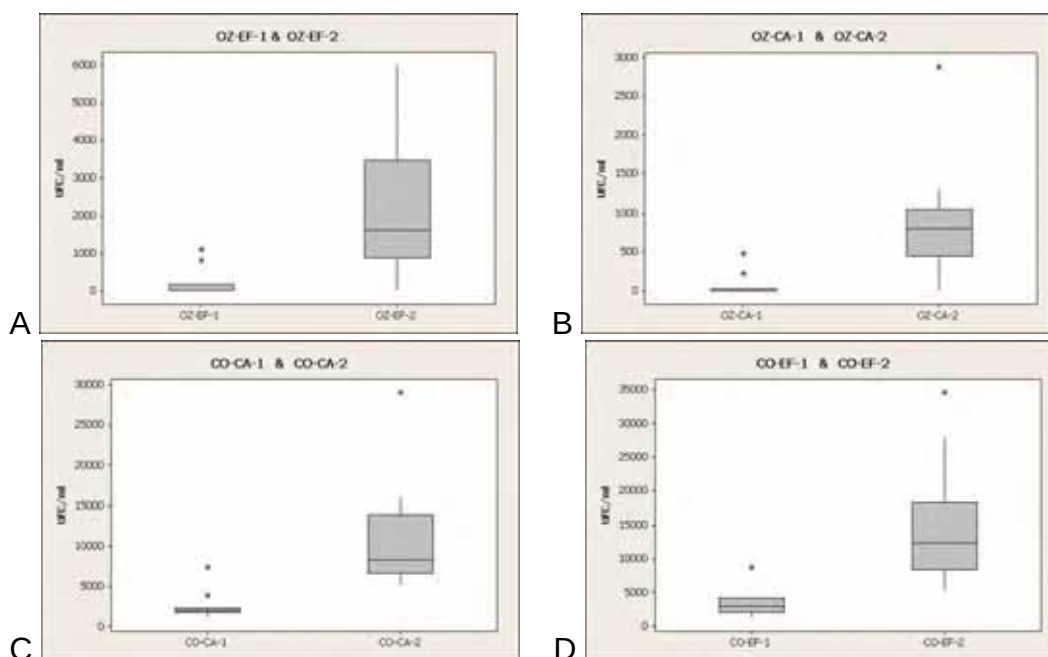


Figura 14 - Box-Plot referentes à comparação entre grupos na primeira e segunda coleta. A) ozônio - *E. faecalis*; B) ozônio - *C. albicans*; C) controle - *C. albicans*; D) controle - *E. faecalis*.

Apêndice B – Resultados positivos do teste lisado de amebócito de *Limulus*, na ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *E. coli* inoculado no interior dos canais radiculares

Tabela 18 - Resultado para cada espécime do teste lisado de amebócito de *Limulus*, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo submetido ao tratamento endodôntico com água ozonizada (grupo ozônio/LPS)

Amostras do Grupo 3 Ozônio/LPS	LPS de <i>E. coli</i>	
	Primeira coleta	Segunda coleta
O/LPS 1	+	+
O/LPS 2	+	+
O/LPS 3	+	+
O/LPS 4	+	+
O/LPS 5	+	+
O/LPS 6	+	+
O/LPS 7	+	+
O/LPS 8	+	+
O/LPS 9	+	+
O/LPS 10	+	+
O/LPS 11	+	+
O/LPS 12	+	+

Tabela 19 - Resultado para cada espécime do teste lisado de amebócito de *Limulus*, após a primeira e segunda coleta de amostras do grupo submetido ao tratamento endodôntico com solução fisiológica apirogênica (grupo controle/LPS)

Amostras do Grupo 4 Controle/LPS	LPS de <i>E. coli</i>	
	Primeira coleta	Segunda coleta
C/LPS 1	+	+
C/LPS 2	+	+
C/LPS 3	+	+
C/LPS 4	+	+
C/LPS 5	+	+
C/LPS 6	+	+
C/LPS 7	+	+
C/LPS 8	+	+
C/LPS 9	+	+
C/LPS 10	+	+
C/LPS 11	+	+
C/LPS 12	+	+

Apêndice C – Box-Plot referente aos dados da densidade óptica (DO), do teste imunoenzimático na ação da água ozonizada na neutralização de LPS de *E. coli* inoculado no interior dos canais radiculares (primeira e segunda coleta)

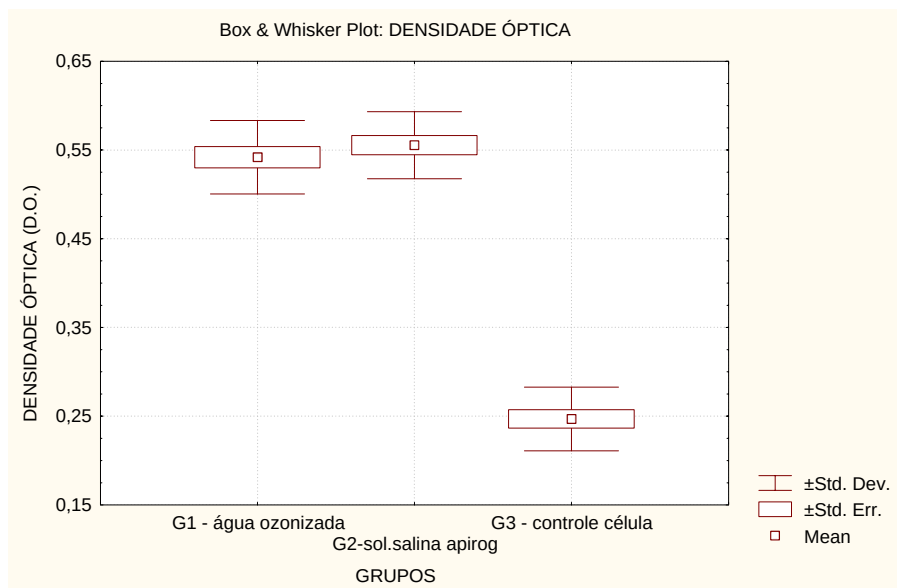


FIGURA 15 - Box-Plot referente aos dados da densidade óptica (DO), segundo o teste imunoenzimático - ELISA, na coleta imediata.

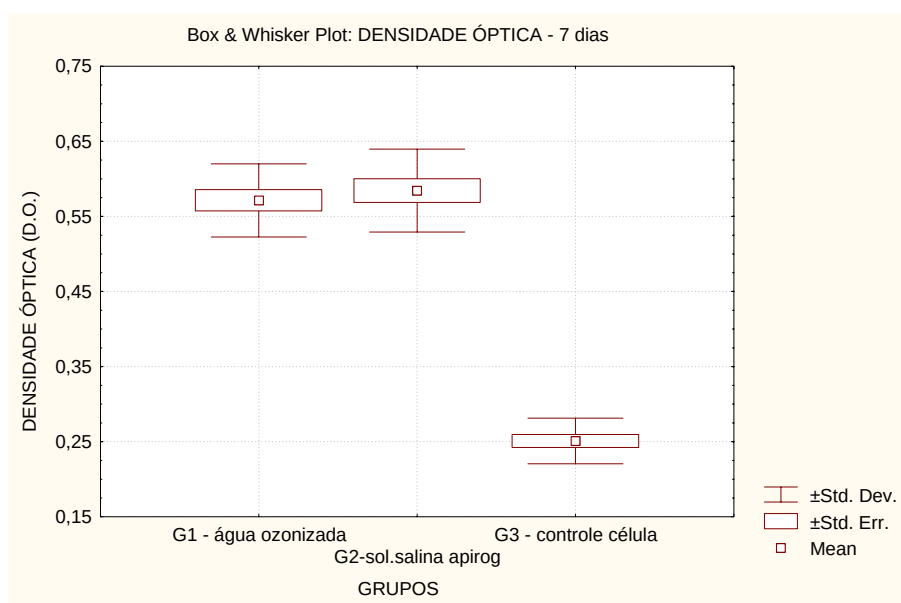


FIGURA 16 - Box-Plot referente aos dados da densidade óptica (DO), segundo o teste imunoenzimático - ELISA, na segunda coleta.

CARDOSO, M.G. **Study of the efficiency of ozonized water as an irrigant solution when eliminating *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and endotoxins from the root canal.** 2006. 132f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

ABSTRACT

*At first, the study was to evaluate the antimicrobial action of the ozonized water before the suspension composed of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*, checking the necessary time of ozonization of the water in order to eliminate these microorganisms. In the next stages, the efficiency of ozonized water as an irrigant agent was evaluated, during the biomechanical preparation, as in the elimination of *C. albicans* and *E. faecalis*, as well as in the neutralization of *Escherichia coli* LPS inoculated into the root canals. Were used 48 single-rooted human teeth, seeing that in the root canals of 24 specimens, it were inoculated 20 µL of a suspension containing *C. albicans* and *E. faecalis*, and on the other 24 specimens, it were inoculated 10 µL of *Escherichia coli* LPS, having been checked the action of the ozonized water as an irrigant agent during the biomechanical preparation. Collections of samples (immediately and after seven days of the instrumentation) were carried out, and the data was submitted to statistical analysis. As a result, one could observe that the antimicrobial action of the ozonized water for ten minutes was effective before the microbial solution. As an irrigant agent during the biomechanical preparation, the ozonized water presented effectiveness before the suspension of *C. albicans* and *E. faecalis* inoculated into the root canals in the immediate collection, however, in the second collection it presented little residual effect. When verifying the endotoxin neutralization, the action of the ozonized water as an irrigant agent did not present effectiveness in the neutralization of *E. coli* LPS inoculated in the root canals, seeing that the remaining quantities of LPS presented biological effects. It was concluded that, the ozonized water was efficient in the reduction of *C. albicans* and *E. faecalis* inoculated inside the root canals, but it did not present any effect over *E. coli* LPS.*

KEY WORDS: Ozone; water; therapeutic use; *Candida albicans*; *Enterococcus faecalis*; *Escherichia coli* LPS.