CARLOS GOES NOGALES

Parâmetros da ação antimicrobiana e da citotoxicidade do ozônio para aplicação na Endodontia

São Paulo

2011

CARLOS GOES NOGALES

Parâmetros da ação antimicrobiana e da citotoxicidade do ozônio para aplicação na Endodontia

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. João Humberto Antoniazzi

São Paulo
2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Nogales, Carlos Goes

Parâmetros da ação antimicrobiana e da citotoxidade do ozônio para aplicação na Endodontia [versão original] / Carlos Goes Nogales; orientador João Humberto Antoniazzi. -- São Paulo, 2011.

116. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Desinfecção do canal radicular - Ozônio. 2. Tratamento do canal radicular. I. Antoniazzi, João Humberto. II. Título.

Nogales, CG. Parâmetros da ação antimicrobiana e da citotoxicidade do ozônio para aplicação na Endodontia. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que me serviram de base, que me sustentaram nos momentos de fraqueza e comemoram juntos os momentos de alegria e vitória:

À minha esposa ***Marina Beloti Ferreira***, em TODOS os momentos – juntos, parceiros. Escalamos mais uma montanha e agora podemos compartilhar mais essa vitória. Graças a você, minha escalada ficou muito mais fácil. TE AMO DEMAIS e MUITO OBRIGADO!!!

Aos meus pais ***Carlos Nogales Ortiz, Nancy Goes Nogales e minha querida irmã Erica Goes Nogales*** – vocês são meu porto seguro. Eternamente grato pelo apoio, suporte e pela lição de caráter que me orienta no caminho certo.

Ao meu grande AMIGO Dr. Fernando Cerbara, obrigado pela compreensão, apoio e suporte. Sem sua participação e torcida, a realização deste sonho não seria possível.

Aos meus AMIGOS de pós-graduação Brígida Kleine, Rafael Paiva, Luciana Blanck, Guilherme Martins, Nilton Azambuja e Thiago Brum, dividimos privações, gaguejadas, estresse, noites em claro, mas estamos chegando ao cume da montanha com a sensação de dever cumprido. Valeu a pena toda essa caminhada para semearmos o nosso futuro, a partir de agora estamos prontos para colher os frutos.

À Ana Maria, Soninha e ao Sr. Aldo ficam os meus mais sinceros agradecimentos pela amizade, por toda a ajuda prestada; pessoas especiais que ficarão na lembrança pelo resto da vida.

Ao GRANDE Dr Edson Cesar Philippi (*in memoriam)* – ser humano iluminado cuja paixão pela ozonioterapia plantou diversas sementes. Tenho a honra em ser um

dos frutos do qual seu conhecimento contagiou e impulsionou na descoberta e aprimoramento da terapia.

À minha irmã ozonioterapeuta Letícia Philippi que tanto apoiou a realização deste trabalho. Seu entusiasmo, alegria e paixão pelo ozônio transmitem força e empolgação para trilhar caminhos desconhecidos no conhecimento do ozônio.

À Associação Brasileira de Ozonioterapia, fruto de um sonho, um ideal de vários profissionais que lutam pela aplicação médica e odontológica do ozônio no Brasil.

AGRADECIMENTOS

À maior fonte de Luz, que tanto me apoia, me inspira e me conduz pela busca da serenidade, da paz interior e da evolução – ***DEUS*.** Obrigado por colocar as pessoas certas, nas horas certas em meu caminho.

Prof Dr João Humberto Antoniazzi – recebeu de braços abertos a proposta deste trabalho e na figura de um Professor, na essência da palavra, colaborou de forma fundamental para esta conclusão.

Prof Dr José Luiz Lage-Marques – sua ajuda inestimável me deu forças para levantar a cabeça e ver que os momentos de dúvida e fraqueza são, na realidade, oportunidades de crescimento.

Prof Dr Antonio Carlos Bombana (*in memoriam)* – pessoa iluminada que deixou seu brilho e entusiasmo pelo tema. Ensinou não apenas a Odontologia, mas a arte da humildade e da serenidade. Saudades!

"O professor que caminha pelo tempo, entre seus discípulos, não dá a sua sabedoria, mas antes a sua fé e amor. Se for sábio, não vos convida a entrar na casa de sua sabedoria, mas antes vos conduz ao limiar do vosso próprio espírito." Khalil Gibran

Ao meu professor na microbiologia e AMIGO Antonio Fernando Montemor:

"O vosso amigo é as respostas às vossas necessidades. Ele é o campo que cultivais com amor e colheis com gratidão. E esse é vosso apoio e abrigo." Khalil Gibran

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), na figura da Profª Drª Maria Filomena de Andrade Rodrigues. Obrigado por ter me proporcionado todas as condições de trabalho para a realização deste experimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste trabalho (protocolo 06/04205-2)

Tua caminhada ainda não terminou....
A realidade te acolhe
dizendo que pela frente
o horizonte da vida necessita
de tuas palavras
e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades,
lembra-te da fantasia e
sonha com tua próxima vitória.
Vitória que todas as armas do mundo
jamais conseguirão obter,
porque é uma vitória que surge da paz
e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações
tempestuosas novamente,
mas haverá de ver sempre
o lado bom da chuva que cai
e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem.
Atender a quem te chama é belo,
lutar por quem te rejeita
é quase chegar a perfeição.
A juventude precisa de sonhos
e se nutrir de lembranças,
assim como o leito dos rios
precisa da água que rola
e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

RESUMO

Nogales CG. Parâmetros da ação antimicrobiana e da citotoxicidade do ozônio para aplicação na Endodontia [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2011. Versão Original.

Este estudo analisou a ação do ozônio como coadjuvante à terapia endodôntica. Assim, (I) avaliou da eficiência da água ozonizada na redução microbiana realizada sobre suspensão bacteriana de *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus* – estudo *in vitro;* (II) testou a eficiência da água ozonizada e o gás ozônio na redução microbiana realizada em canais radiculares contaminados – estudo *ex vivo*; e, (III) avaliou a reação biológica de cultura de fibroblastos sob aplicação do ozônio pelo método MTT. Inicialmente a água ozonizada nas concentrações de 5, 20 e 40 µg/mL foi aplicada diretamente sobre as suspensões bacterianas separadamente por um minuto. Em seguida, foram feitas diluições seriadas e o plaqueamento para posterior contagem das UFC/mL. Na segunda parte, 180 dentes foram inoculados com 10 µL das suspensões bacterianas separadamente e incubados por 7 dias. Em seguida foram submetidos aos grupos experimentais: Grupo I: controle de contaminação; Grupo II: instrumentação rotatória associando o hipoclorito de sódio 1% ao Endo-PTC gel e irrigação final com EDTA-T; Grupo III: protocolo semelhante ao Grupo II com a aplicação final do gás ozônio na concentração de 40 µg/mL; e, Grupo IV: protocolo semelhante ao Grupo II com a irrigação final com a água ozonizada na concentração de 40 µg/mL. Na sequencia de cada grupo foi feita coleta microbiológica, diluição seriada e plaqueamento por 24 horas e contagem das UFC/mL. Na terceira parte, a análise da viabilidade celular dos fibroblastos. O PBS foi ozonizado nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL e aplicado sobre as células. Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística pelo método de Kruskal-Wallis, complementado pelo método de Dunn ($p<0.05$). A primeira parte do estudo mostrou que o *E. faecalis* apresentou crescimento nas concentrações de 5 e 20 µg/mL. Na análise da *P. aeruginosa* e o *S. aureus* não foi possível detectar UFC/mL. Já no estudo *ex vivo*, o Grupo IV foi o mais efetivo contra os microrganismos testados, com diferença estatística para os demais grupos, quando dos dentes contaminados com a *P. aeruginosa*. O estudo da

viabilidade mostrou que o ozônio, em 0 horas, ocasionou uma queda na viabilidade celular que foi revertida nos demais tempos experimentais. A concentração de 40 µg/mL foi a que proporcionou maior estímulo ao final da avaliação, com diferença estatística significante ao Grupo Controle. Diante das metodologias aplicadas, pode-se concluir que (I) a concentração de 40 µg/mL foi a mais efetiva para reduzir o número dos microrganismos testados; (II) o protocolo instituído para a fase de preparo químico cirúrgico que associou a terapia tradicional com a água ozonizada na concentração de 40 µg/mL foi o mais efetivo; (III) o ozônio em contato com os fibroblastos de gengiva, inicialmente causou diminuição na viabilidade celular, que foi revertida nos tempos experimentais subsequentes. A concentração de 40 µg/mL foi a que causou maior redução no número de células viáveis, porém foi a que proporcionou maior estímulo ao final do experimento, mostrando-se biocompatível com a linhagem celular testada; e, (IV) diante do conjunto dos dados experimentais, a água ozonizada na concentração de 40 µg/mL, comparada com as demais concentrações testadas, é a que apresenta melhor desempenho quanto ao seu poder antimicrobiano e biocompatibilidade, justificando sua inserção no arsenal clínico na terapia endodôntica.

Palavras-chave: Ozônio. Água ozonizada. Tratamento endodôntico.

ABSTRACT

Nogales CG. Parameters of the antimicrobial activity and cytotoxicity of ozone for use in Endodontics [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Original.

This study analyzed the action of ozone as an adjunct to endodontic therapy. So (I) evaluated the effectiveness of ozonated water in microbial reducing performed on bacterial suspension of *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* - *in vitro* study (II) tested the efficiency of ozone gas and ozonated water in reducing microbial held in contaminated root canals - *ex vivo* study, and (III) evaluated the biological response of fibroblasts culture in the application of ozone, according to MTT method. In the first part of the experiment the ozonated water at concentrations of 5, 20 and 40 µg/mL was placed in direct contact with the bacterial suspensions separately for one minute. Then, serial dilutions were made for plating and subsequent counting of CFU/mL. In the second part, 180 teeth were inoculated with 10 µL of bacterial suspensions and incubated separately for 7 days. They were then subjected to experimental groups: Group I: contamination control, Group II: rotary instrumentation combining 1%sodium hypochlorite and gel Endo-PTC, final irrigation with EDTA-T, Group III: similar protocol to Group II with final application of ozone gas in concentration of 40 µg/mL, and Group IV: protocol similar to Group II with a final irrigation with ozonated water at concentration of 40 µg/mL. Following each group was done microbiological collecting and serial dilution and plating for 24 hours and subsequent counting of CFU/mL. In the third part, the analysis of cell viability of gingival fibroblasts was performed by MTT method. The PBS has been ozonized at concentrations of 10, 20 and 40 µg/mL and applied on the cells. Data were tabulated and analyzed statistically by Kruskal-Wallis method, complemented by Dunn's method ($p < 0.05$). The first part of the study showed that *E.faecalis* grew in concentrations of 5 and 20 µg/mL. The *P. aeruginosa* and *S. aureus* were susceptible to all three concentrations of ozonated water, it was not possible to detect CFU/mL. In the second part of the study, the Group IV was the most effective against the tested microorganisms, with statistical difference for the

other groups, especially when the teeth were infected with *P. aeruginosa*. Finally, the third part of the study showed that ozone, at 0 hours, caused a decrease in cell viability that was reversed in the other experimental times. The concentration of 40 µg/mL provided the greatest stimulus on the final evaluation period, with statistically significant difference to the control group. Given the methodologies applied, it can be concluded that (I) the concentration of 40 µg/mL was most effective at reducing the number of microorganisms, (II) the protocol established for the standard chemical preparation stage associated with ozonated water at a concentration of 40 µg/mL was the most effective, (III) the ozone in contact with the gingival fibroblasts, initially caused a decrease in cell viability, which was reversed in subsequent experimental times. The concentration of 40 µg/mL was the one that caused a greater reduction in the number of viable cells, however, was that provided the greatest stimulus to the end of the experiment and proved to be biocompatible with the cell line tested, and (IV) on the set of experimental data, the ozonated water at a concentration of 40 µg/mL , compared with the other concentrations tested, it has the best performance in terms of its biocompatibility and antimicrobial power, justifying their inclusion in the clinical arsenal in endodontic therapy.

Keywords: Ozone. Ozonated water. Endodontic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Estrias da *P. aeruginosa, S. aureus* e *E. faecalis* em meio sólido TSA 55

Figura 4.2 - Meio de cultura TSB turvo com o crescimento bacteriano da *P. aeruginosa, S. aureus* e *E. faecalis* 56

Figura 4.3 - Plaqueamento por gota nas placas de Petri previamente à incubação em estufa 37°C 57

Figura 4.4 - Sistema utilizado para produção do gás ozônio e da água ozonizada 58

Figura 4.5 - Confirmação da concentração do ozônio na água bidestilada (CHEMets® Kit Ozone K-7402) 59

Figura 4.6 - Amostras experimentais e respectivos controles dos grupos: I (A); II (B); e, III (C) 61

Figura 4.7 - Placa de poliestireno com os dentes incluídos em resina quimicamente ativada 64

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Gêneros bacterianos encontrados nas infecções endodônticas primária e secundária e/ou persistente (Siqueira Jr., 2002)..... 25

Quadro 4.1 - Densidade óptica (DO) por absorbância (ABS) para ajuste da concentração das suspensões bacterianas..... 56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Representação gráfica da média aritmética do crescimento do *E. faecalis*.....72

Gráfico 5.2 - Representação da redução da *P.aeruginosa* pelos grupos experimentais.....73

Gráfico 5.3 - Representação gráfica da redução do *S. aureus* pelos grupos experimentais.....74

Gráfico 5.4 - Média aritmética dos grupos experimentais sobre *E. faecalis*.....76

Gráfico 5.5 – Média aritmética dos grupos experimentais sobre *S. aureus*.....77

Gráfico 5.6 - Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre *P. aeruginosa*.....78

Gráfico 5.7 - Média aritmética do Grupo I sobre os três microrganismos testados.....80

Gráfico 5.8 - Média aritmética do Grupo II sobre os três microrganismos testados.....81

Gráfico 5.9 - Média aritmética da ação do grupo III sobre os microrganismos testados.....83

Gráfico 5.10 - Média aritmética do Grupo IV sobre os microrganismos testados 84

Gráfico 5.11 - Média aritmética da redução microbiana proporcionada pelos diferentes grupos experimentais..... 85

Gráfico 5.12 - Viabilidade das células de fibroblastos, médias percentuais, em contato com o ozônio em diferentes concentrações em relação aos

tempos experimentais.....87

Gráfico 5.13 - Médias percentuais da viabilidade celular dos fibroblastos frente à exposição ao ozônio na concentração de 10 μg/mL, nos respectivos tempos experimentais.....88

Gráfico 5.14 - Médias percentuais da viabilidade celular dos fibroblastos frente à exposição do ozônio na concentração de 20 μg/mL, nos respectivos tempos experimentais.....89

Gráfico 5.15 - Médias percentuais da viabilidade celular dos fibroblastos frente à exposição do ozônio na concentração de 40 /mL, nos respectivos tempos experimentais.....90

Gráfico 5.16 - Médias percentuais da viabilidade dos fibroblastos de gengiva em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 0 hora.....91

Gráfico 5.17 - Viabilidade celular dos fibroblastos em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 24 horas.....92

Gráfico 5.18 - Viabilidade celular dos fibroblastos em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 48 horas.....93

Gráfico 5.19 - Viabilidade celular dos fibroblastos em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 72 horas.....94

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Relação da concentração de ozônio produzido pelo gerador e o absorvido pela água..... 71

Tabela 5.2 - Média aritmética do crescimento do *E. faecalis* nos grupos experimentais.....72

Tabela 5.3 - Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre *P.aeruginosa*..... 73

Tabela 5.4 - Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *S. aureus*..... 73

Tabela 5.5 - Quantidade de tubos contendo meio de cultura TSB que apresentaram turvamento após 7 dias de incubação em estufa 37°C..... 75

Tabela 5.6 - Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *E. faecalis*..... 75

Tabela 5.7 - Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *S. aureus*..... 77

Tabela 5.8 - Média dos postos e valor crítico da análise estatística da redução microbiana do *S. aureus* proporcionada pelos grupos experimentais..... 77

Tabela 5.9 - Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre *P. aeruginosa*..... 78

Tabela 5.10 - Média dos postos e valor crítico da análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn da redução microbiana da *P. aeruginosa* proporcionada pelos grupos experimentais.....79

Tabela 5.11 - Média aritmética relativa ao Grupo I – controle de contaminação.....80

Tabela 5.12 - Média aritmética do Grupo II sobre os três microrganismos testados.....81

Tabela 5.13 - Média dos postos e valor crítico da ação antimicrobiana do Grupo II.....82

Tabela 5.14 - Média aritmética da ação do grupo III sobre os microrganismos testados.....82

Tabela 5.15 - Média dos postos e valor crítico da ação antimicrobiana do Grupo III.....83

Tabela 5.16 - Média aritmética do Grupo IV sobre os microrganismos testados 84

Tabela 5.17 - Média aritmética da redução do conjunto de microrganismos proporcionada pelos diferentes grupos experimentais.....85

Tabela 5.18 - Média dos postos e valor crítico dos grupos experimentais sobre os conjuntos de microrganismos testados.....86

Tabela 5.19 - Média em percentual de viabilidade celular de fibroblastos frente às concentrações de ozônio nos tempos experimentais testados.....86

Tabela 5.20 - Média percentual e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos quando expostos ao ozônio na concentração de 10 μg/mL.....88

Tabela 5.21 - Média dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos quando expostos ao ozônio na concentração de 20 μg/mL, diante do teste estatístico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn.....89

Tabela 5.22 - Média dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos quando expostos ao ozônio na concentração de 40 μg/mL.....90

Tabela 5.23 - Média dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 0 horas.....91

Tabela 5.24 - Média percentual e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 24 horas.....92

Tabela 5.25 - Média percentual e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 48 horas.....93

Tabela 5.26 - Média dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 72 horas.....94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....20

2 REVISÃO DA LITERATURA.....23

2.1 ASPECTOS DA INFECÇÃO ENDODÔNTICA.....24

2.2 AÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NA SANIFICAÇÃO DO SISTEMA ENDODÔNTICO.....26

2.2.1 Ação antimicrobiana 26

2.2.2 Associação de substâncias na permeabilidade dentinária 36

2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO OZÔNIO.....37

2.3.1 Histórico.....38

2.3.2 Ozonioterapia.....39

2.3.3 Estudo da ação antimicrobiana do ozônio.....40

2.3.4 O ozônio e suas propriedades estimuladoras 47

2.3.4.1 Estudos da ação biológica do ozônio.....48

3 PROPOSIÇÃO.....51

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 53

5 RESULTADOS.....70

6 DISCUSSÃO.....95

7 CONCLUSÃO.....107

REFERÊNCIA.....109

ANEXO.....115

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A fase de preparo do sistema endodôntico compreende um importante passo na prevenção e cura da periodontite apical. O objetivo desta etapa é promover a limpeza e desinfecção por meio da utilização de substâncias químicas e associações que atuem diretamente sobre a permeabilidade dentinária, expondo o sistema de canais radiculares à ação antimicrobiana da solução irrigante. Complementando a sanificação, instrumentos endodônticos removem cirurgicamente parte da dentina contaminada, seguida da irrigação/aspiração e, assim pode ser complementada pela medicação intracanal.

É fundamental o conhecimento da ação das substâncias químicas e medicamentosas, possibilitando que se eleja entre uma e outra. Dessa forma, devem obrigatoriamente apresentar ação antimicrobiana aliada à biocompatibilidade, para não atuar como agente agressor aos tecidos periapicais.

Nos quadros de necrose pulpar associado à infecção, a característica da microbiota é conhecidamente de caráter mista. Tal fato exige que as substâncias químicas em uso apresentem amplo espectro de ação, atuando sobre anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, Gram-positivos e Gram-negativos.

Previamente a inserção de qualquer substância química no arsenal clínico do cirurgião dentista, é necessária uma análise criteriosa da ação antimicrobiana e a biocompatibilidade, em testes sobre a ação em cultura de células em ensaios *in vitro*. Tais resultados devem ser reprodutíveis tornando–os previsíveis e controlados, fornecendo ao clínico embasamento para selecionar a substância química ideal.

O ozônio apresenta-se como um promissor aliado à terapia endodôntica. Graças a sua ação oxidante, atua especificamente sobre os ácidos graxos poliinsaturados da membrana bacteriana, aumenta a oferta de oxigênio tecidual e modula o sistema imune possibilitando uma melhora e aceleração na reparação tecidual.

Nas áreas da Odontologia e Medicina, pode-se utilizar o gás *in natura* ou associá-lo a um veículo com a finalidade de retardar a instabilidade. Tal efeito está

diretamente vinculado aos fatores como temperatura, pressão, pH e viscosidade do meio. Quanto mais baixa a temperatura e viscoso o meio maior será a durabilidade do ozônio. Entretanto, as formas mais eficientes de aplicação encontram-se na forma *in natura* e no ozônio diluído em água bidestilada resfriada.

Dentro deste contexto, a inserção do ozônio como um coadjuvante na prática da Endodontia, parece oportuna. A escolha se dá pela capacidade da molécula em promover efeitos biológicos, estimulando a reparação tecidual, cura e retorno do dente a sua função, cumprindo o objetivo da terapia endodôntica.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS DA INFECÇÃO ENDODÔNTICA

Embora fatores físicos e químicos possam estar envolvidos, é essencial a participação do microrganismo na etiopatogenia das patologias pulpares e perirradiculares, exercendo papel de extrema relevância na indução e perpetuação de processos inflamatórios na polpa e periápice.

A associação de microrganismos com as doenças pulpares e perirradiculares foi inicialmente proposta por Miller (1894). Em estudo clássico, por meio de esfregaço do material coletado de canais radiculares infectados observou os três tipos morfológicos básicos de células bacterianas: cocos, espirilos e bacilos. Concluiu também que havia outras espécies não passíveis de cultivo por conta da limitação de técnica da época, abrindo precedente para um campo de pesquisa intenso que se desenhou desde então.

Kakehashi et al. (1965) estabeleceram definitivamente a relação causa-efeito entre bactérias e doença pulpar e perirradicular. Neste estudo expuseram a polpa dental de ratos *germ-free* e não *germ-free* ao meio bucal e analisaram a resposta pelo método histológico. Concluíram que nos ratos não *germ-free* houve necrose pulpar com perda óssea periapical e nos ratos *germ-free* houve formação da ponte de dentina reparando a polpa.

Siqueira Jr (2002) divide a infecção endodôntica, basicamente em três tipos diferentes, a saber: infecção endodôntica primária ou periodontite apical primária, infecção endodôntica secundária ou periodontite apical secundária e infecção endodôntica persistente ou periodontite apical secundária persistente. A periodontite apical primária é caracterizada pelo dente portador de necrose pulpar com evidência radiográfica de perda óssea e não submetido a tratamento endodôntico prévio. Apresenta um grande número de espécies bacterianas com predomínio dos anaeróbios estritos Gram-negativos.

Ainda com o estudo de Siqueira Jr (2002), a periodontite apical secundária acomete dentes já tratados endodonticamente, entretanto tecnicamente mal qualificados, ou seja, nota-se que os conceitos básicos pertinentes a uma boa endodontia não foram seguidos e a imagem radiolúcida periapical é presente. A microbiota nesses casos aproxima-se muito da periodontite apical primária, pois o tratamento prévio não sendo bem realizado, pouco altera o perfil microbiológico da infecção já instalada. É dado o nome de periodontite apical secundária persistente aos dentes já tratados endodonticamente e, ao contrário da periodontite apical secundária, tecnicamente bem qualificados. A microbiota difere no sentido que poucas espécies bacterianas são encontradas e com predominância de anaeróbios facultativos Gram-positivos.

O quadro 2.1 ilustra claramente os gêneros bacterianos encontrados nos diferentes tipos de infecção endodôntica (Siqueira Jr, 2002).

Infecção Primária	**Infecção Secundária e/ou Persistente**
Bacteroides	Enterococcus
Treponema	Actinomyces
Prevotela	Streptococcus
Porphyromonas	Candida
Fusobacterium	Propionibacterium
Peptostreptococcus	Staphylococcus
Streptococcus	Pseudomonas
Eubacterium	
Actinomyces	
Campylobacter	
Enterococcus	

Quadro 2.1 - Gêneros bacterianos encontrados nas infecções endodônticas primária e secundária e/ou persistente (Siqueira Jr., 2002)

Sassone et al. (2007) alertam que a grande maioria das células bacterianas encontra-se na luz do canal e na dependência do tempo da infecção instalada pode ser encontrada nos túbulos dentinários.

2.2 AÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS NA SANIFICAÇÃO DO SISTEMA ENDODÔNTICO

Diante da importância, dificuldade de eliminação e da freqüência com que os microrganismos anaeróbios facultativos são encontrados nos casos de infecção endodôntica, inúmeros trabalhos estudaram a melhor forma de eliminá-los, propondo diferentes substâncias químicas com diferentes concentrações. O condicionamento do sistema endodôntico por meio do aumento da permeabilidade dentinária facilita e potencializa a ação das substâncias químicas com poder antimicrobiano favorecendo a eliminação destes patógenos.

2.2.1 Ação antimicrobiana

Fazendo uso do método de difusão em Agar, Siqueira Jr et al. (1998) avaliaram a efetividade de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (4%, 2,5% e 0,5%), clorexidina (2% e 0,2%) e ainda o ácido cítrico 10% e EDTA 17% sobre cepa bacteriana de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Dando-se o crescimento bacteriano por 24 horas, as cepas foram inoculadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) juntamente com discos de papel com 6 mm de diâmetro molhados na solução a ser testada. As placas foram incubadas em estufa 37°C por 2 dias, onde foram feitas as medições dos halos de inibição. Todas as soluções apresentaram

ação antimicrobiana, entretanto, a solução de hipoclorito de sódio 4% apresentou maior halo de inibição com diferença estatística significante ($p<0,05$).

Siqueira Jr. et al. (2000) compararam a efetividade do hipoclorito de sódio nas concentrações de 1%, 2,5% e 5,25% em dentes humanos extraídos contaminados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A suspensão bacteriana foi cultivada em meio BHI (*Brain Heart Infusion)* por 24 horas e então inoculada em 40 dentes que foram levados à estufa por mais 24 horas. Deu-se então a divisão dos grupos experimentais segundo a solução utilizada: Grupo 1 – hipoclorito de sódio 1%; Grupo 2 – hipoclorito de sódio 2,5% e Grupo 3 – hipoclorito de sódio 5,25%. No grupo controle foi utilizada solução salina 0,85%. Os dentes foram preparados com instrumentos rotatórios e técnica de rotação alternada. Coletas microbiológicas foram feitas prévia e após a instrumentação dos canais. Complementando o estudo, os autores ainda realizaram o teste de halo de inibição. Sendo os dados submetidos à análise de variância complementada pelo teste Tukey, as concentrações de hipoclorito de sódio testadas não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si com relação à descontaminação.

Gomes et al. (2001) avaliaram *in vitro* a efetividade do hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25% e do gluconato de clorexidina nas formas gel e líquido nas concentrações de 0,2%, 1% e 2% sobre o *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Usando meio BHI, o inoculo foi semeado e ressuspendido em solução salina 0,85%. A calibração da suspensão bacteriana foi feita por meio de espectrofotômetro coincidindo com o grau 0,5 de turbidez na escala de MacFarland, correspondente a $1,5X10^8$ UFC/mL. Os autores dividiram uma placa de cultura celular de 24 poços de forma a acomodar as diferentes soluções testadas com os diferentes tempos de contato (10, 30 e 45 segundos; 1, 3, 5, 10, 20 e 30 minutos; 1 e 2 horas). Decorridos os tempos experimentais, 1 mL de cada poço da placa de cultivo foi transferido para tubos contendo 2 mL de meio BHI associado a um neutralizante. Todos os tubos então foram incubados em estufa 37°C por 7 dias. Os tubos considerados com crescimento positivo deveriam apresentar turbidez do meio compatível com o grau 4 ($12X10^8$ UFC/mL) da escala de MacFarland. Os autores observaram que todas as soluções testadas foram efetivas na neutralização do *Enterococcus faecalis,* porém em diferentes tempos. A solução de gluconato de clorexidina (1% e 2%) e o hipoclorito de sódio 5,25% apresentaram os menores

tempos para neutralizar a bactéria em questão (<30 segundos), com diferença estatística significante para os outros grupos. Dessa forma, foi possível concluir que o tempo requerido para neutralizar o *Enterococcus faecalis* depende da concentração e do tipo de irrigante utilizado, confirmando a atividade antimicrobiana do gluconato de clorexidina e do hipoclorito de sódio.

Zehnder et al. (2002) em um estudo dividido em duas partes, avaliaram o potencial de dissolução tecidual e o efeito antimicrobiano das soluções de hipoclorito de sódio tamponada e não tamponada nas concentrações que variam de 0,00005% a 0,5% de cloro disponível. Para tal utilizaram os métodos de filtro de papel e discos de dentina. O *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) foi cultivado em meio TSB. Para o teste de filtro de papel, a suspensão bacteriana foi padronizada por espectrofotômetro em $1X10^8$ UFC/mL. Os filtros de papel estéril foram colocados em contato com a suspensão por 30 minutos e então transferidas para tubos contendo 1 mL das soluções de hipoclorito de sódio que foram incubadas em estufa 37°C por diferentes períodos de tempo (3, 30 e 300 minutos). Decorrido os tempos experimentais, os filtros de papel contaminados foram transferidos para tubos contendo 1 mL de PBS e então agitados em *Vortex* por 60 segundos. Foram feitas diluições seriadas e então o plaqueamento e incubação a 37°C por 24 horas. Complementando o estudo, os autores prepararam discos de dentina e os contaminaram com a mesma cepa bacteriana que foram colocados em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, 0,25% e 0,05% a 37°C por 15 minutos. A coleta do material contaminado foi feita por desgaste com broca na luz do canal e o material coletado foi colocado em tubos com 2 mL de meio TSB e incubados por 3 dias, para a detecção do crescimento bacteriano. Para o teste do filtro de papel, tanto as soluções de hipoclorito de sódio tamponadas como o hipoclorito de sódio 0,5% apresentaram ação sobre o *Enterococcus faecalis* após 3 minutos de incubação. As concentrações mais baixas apresentaram pouco efeito antimicrobiano sobre o microrganismo testado. Para o teste com os blocos de dentina, as concentrações de 0,5% e 0,25% apresentaram efeito antimicrobiano, entretanto a concentração de 0,05% não foi capaz de inativar o *Enterococcus faecalis*.

Estrela et al. (2003) compararam a efetividade antimicrobiana *in vitro* do hipoclorito de sódio 1%, digluconato de clorexidina 2%, solução de hidróxido de cálcio 1% e solução de hidróxido de cálcio com um detergente, determinando a

concentração inibitória mínima usando diferentes cepas bacterianas, entre elas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *e Candida albicans* (ICB/USP – 592) e a associação desses microrganismos em cultura mista como indicadores biológicos. As cepas bacterianas foram incubadas em meio BHI por 24 horas em 37°C. A concentração das suspensões bacterianas foi padronizada em $3X10^8$ células/mL, sendo 1 mL utilizado para obter a mistura dos microrganismos testes. Trezentas e sessenta pontas de papel absorventes foram imersas na suspensão microbiana por 5 minutos. Em seguida, foram colocadas em placas de Petri e cobertas com 10 mL da solução irrigante. Em intervalos de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, 75 pontas foram removidas do contato com as soluções e foram imersas em 7 mL de meio Letheen e incubados em 37°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado pelo turvamento do meio de cultura e em alguns casos, foi feita coloração de Gram. Da análise microbiológica, os autores concluíram que o hipoclorito de sódio foi a solução mais efetiva para todos os microrganismos. O digluconato de clorexidina foi efetiva contra *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis e Candida albicans* em todos os tempos.

Menezes et al. (2004) avaliaram a efetividade antimicrobiana de irrigantes e medicações de uso endodôntico em *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Para tal, 96 dentes humanos tiveram seus comprimentos padronizados em 16 mm. A suspensão bacteriana foi padronizada por meio de espectrofotômetro na densidade de $1,5X10^8$ UFC/mL. A suspensão foi então inoculada nos dentes previamente limpos, esterilizados e incubados em estufa 37°C por 7 dias. O meio TSB era reposto no quarto dia de incubação. Decorrido o tempo de 7 dias, a confirmação de contaminação era feita por meio de fotomicrografias de duas amostras adicionadas com esse propósito. Seguiu-se então a divisão em 8 grupos experimentais: os grupos de 1 a 5 avaliaram a medicação intracanal; os grupos 6 e 7 avaliaram os irrigantes hipoclorito de sódio 2,5% e solução de clorexidina 2,0%. A instrumentação dos canais foi feita até a lima tipo K número 50 sem medicação intracanal. O grupo 8 foi designado como grupo controle, com a utilização da solução salina. Posteriormente foram feitas as coletas microbiológicas. Após essa primeira coleta os canais foram preenchidos com meio de cultura TSB e incubados em estufa 37°C por 7 dias, para que fosse realizada a segunda coleta microbiológica. Sendo os dados

submetidos à análise estatística, o Grupo 7 em que foi utilizado a solução de clorexidina 2,0%, foi mais efetivo na eliminação microbiana que o Grupo 6, em que foi utilizado o hipoclorito de sódio 2,5%, na segunda coleta microbiológica.

Vianna et al. (2004) compararam a efetividade antimicrobiana da solução e gel de clorexidina 0,2%, 1% e 2% e do hipoclorito de sódio 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%. Para a realização do estudo, os autores utilizaram cepas de microrganismos, entre elas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) que foram cultivadas em meio BHI. A suspensão foi ajustada espectrofotometricamente com densidade óptica de 800 nm, totalizando uma concentração de $1,5X10^8$ UFC/mL. Em uma placa de cultura celular, 1 mL de cada irrigante foi colocado juntamente com 2 mL da suspensão bacteriana. As placas foram colocadas em banho ultrassônico por 10 segundos e deixadas em repouso por diferentes tempos experimentais: 15, 30 e 45 segundos, 1, 3, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos e 1 e 2 horas. Decorrido cada tempo, 1 mL de cada poço da placa de cultura foi transferido para 3 mL de meio BHI mais neutralizantes e incubados em 37°C por 7 dias. Os resultados mostraram que todas as substâncias testadas podem ser utilizadas como irrigantes endodônticos, com exceção do gel de clorexidina 0,2% que não foi capaz de eliminar todos os microrganismos testados.

Pereira et al. (2005) avaliaram pelo método de difusão em agar a efetividade antimicrobiana do extrato de *Arctium lappa* sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 29210), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Para tal, os autores utilizaram 15 placas com meio de cultura BHI e a concentração das suspensões bacterianas padronizadas em $3X10^8$ UFC/mL, correspondendo ao tubo 1 da escala de MacFarland. As placas receberam individualmente cada bactéria e o extrato da *A. lappa* e foram incubadas em estufa 37°C por 24 horas. Concluiu-se que o extrato testado apresentou atividade antimicrobiana contra os patógenos testados.

Sirtes et al. (2005) avaliaram a efetividade da solução de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,001%, 0,0001% e 0,00001% aquecidas em 45°C e resfriada a 20°C sobre cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O microrganismo foi cultivado por 48 horas em estufa 37°C com o meio TSB. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro, correspondendo a $4X10^6$ UFC/mL. Dez microlitros da suspensão bacteriana foram adicionados em 890 μL das

soluções testes e armazenados por 10 minutos nas temperaturas de 45°C e 20°C. Em seguida 100 μL de tiossulfato de sódio 0,1 M foram adicionados à solução com a finalidade de cessar a ação do hipoclorito de sódio. Foram feitas então a diluição seriada e plaqueamento para contagem das UFC/mL, 48 horas depois. Os autores concluíram que as maiores concentrações do hipoclorito de sódio testadas apresentaram melhor efetividade contra *Enterococcus faecalis* e o aquecimento da solução apresentou influência direta sobre essa ação.

Berber et al. (2006) também avaliaram a efetividade da solução de hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 2,5% e 5,25% variando também o tipo de instrumentação manual ou rotatória, sobre canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Inicialmente o microrganismo foi cultivado em meio BHI por 24 horas, então foi feito o ajuste da concentração da suspensão em espectrofotômetro, com densidade óptica 800 nm, que proporciona uma concentração de $6X10^8$ UFC/mL. A suspensão foi então inoculada nos dentes previamente esterilizados e incubados por 21 dias em estufa 37°C, com renovação do meio de cultura a cada 2 dias. Foram feitas então a divisão aleatória dos dentes totalizando 12 grupos experimentais. Durante a instrumentação, a cada troca de instrumento o canal era irrigado com 1 mL da solução teste (hipoclorito de sódio 0,5%, 2,5% ou 5,25%). Prévio e posterior a instrumentação foram feitas coletas microbiológicas e a contagem das UFC/mL. Paralelamente, cada dente foi seccionado em três terços e raspas de dentina foram removidas com o auxílio de pontas diamantadas em baixa rotação. Essas raspas eram colocadas em meio BHI e incubadas em estufa 37°C por 48 horas. Diante da metodologia aplicada, os autores puderam concluir que a solução de hipoclorito de sódio 5,25% foi a mais efetiva na eliminação do *Enterococcus faecalis* e que esta substância apresentou uma boa penetração intra tubular.

Sena et al. (2006) compararam a ação antimicrobiana de irrigantes endodônticos em um modelo de biofilme mono-espécie. Para tal, foram testadas duas concentrações da solução de hipoclorito de sódio (2,5% e 5,25%) e duas formas do digluconato de clorexidina 2% (gel e solução aquosa). Os microrganismos utilizados foram *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (NTCC 3736). Estes foram cultivados em meio BHI em estufa 37°C por 48 horas. As suspensões foram ajustadas fotometricamente

com densidade óptica de 800 nm, resultando em uma concentração de $1,5X10^8$ UFC/mL, equivalente ao padrão 0,5 da escala MacFarland. Os biofilmes monoespécies foram gerados em membrana de nitrato de celulose e colocadas na superfície das placas contendo agar BHI para posterior inoculação de 20 μL das espécies bacterianas. O conjunto foi incubado em estufa CO_2 em condições atmosféricas ideais. Então, os filtros foram removidos de maneira asséptica e transferidos para 5 mL do agente antimicrobiano teste e incubado por 30 segundos, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos com e sem agitação mecânica. Decorridos os tempos experimentais, os filtros de membrana foram transferidos para tubos com 2 mL de solução neutralizante para prevenir ação residual das substâncias. Os tubos foram agitados em Vortex por 30 segundos para ressuspender as bactérias e então foram feitas diluições seriadas e plaqueamento em meio agar BHI. As placas foram incubadas em 37°C por 48 horas para posterior contagem das UFC/mL. Os autores concluíram que todas as substâncias apresentaram atividade antimicrobiana, entretanto a agitação mecânica favoreceu a ação do hipoclorito de sódio 5,25% e da solução de clorexidina 2%.

Ferraz et al. (2007) avaliaram a efetividade *in vitro* do digluconato de clorexidina gel e solução nas concentrações 0,2%, 1% e 2% e hipoclorito de sódio 0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%. Tais substâncias foram aplicadas sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556), *S. sobrinus* (6715), *Actinomyces naeslundii* (M104), *Porphyromonas gingivalis, P. endodontalis, Prevotella intermedia* e *Prevotella denticola,* sendo os 4 últimos isolados clínicos. A concentração dos microrganismos anaeróbios facultativos foi padronizada em $1,5X10^8$ UFC/mL, referente ao padrão 0,5 da escala MacFarland. Uma amostra de 500 μL das suspensões microbianas foi inoculada em frascos de vidro contendo 50 mL do meio de cultura BHI, na temperatura de 46°C e agitados em Vortex. Em seguida, foram transferidos para placas contendo meio de cultura Mueller Hinton. Tubos de aço foram colocados na superfície das placas e preenchidos com 40 μL de cada substância teste, seguidos da incubação a 37°C por 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, os halos de inibição foram medidos e os dados submetidos à análise estatística. Os resultados demonstraram que a clorexidina gel apresenta um grande potencial para ser utilizada como substância química auxiliar intracanal.

Britto et al. (2009) compararam a redução da população de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) mediante três regimes distintos de irrigação com hipoclorito de sódio e EDTA: *EndoVac, EndoActivator* e irrigação convencional com as NaviTips. Para tal, o *Enterococcus faecalis* foi cultivado por 24 horas em meio TSB e TSA. Enquanto isso, setenta caninos foram contaminados com a suspensão da bactéria e incubados por 7 dias. Os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais, como segue: grupo 1: irrigação convencional com as NaviTips calibradas 3 mm aquém do comprimento de trabalho; grupo 2: semelhante ao grupo 1 com ativação final do irrigante com *EndoActivator* e grupo 3: irrigação utilizando o sistema *EndoVac.* Os canais foram mecanicamente preparados com o sistema rotatório *ProTaper*. Amostras do conteúdo do canal foram coletadas antes e depois do procedimento químico mecânico com pontas de papel estéril. Essa coleta foi incubada em estufa 37°C por 48 horas em meio de cultura Mitis-Salivarius para posterior contagem das UFC/mL. Diante da metodologia aplicada, os autores puderam concluir que os três métodos de irrigação foram efetivos na redução bacteriana, entretanto, proporcionaram um nível de redução semelhante, sem diferença estatística significante.

Vianna e Gomes (2009) compararam *in vitro* a eficácia das soluções de hipoclorito de sódio e da clorexidina contra *Enterococcus faecalis.* As concentrações das substâncias testadas foram clorexidina 2% gel, clorexidina 2% solução, hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5,25% e a combinação deles na mesma proporção. Dois métodos foram usados para a análise: teste de difusão em Agar e o teste de diluição em meio. O *Enterococcus faecalis* foi cultivado por 24 horas em meio BHI e em seguida a concentração da suspensão foi ajustada por meio de espectrofotômetro com densidade óptica de 800 nm, proporcionando uma concentração de $1,5X10^8$ UFC/mL. Embora a combinação do hipoclorito de sódio e da clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana, não houve melhora da atividade da clorexidina isolada. O hipoclorito de sódio e a clorexidina nas maiores concentrações apresentaram melhores resultados na eliminação do microrganismo estudado.

Tirali et al. (2009) testaram e compararam *in vitro* a efetividade do hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5%, 2,5% e 5,25% e Octenisept nas concentrações de 1%, 10%, 50% e 100%. Para a realização do estudo foram utilizadas cepas do

Staphylococcus aureus (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 10231). O *Staphylococcus aureus e Enterococcus faecalis* foram cultivados em agar sangue para o isolamento inicial. Sequencialmente colônia individual foi inoculada em meio BHI e padronizada em $1,5X10^8$ UFC/mL, equivalente ao padrão 0,5 da escala MacFarland. Uma amostra de 1 mL de cada irrigante teste e 2 mL da suspensão bacteriana foram colocadas nos poços da placa de cultura celular. Os microrganismos estiveram em contato com as substâncias pelos tempos experimentais de 15, 30, 45 segundos, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos, 24, 48 e 72 horas. Após cada período experimental, 1 mL de cada poço foi transferido para tubos contendo 3 mL de meio BHI com neutralizantes para as soluções químicas. Todos os tubos foram levados à incubação 37°C em condições anaeróbicas por 7 dias, para que ocorresse o crescimento bacteriano. Após esse tempo, 10 μL de cada tubo foi inoculado em placas com agar e incubados à 37°C por 24 e 48 horas em condições ideais para o crescimento. Os resultados do estudo indicaram que o Octenisept 50% e 100% foram mais efetivos que o hipoclorito de sódio 5,25% como irrigante antimicrobiano.

Inserindo uma nova substância química com poder antimicrobiano, Rossi-Fedele et al. (2010) compararam a efetividade da água super-oxidada ao hipoclorito de sódio na concentração de 4% contra *Enterococcus faecalis faecalis* (JH2-2). Para isso, os autores utilizaram 15 raízes de incisivos bovinos que foram preparados para receber a contaminação com irrigação farta de EDTA, por 4 minutos e hipoclorito de sódio, por 4 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, os dentes foram contaminados e incubados por 10 dias em estufa a 37°C. Decorrido o tempo, os dentes foram divididos de acordo com os grupos experimentais: grupo 1: solução salina (controle negativo); grupo 2: hipoclorito de sódio 4% e grupo 3: irrigação com a água super-oxidada. Os canais foram instrumentados com o sistema *ProTaper* e a irrigação aconteceu por 3 minutos. Em seguida raspas de dentina foram produzidas por meio de pontas diamantadas e incubadas em meio BHI por 24 horas para posterior diluição seriada e contagem das UFC/mL. Diante da metodologia aplicada o hipoclorito de sódio foi o único agente irrigante capaz de eliminar completamente o *Enterococcus faecalis faecalis* do canal radicular.

Retamozo et al. (2010) propuseram um estudo para avaliar a concentração e tempo de irrigação mínimos para o hipoclorito de sódio desinfetar discos de dentina

contaminados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082). Para tal, os autores seccionaram incisivos bovinos transversalmente, removeram o cemento e por meio de uma ponta diamantada, removeram a pré-dentina, padronizando uma luz de canal com 2-3 mm de diâmetro. Para a remoção do *smear layer* foi feito banho em ultrassom com EDTA 17% por 4 minutos seguido pela imersão em hipoclorito de sódio 5,25%, também por 4 minutos. Os cilindros foram então esterilizados em autoclave e em seguida contaminados com *Enterococcus faecalis* em meio BHI. O conjunto permaneceu em repouso por 3 semanas com troca semanal do meio para assegurar a viabilidade do microrganismo. As concentrações experimentais utilizadas do hipoclorito de sódio foram de 1,3%, 2,5% e 5,25% e cada uma dessas concentrações foi testada nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 minutos. Cada amostra foi colocada em 2 mL de meio BHI e incubadas por 72 horas. O turvamento do meio apontava crescimento bacteriano positivo. Os autores puderam concluir que a irrigação com o hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,3% e 2,5% foi ineficaz na inativação do *Enterococcus faecalis* em dentes bovinos, em menos de 40 minutos. Por outro lado, a solução de hipoclorito de sódio 5,25% foi 100% eficaz em 40 minutos.

Herrera et al. (2010) avaliaram, em estudo *in vitro,* a susceptibilidade dos microrganismos frequentemente encontrados em infecção endodôntica à *Uncaria tomentosa*. As substâncias testadas foram clorexidina gel 2%, *U. tomentosa* gel 2%, clorexidina 2% + *U. tomentosa* 2% gel e natrosol 1% gel. Os microrganismos testados foram *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 95106) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Todos cultivados em meio BHI e o método de difusão em agar foi utilizado para tal avaliação. As soluções bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro, com densidade óptica de 800 nm, na concentração de $1,5X10^8$ UFC/mL, equivalente ao padrão 0,5 da escala MacFarland. Então, 100 μL de cada suspensão bacteriana foram plaqueadas em meio Mueller-Hinton e incubados a 37°C por 10 minutos. Perfurações foram feitas no meio de cultura e as soluções testes foram colocadas nessas perfurações. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para que ocorresse o crescimento bacteriano e a difusão das soluções pelo agar. As zonas de inibição ao redor das substâncias testadas foram medidas, os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística. Os resultados revelaram que *U. tomentosa* 2% gel inibiu os

microrganismos testados e esse efeito é aumentado quando se associa a clorexidina.

2.2.2 Associação de substâncias na permeabilidade dentinária

Paiva e Antoniazzi (1973) propuseram a utilização do creme Endo-PTC (Peróxido de uréia 10%, Tween 80 15% e Carbowax 75%) associado à solução de hipoclorito de sódio 0,5 ou 1%, com o objetivo de promover a limpeza e desinfecção do tecido dentinário durante a terapia endodôntica. Os autores mostraram por meio de teste bacteriológico em 35 dentes com diagnóstico de polpa mortificada, 100% de cultura microbiana negativa, imediatamente após o preparo e 97,2% na sessão seguinte.

Amorim e Lage-Marques (2001) avaliaram em 27 dentes unirradiculares a penetração do corante Rodamina B após o preparo químico cirúrgico. Para tal, os dentes foram distribuídos nos grupos experimentais, a seguir: Grupo I – hipoclorito de sódio 0,5% associado ao creme Endo-PTC e irrigação final com EDTA-T; Grupo II- hipoclorito de sódio 0,5% associado ao *Glyde File Prep* e Grupo III – hipoclorito de sódio 0,5% associado ao *File Eze*. Após o preparo os dentes foram secos e o corante foi introduzido nos canais e removido imediatamente. Os dentes foram, então, seccionados transversalmente e analisados em software específico para avaliar a penetração intratubular do corante. Os autores puderam concluir que todos os grupos testados apresentaram aumento na permeabilidade dentinária radicular de maneira semelhante.

Com uma nova proposta terapêutica, Ferreira et al. (2005) avaliaram as alterações da permeabilidade dentinária com a utilização do Endo PTC na forma gel, tendo como veículo o carbopol. Foram utilizadas 12 raízes de dentes unirradiculares submetidos ao tratamento endodôntico utilizando a solução de hipoclorito de sódio 1% com variação do lubrificante intracanal, de acordo com os diferentes grupos experimentais: Grupo I – creme Endo-PTC; Grupo II – gel Endo-PTC e Grupo III – soro fisiológico. Em seguida, foi aplicado nos espécimes o corante indicador

Rodamina B 1% e clivados no sentido longitudinal para análise da infiltração. O emprego do gel Endo-PTC foi capaz de proporcionar um índice de permeabilidade dentinária semelhante à utilização do creme Endo-PTC não apresentando diferenças estatisticamente significantes. Os autores concluíram que o gel Endo-PTC apresenta-se como uma boa opção terapêutica.

Monteiro et al. (2008) avaliaram por meio da microscopia eletrônica de varredura a limpeza superficial dentinária nos terços cervical, médio e apical de 50 incisivos inferiores. Para tal, foram utilizadas a solução de hipoclorito de sódio 2,5%, a associação do hipoclorito de sódio 0,5% com o Endo-PTC na forma creme e gel e o gel da clorexidina. Os autores puderam concluir que o Endo-PTC na forma gel apresentou os melhores resultados na análise microscópica de limpeza.

2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO OZÔNIO

Segundo Bocci (2005), o gás ozônio é fruto de uma reação endotérmica a partir da molécula de oxigênio, com símbolo químico O_3 e cadeia química cíclica. Possui peso molecular de 47.9982. Extremamente oxidante e instável, ou seja, retorna a forma molecular de oxigênio com relativa facilidade

Nogales et al. (2008) apontam para a geração do ozônio por meio de descarga elétrica sobre a molécula de oxigênio, a qual se quebra liberando átomos para o meio que se liga a outra molécula de oxigênio, formando o O_3. Na natureza é formado na camada externa da atmosfera através do bombardeamento do oxigênio pelos raios ultravioleta, originando a camada de ozônio. Chuvas com descargas elétricas e a poluição atmosférica são fontes de produção de ozônio, aumentando sua participação percentual frente aos outros gases. Na troposfera torna-se tóxico por conta da intolerância à inalação.

Deboni (2009) relata que em temperatura ambiente, o ozônio existe na forma de gás e sua coloração varia do incolor ao azulado, na dependência da concentração. Apresenta odor pungente e rapidamente detectável em concentrações baixas como 0,02 a 0,05 ppm. Devido ao seu alto poder de oxidação, o ozônio é altamente corrosivo para determinados materiais, tais como: ferro, alumínio e látex e inerte para outros, tais como: aço inoxidável, titânio, cerâmicas, vidro e silicone.

Nogales e Lage-Marques (2010) relatam a existência de três formas de produção do ozônio: por luz ultravioleta: semelhante à estratosfera. Utilizada em equipamentos empregados na agricultura, para controle de pragas, no ramo da hotelaria, como ambientadores e purificadores de ar, nas piscinas, para purificação da água, sendo um setor de aplicação muito interessante, devido à inexistência de resíduo promovida pelo ozônio em comparação ao cloro; por eletrólise: a eletrólise do ácido sulfúrico onde se empregam eletrodos de metais nobres, e eletrólise da água; ou, descarga corona ou silenciosa que é a forma de eleição para os geradores de ozônio com finalidades terapêuticas, pois é capaz de produzir alta taxa de ozônio, é simples de operar e a concentração pode ser regulada.

2.3.1 Histórico

Rubin (2001) aponta como o introdutor do ozônio o químico alemão Christian Friedrich Schöenbein, que trabalhava com eletrólise da água e durante o processo percebia um odor característico, o qual o nomeou “Ozon”, derivado do termo grego “Ozein” (aquilo que emite cheiro). Inicialmente considerava o ozônio como um potente oxidante e também como um desinfetante.

Wehrli e Steinbarth (1954 apud Bocci, 2005) foram os primeiros a expor o sangue humano ao oxigênio com irradiação ultravioleta. O médico alemão Albert Wolf utilizava o ozônio tópico para o tratamento de feridas em soldados, conseguindo excelentes resultados, além do que foi o primeiro médico a desenvolver uma técnica de expor o sangue diretamente à mistura gasosa composto por oxigênio-ozônio.

Nogales (2006) relata que o primeiro cirurgião-dentista a utilizar o ozônio foi Edward Fisch, que realizava o tratamento de periodontites com água ozonizada. Um de seus pacientes foi o cirurgião austríaco Erwin Payr, que após o tratamento odontológico virou um entusiasta da técnica e passou a pesquisá-la. Em 1935, publicou o resumo “Sobre o Tratamento com Ozônio em Cirurgia”, durante o 59º Congresso da Sociedade Alemã de Cirurgia, em Berlim. Este é considerado o início da Ozonioterapia como se conhece nos dias atuais.

2.3.2 Ozonioterapia

Bocci (2005) relata que a utilização do ozônio para fins médico-odontológico, sintetizado por geradores específicos a partir de oxigênio puro, é utilizado em concentrações inferiores àquelas para fins industriais - concentração de no máximo 5% de ozônio em oxigênio ou doses que variam de 1-100 µg/mL ou gamas de ozônio. A concentração de 1 µg/mL de ozônio significa que a mistura gasosa oxigênio-ozônio contém 0,05% de ozônio e 99,95% de oxigênio. No extremo máximo da aplicação clínica da Ozonioterapia, a concentração de 100 µg/mL significa que a mistura gasosa contém 5% de ozônio e 95% de oxigênio.

Viebahn-Hansler (2007) descreve que a maioria dos geradores com finalidade medicinal presente no mercado utiliza o efeito corona para produção da mistura gasosa oxigênio-ozônio, uma vez que após o oxigênio puro (medicinal) passar por um gradiente de alta voltagem (5-13 mV), suas moléculas são dissociadas, o que permite a formação do gás ozônio a partir da união de moléculas e átomos de oxigênio. O uso de ar atmosférico como matéria prima para produção de ozônio medicinal é contra indicado pela formação de espécies tóxicas, tais como N_2O_2 (dióxido de nitrogênio) e HNO_3 (ácido nítrico), dentre outras. O ozônio é 1,6 vezes mais denso e 10 vezes mais solúvel em água que o oxigênio, 1,5 vezes mais potente e 3000 vezes mais rápido que o cloro.

Nogales e Lage-Marques (2010) relatam que em função de a molécula triatômica ser muito instável e reativa, o ozônio não pode ser armazenado, devendo

ser utilizado imediatamente a partir da geração. Em condições normais, a própria temperatura do ambiente em que se encontra tem grande influência em sua degradação.

2.3.3 Estudo da ação antimicrobiana do ozônio

Velano et al. (2001) avaliaram o efeito da água ozonizada sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Para a realização do estudo foi utilizado gerador de ozônio a partir de raios ultravioletas sob a molécula de oxigênio medicinal. Foram preparadas suspensões com concentrações que variaram de 10^6 a 10^{16} microrganismos/mL. De cada suspensão recém preparada foi retirada uma alíquota de 1 mL e adicionada em 99 mL da água destilada estéril ozonizada (Grupo 1) e sem ozônio (Grupo 2) em um reator de cristal. Foram feitas diluições seriadas e o plaqueamento de 0,1 mL da suspensão em placas de Petri contendo meio TSA, incubadas em 37°C por 24 horas, para a posterior contagem das UFC/mL. De acordo com os resultados, o tempo máximo necessário para que não houvesse mais a contagem do microrganismo testado no grupo da água ozonizada foi de 5 minutos e 25 segundos. Para o grupo onde não foi utilizada a água ozonizada o tempo para neutralização bacteriana foi de 23 minutos e 45 segundos, apontando para o efeito antimicrobiano da água ozonizada.

Nagayoshi et al. (2004) compararam a efetividade da água ozonizada com agentes irrigantes de uso endodôntico em canais contaminados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus mutans*. As cepas bacterianas foram inoculadas em meio BHI, em 37°C, por 18 horas. Incisivos bovinos foram seccionados e mantidos em 10 mL do meio com as suspensões bacterianas por 6 dias, para a contaminação. O meio de cultura foi trocado diariamente. Decorrido o tempo de incubação, os discos de dentina foram transferidos para placas de cultura celular. Os canais foram irrigados constantemente, com um fluxo de 30 mL/min por 10 minutos, com as seguintes soluções: água ozonizada na concentração de 4 mg/L, água ozonizada na concentração de 4 mg/L + ultrassom, água destilada, água destilada + ultrassom. Uma amostra não foi irrigada, configurando o controle positivo e outro espécime foi irrigado com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, tido como controle negativo. Após cada irrigação, os discos de dentina eram secos e

imediatamente, um desgaste na luz do canal era feito com uma ponta diamantada em baixa rotação. As raspas de dentina foram coletadas e transferidas para 20 mL de meio BHI. A solução foi agitada em *Vortex* por 1 minuto e diluída em solução salina. Em seguida, 50 μL da suspensão foi inoculada em meio agar BHI, à 37°C por 24 horas para que fosse realizada a contagem das UFC/mL. Para a análise da infiltração da bactéria pelos túbulos dentinários foi feita coloração de Gram e análise por microscopia de fluorescência. Os resultados revelaram que as concentrações bacterianas diminuíram em todos os grupos experimentais, sobretudo quando tratados com água ozonizada associada ao ultrassom, não apresentando diferença estatística significante quando comparada com o hipoclorito de sódio 2,5%. Dessa forma, os autores puderam concluir que a água ozonizada apresentou praticamente o mesmo efeito antimicrobiano que o hipoclorito de sódio 2,5 %.

Hems et al. (2005) avaliaram a efetividade do ozônio sobre *Enterococcus faecalis* na forma planquitônica e em biofilme, a fim de estabelecer o potencial como irrigante endodôntico. Para o estudo foram utilizados tanto a água ozonizada como o gás ozônio e o microrganismo testado proveniente de um isolado clínico. O meio de cultura com os microrganismos foram pulverizados com o ozônio por diferentes períodos de tempo (30, 60, 120 e 240 segundos). Imediatamente após este procedimento, 1 mL do meio de cultura foi transferido para 9 mL de solução neutralizante e agitados por 10 segundos. Para o grupo controle positivo foi utilizada a solução de hipoclorito de sódio 2,5% e para o controle negativo, o ar atmosférico por 240 segundos com o mesmo fluxo aplicado ao grupo do ozônio. As diluições seriadas foram feitas, seguidas pelo plaqueamento e contagem das UFC/mL. Paralelamente foi feito cultivo do microrganismo em discos de nitrato de celulose em placas de agar sangue, para simular o biofilme. Os discos foram transferidos para tubos contendo 10 mL de água ou solução de hipoclorito de sódio 2,5%. O ozônio foi pulverizado no tubo com água pelos tempos experimentais de 30, 60, 120 e 240 segundos, em seguida, em parte dos tubos foi feita a agitação em 200 rpm e na outra parte sem agitação. Os filtros de membrana foram removidos e transferidos para solução neutralizante e agitados por 1 minuto para ressuspender as bactérias e assim, o ozônio foi aplicado por 300 segundos. Em seguida, os mesmos discos foram transferidos para o meio neutralizante e as células incubadas e contadas. Da análise dos resultados, os autores puderam concluir que a água ozonizada foi

eficiente contra o *Enterococcus faecalis* na forma planquitônica após 240 segundos. O ozônio não apresentou eficiência sobre o biofilme, ao menos que as células bacterianas estivessem suspensas por conta da agitação, e finalmente a solução de hipoclorito de sódio 2,5% foi mais efetiva sobre a suspensão planquitônica.

Estrela et al. (2006) avaliaram a efetividade antimicrobiana do ozônio aplicado em 3 diferentes soluções em um sistema de limpeza ultrassônica contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A cepa bacteriana foi inoculada em 9 mL de meio BHI e incubada à 37°C por 24 horas e subcultivada em agar BHI. A concentração da suspensão foi ajustada de acordo com o padrão 1 da escala MacFarland, correspondente a aproximadamente $3X10^8$ células/mL. Foram determinados 8 grupos, sendo 6 experimentais e 2 controles. Grupo 1 – água destilada estéril ozonizada na temperatura de 40°C misturada com *Staphylococcus aureus*; Grupo 2 - água destilada estéril ozonizada na temperatura de 60°C misturada com *Staphylococcus aureus*; Grupo 3 – vinagre da maça ozonizado na temperatura de 40°C misturada com *Staphylococcus aureus*; Grupo 4 - vinagre da maça ozonizado na temperatura de 60°C misturada com *Staphylococcus aureus*; Grupo 5 – água destilada estéril ozonizada + Endozime AWPlus na temperatura de 40°C misturada com *Staphylococcus aureus*; Grupo 6 – água destilada estéril + Endozime AWPlus na temperatura de 60°C misturada com *Staphylococcus aureus*; Grupo 7 – água destilada na temperatura de 40°C misturada com *Staphylococcus aureus* (controle positivo) e Grupo 8 – água destilada estéril na temperatura de 40°C misturada com *Staphylococcus aureus* (controle negativo). Um total de 120 mL da suspensão bacteriana foi misturado em 6 litros da solução experimental usada na lavadora ultrassonica, que permaneceu ligada por 20 minutos. Após esse processo, 10 mL de cada suspensão experimental foram coletados e diluídos em 9 mL de meio BHI, em seguida os tubos foram incubados em temperatura de 37°C por 48 horas. A viabilidade bacteriana foi avaliada macroscopicamente pelo turvamento do meio. Paralelamente, 1 mL de cada grupo experimental e controle foi coletado e espalhado pela placa de Petri com meio BHIA. Após a incubação em 37°C por 48 horas, as placas que continham mais de 50 unidades formadoras de colônias foram selecionadas e o número total de UFC foi determinado. Os resultados evidenciaram que a aplicação do ozônio nas soluções testadas utilizadas nos sistemas de limpeza ultrassônica apresentou atividade antimicrobiana contra o *Staphylococcus aureus.*

Estrela et al. (2007) compararam a efetividade antimicrobiana da água ozonizada, do gás ozônio, da solução de hipoclorito de sódio 2,5% e da clorexidina 2% em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Para tal, trinta dentes anteriores unirradiculares foram inoculados com a suspensão bacteriana padronizada na concentração de $3X10^8$ células/mL, ajustada no padrão 1 da escala de MacFarland, por um período de sessenta dias. Os dentes foram adaptados em um modelo experimental composto por um tubo do tipo Eppendorf e vedado com resina epóxi para evitar infiltração. Os dentes foram aleatoriamente divididos de acordo com as soluções irrigantes que circularam em um fluxo constante de 50 mL/min, por 20 minutos. Os eluatos foram coletados e imersos no meio de cultura de Letheen, seguidos pela incubação à 37°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi monitorado pelo turvamento do meio e subcultivado em meio nutriente específico. Uma alíquota de 100 μL da suspensão obtida a partir do meio de Letheen foi transferida para 7 mL do meio BHI e incubado em estufa 37°C por 48 horas. O crescimento também foi monitorado pelo turvamento do meio. Diante dessa metodologia aplicada, nenhuma das soluções irrigantes avaliadas apresentou ação sobre o microrganismo testado, durante os 20 minutos de irrigação. Assim, a irrigação por 20 minutos com as soluções de hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina 2%, água ozonizada e o gás ozônio não foram suficientes pra inativar o *Enterococcus faecalis.*

Cardoso et al. (2008) avaliaram a efetividade da água ozonizada como agente irrigante na eliminação de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC 18804) e na neutralização de endotoxinas do canal radicular. Para tal, foram selecionados 48 dentes unirradiculares que foram preparados e contaminados com a suspensão padronizada na concentração de $1,8X10^8$ células/mL, calibrada espectrofotometricamente. Então, 20 μL da suspensão bacteriana foram inoculadas em 24 raízes que foram distribuídas e fixadas em placas de cultura celular. Estas foram incubadas em estufa 37°C por 21 dias. Durante este período, o meio de cultura TSB foi trocado a cada 3 dias. Decorridos os 21 dias, foi feita uma coleta de confirmação de contaminação e os dentes foram instrumentados até a lima 80 seguidos de irrigação com 3 mL da água ozonizada ou solução salina para cada instrumento usado. Imediatamente após a realização da instrumentação, foi feita a primeira coleta microbiológica. Em seguida, os dentes foram preenchidos com água

ozonizada ou solução salina e incubados por 7 dias, em estufa 37°C, quando então foi feita a segunda coleta. O número de células viáveis foi contado pela UFC/mL. As outras 24 raízes selecionadas para o experimento foram distribuídas e fixadas em placas de poliestireno, esterilizadas e inoculadas com 10 μL de uma solução padrão contendo endotoxina. As amostras foram seladas e incubadas em atmosfera úmida, em 37°C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, as raízes foram instrumentadas de acordo com o mesmo protocolo. Foram feitas as coletas imediatamente e 7 dias após o preparo. Os resultados mostraram que a água ozonizada reduziu o número de UFC/mL do *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans,* entretanto, na segunda coleta, 7 dias após, o número de microrganismos cresceu marcadamente. Com relação à neutralização de endotoxinas avaliada pelo método de lisado de límulus, revelou a presença de endotoxina no interior do canal tanto no grupo da água ozonizada como no grupo controle, da solução salina. Dessa forma, os autores puderam concluir que a água ozonizada, como agente irrigante, reduziu significantemente o número de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Embora a redução na primeira coleta fosse observada, um aumento significante na contagem microbiana ocorreu na segunda coleta, sugerindo a ausência de efeito residual da água ozonizada. Também, a água ozonizada não foi capaz de neutralizar endotoxinas do canal radicular.

Segundo Lynch (2008) o ozônio tem sido proposto como um agente antisséptico baseado nos relatos de sua ação antimicrobiana tanto na forma de gás como diluído em água. O ozônio é efetivo quando prescrito em uma concentração suficiente, usado por um tempo adequado e aplicado corretamente intracanal após os procedimentos tradicionais de limpeza, desinfecção e modelagem. O ozônio tem sua ação melhorada em regiões com menos debris orgânicos, por isso a indicação da utilização ao final da completa irrigação e modelagem do canal radicular.

Stoll et al. (2008) investigaram, *ex vivo*, o efeito desinfetante do gás ozônio em canais radiculares humanos e compararam-no com o efeito dos irrigantes tradicionais. Para a realização do experimento 60 dentes unirradiculares foram utilizados. Os dentes tiveram a coroa radicular e os 3 mm apicais seccionados, padronizando o tamanho da amostra em 10 mm. Em seguida, foram esterilizados em autoclave. A suspensão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 6057) foi padronizada na concentração de $3X10^6$ UFC/mL. As raízes foram inoculadas com 10 μL da

suspensão bacteriana e secas em estufa 36°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram montadas em um aparato que fixasse as raízes e permitisse a irrigação da coroa em direção ao ápice. Para o grupo controle foi utilizada irrigação com 1 mL de solução salina. Os dentes foram secos e novamente irrigados com 3 mL de solução fisiológica. Essa irrigação foi diluída, plaqueada e incubada a 36°C por 24 horas, para realizar a contagem das UFC/mL. O grupo experimental foi irrigado com 1 mL da solução salina, seguida da secagem com pontas de papel absorventes e exposta ao ozônio utilizando o gerador HealOzone (KaVo, Inglaterra), na concentração de 2100 ppm, por 120 segundos, seguida por nova irrigação com solução salina para realizar a análise quantitativa. Os grupos experimentais foram compostos por 10 dentes, sendo o controle positivo utilizado a solução de hipoclorito de sódio 3% e o controle negativo, a solução fisiológica. Os outros grupos testes foram compostos pela solução de peróxido de hidrogênio 3%, solução de clorexidina 0,2%, solução de hipoclorito de sódio 1,5% e finalmente, exposição ao gás ozônio. Dessa forma, os autores puderam concluir que a irrigação com hipoclorito de sódio 3% apresentou ação de dissolução tecidual aumentada. Entretanto, em situações em que altas concentrações de hipoclorito de sódio não podem ser utilizadas, os agentes alternativos testados são lícitos. Comparado às soluções testes, o ozônio pode ser um substituto equivalente.

Huth et al. (2009) investigaram a efetividade do gás ozônio e da água ozonizada sobre *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506), *Candida albicans* (ATCC MYA-273), *Peptostreptococcus micros* (ATCC 33270) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Para tal, os microrganismos foram testados na forma planquitônica e na forma de biofilme, cultivados em meio BHI. As culturas foram expostas ao ozônio, hipoclorito de sódio 2,25% e 5,25%, digluconato de clorexidina 2%, peróxido de hidrogênio 3% e PBS (controle) por 1 minuto. As concentrações do gás ozônio usadas foram 1 g/m^3 e 53 g/m^3. Já a água bidestilada ozonizada foi produzida nas concentrações de 20 μg/mL e diluída até 1,25 μg/mL, como proposto por Bocci (2005). Os microrganismos foram cultivados em meio BHI e a concentração ajustada em $3X10^8$ UFC/mL, em acordo com o padrão MacFarland. Para a análise da ação do ozônio sobre a forma planquitônica dos microrganismos, 10 μL da suspensão bacteriana específica foi exposta ao ozônio enquanto que as placas controle foram expostas ao ar ambiente por 1 minuto. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa 37°C por 48 horas para a posterior contagem das UFC/mL. Para a análise da

ação do ozônio sobre o biofilme, dentes recentemente extraídos foram inseridos em um aparato contendo uma bomba peristáltica que, intermitentemente bombeou uma mistura de saliva, sacarose e os microrganismos testados. O ozônio foi bombeado através deste aparato percorrendo todo o canal radicular nos tempos de 2,5, 5 e 10 minutos para posterior incubação e contagem das UFC/mL. Da análise dos agentes irrigantes sobre suspensão bacteriana, todos foram efetivos contra *Enterococcus faecalis e Candida albicans*, sem diferença estatística entre si. Da análise sobre o biofilme, estatisticamente não houve diferença entre os grupos experimentais para o *Enterococcus faecalis e Candida albicans*. Contra *Pseudomonas aeruginosa*, o gás ozônio na concentração de 4 g/m^3 foi significantemente menos efetivo que o hipoclorito de sódio, clorexidina e a água ozonizada na concentração inferior a 10 μg/mL e a água ozonizada na concentração de 10 μg/mL foi menos efetiva que a clorexidina 2%. Os autores puderam concluir que as concentrações do gás e água ozonizada foram dose, cepa e tempo dependentes com relação à efetividade sobre os microrganismos testados. O hipoclorito de sódio foi a única solução que eliminou completamente todos os microrganismos.

Kustarci et al. (2009) compararam a atividade antimicrobiana do laser KTP e do gás ozônio em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Foram utilizados 80 dentes unirradiculares com comprimento padronizado em 17 mm. Os dentes foram incluídos em um frasco com tampa de borracha onde foi feito um orifício para adaptação dos espécimes. Em seguida, foram preparados para receber a contaminação mediante preparo prévio com a utilização de instrumentos rotatórios K3 pelo método coroa-ápice. A cada troca do instrumento foi feita irrigação com 2 mL de solução salina 0,9%. Ao final da instrumentação, foi feita irrigação com EDTA por 3 minutos e em seguida nova irrigação com 4 mL de solução salina 0,9%. Todo o conjunto passou pelo processo de esterilização pelo gás óxido de etileno. A suspensão de *Enterococcus faecalis* foi cultivada em meio BHI e a concentração foi ajustada no padrão 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo à $1,5X10^8$ UFC/mL. Então 10 μL da suspensão foram aplicadas no interior do canal e incubadas em estufa 37°C por 24 horas, quando se seguiu então para a divisão dos grupos experimentais. Grupo 1 – foi aplicado o laser KTP intracanal por 5 vezes; Grupo 2 –o gás ozônio foi aplicado no canal seco por 120 segundos, com o aparelho HealOzone (KaVo, Alemanha); Grupo 3 – controle negativo: os canais foram irrigados com 2 mL de solução de hipoclorito de sódio

2,5% que permaneceu em contato por 10 minutos; Grupo 4 –controle positivo: os dentes foram irrigados com 2 mL solução salina 0,9%. Para a confirmação da contaminação, previamente a aplicação dos grupos experimentais foi feita uma irrigação com 1 mL de solução salina 0,9% e uma ponta de papel estéril #40 foi introduzida nos canais e mantida em posição por 1 minuto. Essa ponta de papel foi transferida para o meio BHI e incubadas para averiguação do número médio de bactérias viáveis, que constou de $3X10^5$ UFC/mL. Após todos os tratamentos, os canais foram submetidos ao mesmo processo de coleta para quantificação das UFC/mL. Os resultados revelaram que tanto o laser KTP como o ozônio apresentaram atividade antimicrobiana nos canais contaminados, sendo o gás ozônio mais efetivo que o laser. Entretanto a solução de hipoclorito de sódio 2,5% foi superior em comparação com o laser KTP e o ozônio gás. Diante da metodologia aplicada os autores puderam concluir que o laser KTP e o gás apresentaram-se como um potente auxiliar ao hipoclorito de sódio 2,5% no tratamento endodôntico e que ambos tem potencial para serem usados ao final da instrumentação.

2.3.4 O ozônio e suas propriedades estimuladoras

Com base na propriedade oxidante do ozônio e na possibilidade de ativação de sensores celulares específicos pelos produtos da peroxidação lipídica que podem ativar o sistema imune, León et al. (1998) postularam que o ozônio pode induzir uma adaptação ao estresse oxidativo.

Bocci (2005) aponta para a ação estimuladora do ozônio e que tal fato inicia-se nos eritrócitos, no ciclo da Glicólise Anaeróbica (Ciclo de Embden Meyerhof) proporcionando o aumento na síntese do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Essa enzima é responsável pela quebra na ligação entre o oxigênio e a hemoglobina (oxi-hemoglobina) liberando oxigênio aos tecidos. Desse oxigênio liberado, 95 a 98% convertem-se em ATP glicose independente. Essa produção extra de ATP não

depende da presença da glicose, como ocorre no Ciclo de Krebs. Tal fato pode visto como um aumento no metabolismo celular. De 2 a 5% do oxigênio liberado é convertido em radicais livres, sendo os mais comuns, as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), entre eles, o oxigênio singleto, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, radical alcoxila, radical peroxila, entre outros. Essas ROS, quando liberadas no organismo, produzem um efeito de estresse oxidativo agudo com efeito antimicrobiano potente pela ação oxidante do ozônio sobre os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular bacteriana.

Olszewer (2008) relata que o tecido vivo é inicialmente agredido por esse estresse oxidativo e para recuperar-se ocorre a ativação de sistemas e liberação de agentes antioxidantes. A primeira linha de defesa é composta pelo sistema antioxidante enzimático, como superóxido dismutase, catalase e peroxidases. Imediatamente após, são ativados os sistemas antioxidantes fisiológicos e os não enzimáticos.

Bocci et al. (2011) relatam que o processo de ozonização é então caracterizado pela formação de ROS e LOPs (Produtos da Oxidação Lipídica) e ambos agem em fases distintas. Enquanto o ROS age imediatamente e é neutralizado pelos sistemas antioxidantes, os LOPs distribuem-se pelos tecidos e tem a função de minimizar as toxicidades potenciais, tornando-os mensageiros tardios. Essa produção de LOPs ocorre após a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular.

2.3.4.1 Estudos da ação biológica do ozônio

Nagayoshi et al. *(*2004) avaliaram a citotoxicidade da água ozonizada frente a fibroblasto de ratos L-929, que foram cultivados em meio essencial mínimo (MEM) à 37°C, em atmosfera 5% CO_2. Em seguida, os fibroblastos foram lavados, tripsinizados e semeados na densidade $2X10^5$ células/100μL de meio/poço da placa de cultura celular. Após incubação por 3 horas em 37°C, 66 μL de MEM foram

aspirados de cada poço e 66 μL de cada suspensão teste foram adicionados, sendo elas: PBS, água destilada, água ozonizada 4 mg/L e hipoclorito de sódio 2,5%. Decorridos 2 minutos de incubação a 37°C, 100 μL da solução foi aspirado de cada poço e 100 μL de MEM juntamente com os reagentes do teste MTT foram adicionados, seguindo a incubação por 4 horas. Posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro para determinar a viabilidade celular. A análise de citotoxicidade pelo método MTT não revelou diferença estatística significante para os grupos tratados com PBS, água destilada e água ozonizada, mas com diferença para o grupo do hipoclorito de sódio, que apresentou uma grande redução da viabilidade celular. Os autores puderam constatar o baixo nível de toxicidade do ozônio sobre fibroblastos de rato.

Huth et al. (2006), em um estudo *in vitro*, investigaram se o gás ozônio ou a água ozonizada exercem algum efeito tóxico sobre as células epiteliais bucal humana e fibroblastos de gengiva, comparando com antissépticos tradicionalmente utilizados e ainda comparando com o metronidazol, antibiótico utilizado topicamente. O gás ozônio foi utilizado nas concentrações de 0,2 – $53X10^6$ $\mu g/m^3$, com o oxigênio puro como grupo controle. Após a incubação das células, o meio foi aspirado e a camada de células aderidas foi exposta ao gás ozônio por 1 minuto. Simultaneamente, a água ozonizada foi aplicada nas células na forma de PBS ozonizado, nas concentrações aferidas por espectrofotômetro que variavam de 1,25 – 20 $\mu g/m^3$ e o PBS puro como grupo controle. Em comparação, foram utilizados os seguintes antimicrobianos dissolvidos em PBS: digluconato de clorexidina 0,2 e 2%; hipoclorito de sódio 2,5 e 5,25% e peróxido de hidrogênio 3% que permaneceram em contato com as células por 1 minuto e comparados com o antibiótico metronidazol, por 24 horas. Foram avaliadas a contagem de células, mensuração da atividade metabólica, pela quantificação de ATP, ligação Sp-1, níveis de actina e apoptose. Os resultados revelaram que o gás ozônio apresentou alto grau de toxicidade em ambos os tipos de células avaliados, ao contrário da água ozonizada, que não apresentou citotoxicidade. Frente a todas as substâncias testadas, a água ozonizada revelou o mais alto grau de biocompatibilidade.

Diante do apresentado pela literatura, o ozônio tem um grande potencial para atuar como coadjuvante à terapia endodôntica, por causa de seu potente efeito

antimicrobiano e biocompatibilidade. Entretanto, os parâmetros de utilização ainda não são padronizados, justificando plenamente a necessidade do presente estudo.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Tendo em vista o apresentado pela revisão da literatura, os objetivos do presente estudo são:

Parte 1. Avaliar a eficiência da água ozonizada na redução microbiana realizada sobre suspensão bacteriana de *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus* – estudo *in vitro;*

Parte 2. Avaliar a eficiência da água ozonizada e o gás ozônio na redução microbiana realizada em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus* – estudo *ex vivo*;

Parte 3. Avaliar a reação biológica de cultura de fibroblastos sob aplicação do ozônio pelo método MTT.

Material e Métodos

4 MATERIAL e MÉTODOS

.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob parecer n° 154/06 (Anexo A), apresentando o descritivo deste capítulo a sequência dos objetivos propostos.

4.1 PREPARO PADRÃO PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Todos os procedimentos de análise microbiológica seguiram o padrão descrito a seguir:

4.1.1 Meios de cultura

Foram utilizados 60 mL de meio de cultura líquido o TSB (*Tryptone Soya Broth* - Oxoid, Cambridge, Reino Unido) e 500 mL meio sólido o TSA (*Tryptone Soya Agar* - Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Em seguida foram autoclavados a 121ºC, por 15 minutos. (Autoclave TOMY SD – 320®/ IPT - Japão) e armazenados em estufa 30°C até o momento do uso.

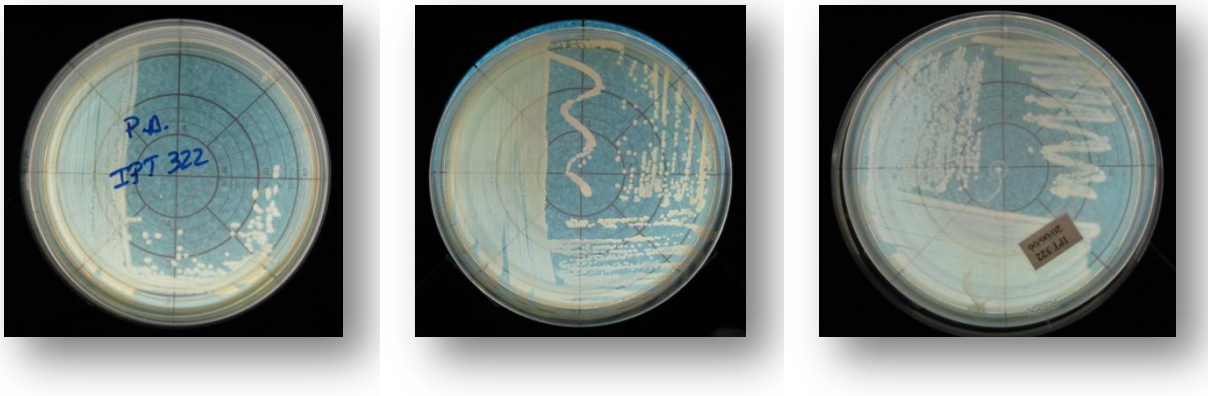
4.1.2 Preparo e reativação das suspensões

Para a padronização da técnica foram utilizadas separadamente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) provenientes do laboratório de Microbiologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, com comportamento conhecido, pura, com tempo e meios de cultivo previamente

estudados. Todas as manipulações dos microorganismos foram realizadas em capela de fluxo laminar (Pachane 410, Brasil).

Cada uma das cepas bacterianas foi incluída em 1 mL de glicerol 20%, acondicionada em 10 tubos do tipo Eppendorf (Hamburg, Alemanha) e armazenadas em freezer (Sanyo – Reino Unido) na temperatura de -80°C. Tal procedimento tem a finalidade de manter um estoque padrão das cepas.

Inicialmente um tubo do tipo Eppendorf armazenado no freezer na temperatura -80°C foi descongelado em temperatura ambiente, em seguida foram realizadas estrias em 3 placas de Petri contendo meio geleificado estéril TSA com alça de platina (técnica do esgotamento), como ilustra a figura 4.1. Essas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC por 24 horas.



a b c

Figura 4.1 – Estrias da *P. aeruginosa* (a)*, S. aureus* (b) e *E. faecalis* em meio sólido TSA (c)

Com o crescimento e isolamento, uma colônia típica foi inoculada em tubo de ensaio contendo 10 ml do meio TSB estéril e novamente incubado em estufa bacteriológica a 37ºC por 24 horas (figura 4.2).

a b c

Figura 4.2 – Meio de cultura TSB turvo com o crescimento bacteriano da *P. aeruginosa* (a), *S. aureus* (b) e *E. faecalis* (c)

4.1.3 Determinação da concentração das suspensões bacterianas

Decorrido o tempo de crescimento de 24 horas, as suspensões foram padronizadas em 10^8 UFC/mL à partir de uma alíquota de 1 ml, em espectrofotômetro (U-2001 Spectrophotometer – HIYACHI, Massachusetts, EUA) para ajuste da Densidade Óptica (DO) por absorbância (ABS), em comprimento de onda de 546nm, de acordo com a quadro 4.1.

Suspensão Bacteriana	DO (ABS)
Staphylococcus aureus	0.150ABS
Enterococcus faecalis	0.800ABS
Pseudomonas aeruginosa	0.600ABS

Quadro 4.1 - Densidade óptica (DO) por absorbância (ABS) para ajuste da concentração das suspensões bacterianas

4.1.4 Diluição em série

Determinadas as concentrações das suspensões bacterianas e imediatamente após a exposição das amostras aos grupos experimentais, foram feitas diluições seriadas, sendo 1 ml da suspensão bacteriana inoculada em 9 ml de solução de NaCl 0,9% (Quimex, São Paulo, Brasil) a 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} e 10^{-8} e imediatamente após, feito o plaqueamento por gota (25 µl/gota), sendo 3 gotas por concentração em 3 placas de Petri contendo o meio TSA (figura 4.3). Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37ºC por 24 horas.

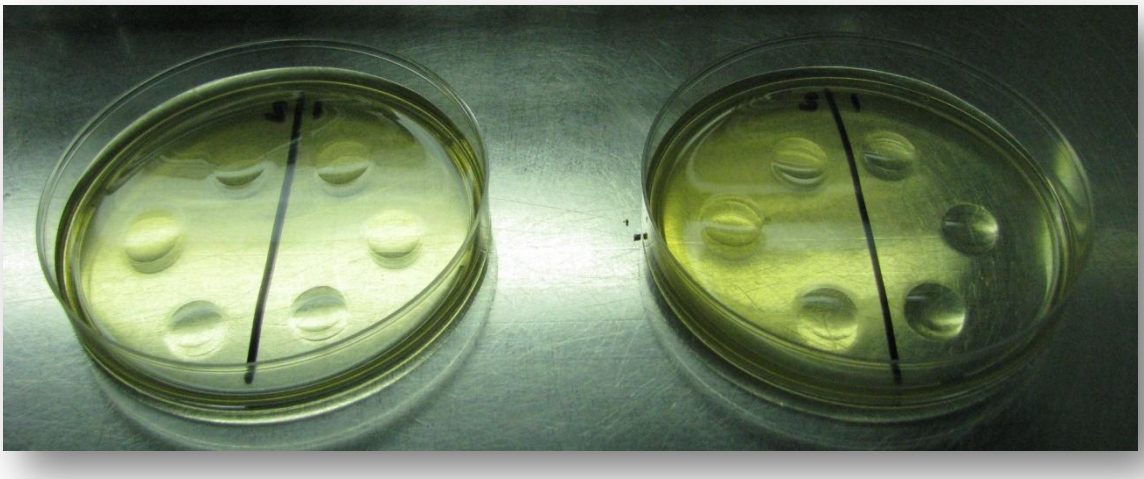


Figura 4.3 – Plaqueamento por gota nas placas de Petri previamente à incubação em estufa 37°C

A contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/ml) foi realizada após 24 horas de incubação.

4.1.5 Padronização da água ozonizada

O aparelho gerador de ozônio Philozon® (Santa Catarina, Brasil) foi utilizado para a realização dos experimentos. Este apresenta auto calibração, com estabilização do sistema automático e pode produzir o ozônio de forma fracionada ou em modo contínuo. Para tanto, é necessária a utilização de oxigênio com grau de

pureza medicinal (Respirox – São Paulo, Brasil) e com fluxo regulado em 1L/min (Figura 4.4).

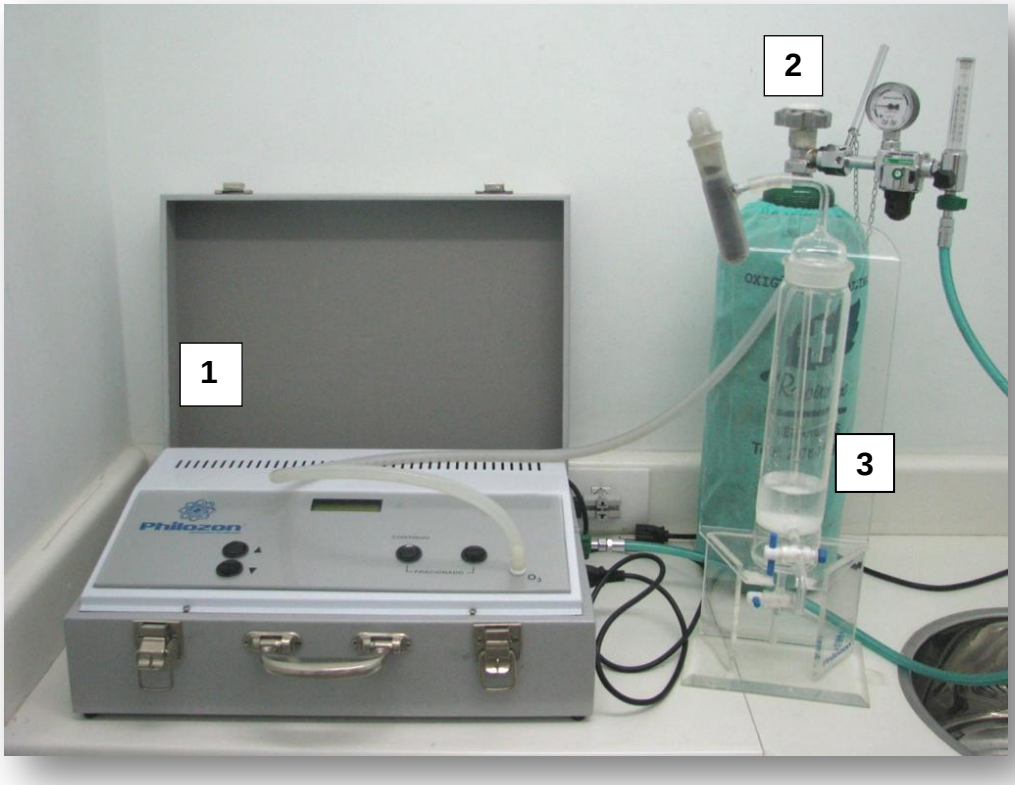


Figura 4.4 – (1) Gerador de Ozônio Philozon; (2) Cilindro de oxigênio medicinal com regulador de fluxo; e, (3) Coluna de vidro utilizada para ozonizar a água

A precisão na concentração de ozônio fornecida pelo aparelho é calibrada fotometricamente no laboratório do fabricante. As concentrações de produção do gás ozônio permitidas por este aparelho variam de 5 a 60 µg/mL. Na ausência do oxigênio o equipamento desliga-se automaticamente.

Foi utilizada água bidestilada, estéril e resfriada em 14°C, mantida sob refrigeração até o momento do uso. Então, a água foi transferida para uma coluna de vidro (Philozon, Santa Catarina, Brasil) e assim iniciado o processo de diluição do ozônio na água (Figura 4.4). O gás ozônio foi ajustado no gerador para as concentrações requeridas para o modelo experimental e devidamente confirmadas por meio do kit colorimétrico CHMETs Ozone (CHEMets® Kit Ozone K-7402 – Precision Laboratories, São Paulo, Brazil), conforme figura 4.5. Para tal, foram colhidos 5 mL da água ozonizada e misturados com 20 mL da água bidestilada

estéril sem ozônio no frasco que compõe o kit, e feita a comparação visual na escala de cores. Os demais procedimentos foram realizados de acordo com a orientação do fabricante.

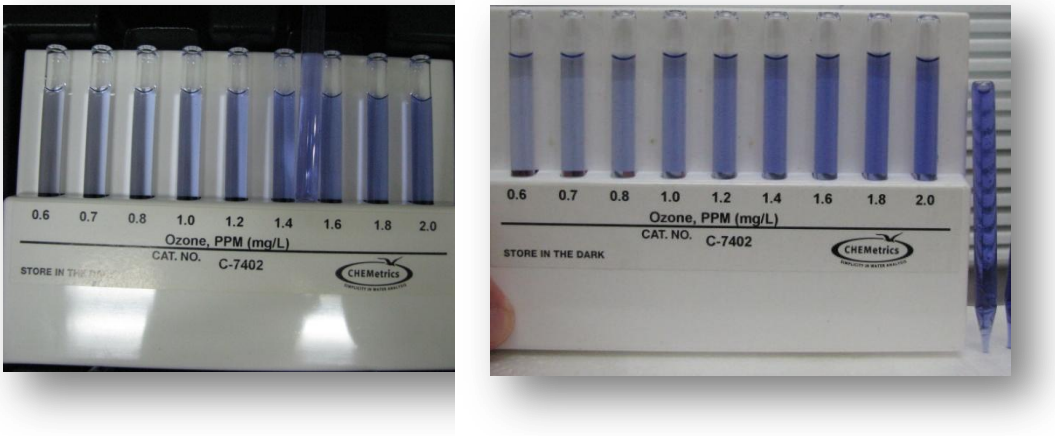


Figura 4.5 - Confirmação da concentração do ozônio na água bidestilada (CHEMets® Kit Ozone K-7402)

Inicialmente, foram ozonizados 250 mL da água bidestilada e em seguida descartados, para garantir a limpeza da coluna de vidro. Outros 250 mL foram ozonizados por um período de 5 minutos, segundo protocolo estabelecido por Viebahn-Haensler (2007).

4.2 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ÁGUA OZONIZADA SOBRE SUSPENSÃO BACTERIANA DE *Enterococcus faecalis*. *Pseudomonas aeruginosa E Staphylococcus aureus* – ESTUDO *IN VITRO*

Feita a padronização e reativação das suspensões bacterianas, seguiram para os grupos experimentais:

4.2.1 Grupos experimentais

Grupo I – Água Bidestilada Ozonizada na concentração de 5 µg/mL

Grupo II – Água Bidestilada Ozonizada na concentração de 20 µg/mL

Grupo III – Água Bidestilada Ozonizada na concentração de 40 µg/mL

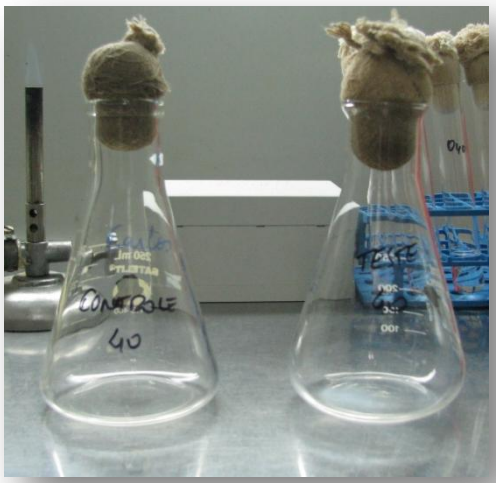
Uma amostra de 90 mL da água ozonizada foi transferida a um Erlenmayer contendo 10 mL da suspensão bacteriana e um tempo de contato de 1 minuto foi estabelecido. Vale lembrar que paralelamente, para cada grupo experimental houve um controle (Figura 4.6), onde foi utilizada a água bidestilada, resfriada, sem ozônio. Em seguida, 1 ml destas suspensões foi adicionado em 9 ml de tiossulfato de sódio 0,1% para neutralizar a ação do ozônio, seguindo para as diluições seriadas e plaqueamento de acordo com o protocolo de padronização para análise microbiológica descrito acima. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.2.2 Teste de morte

Decorrido o tempo de 1 minuto de contato da suspensão com a água ozonizada, 1 mL de cada suspensão bacteriana de cada grupo experimental foi colocado em um tubo contendo 9 mL de meio TSB, totalizando 45 tubos por microrganismo testado. Esse conjunto foi levado à estufa 37°C e permaneceu em repouso por 7 dias.

A

B



C

Figura 4.6 – Amostras experimentais e respectivos controles dos grupos: I (A); II (B); e, III (C)

4.3 AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ÁGUA OZONIZADA E O GÁS OZÔNIO NA DESCONTAMINAÇÃO DE CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa E Staphylococcus aureus* – ESTUDO *EX VIVO*

Previamente à inclusão dos dentes, as suspensões bacterianas foram preparadas separadamente segundo padrão já descrito.

4.3.1 Critérios de inclusão da amostra

Os dentes utilizados foram fornecidos pelo Banco de Dentes Humanos da FOUSP, limpos, hidratados e mantidos em câmara úmida até o momento do uso, seguindo os seguintes critérios de inclusão:

- Foram utilizados 180 dentes, sendo 60 dentes para cada suspensão bacteriana,
- Unirradicular;
- Canal único e
- Rizogênese completa

4.3.2 Preparo das amostras

As coroas foram removidas padronizando o comprimento das raízes em 17 mm.

A partir da localização do canal radicular e forame apical com um instrumento endodôntico tipo K nº10 (Maillefer – S.A., Swiss), foi realizada a instrumentação seriada inicial dos canais radiculares à 1 mm do ápice anatômico até a lima K nº25. A cada troca de instrumento foi feita irrigação com 3 mL de solução de hipoclorito de sódio 1% (Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil). As brocas Gates-Glidden #2 e #3 (Maillefer – S.A., Swiss) foram utilizadas para o preparo da entrada do canal. Após a

instrumentação inicial, os canais radiculares foram preenchidos com solução de EDTA-T 17% que permaneceu em contato por três minutos, seguidos da irrigação final com 5 mL de solução fisiológica.

Os espécimes foram impermeabilizados externamente com cianoacrilato de etila (Super Bonder®) e apicalmente, utilizando resina fotopolimerizável para posterior esterilização em autoclave à 121 °C durante 15 minutos.

4.3.3 Inclusão dos espécimes

Os espécimes foram incluídos em placas de poliestireno e fixados com resina acrílica quimicamente ativada, como ilustra a figura 4.7. Em seguida, foram inoculados intracanal com 10 μL de suspensão de *E.* faecalis, *S. aureus, P. aeruginosa,* na concentração de 10^8 células/mL incubadas em meio TSB por 7dias, com renovação do meio de cultura a cada 48 horas.

Figura 4.7 – Placa de poliestireno com os dentes incluídos em resina quimicamente ativada

4.3.4 Grupos experimentais

Decorrido o período de incubação de 7 dias, os dentes foram distribuídos aleatoriamente segundo os grupos experimentais:

Grupo I: (15 dentes - controle): os dentes foram preparados para contagem de unidades formadoras de colônias sendo colocados em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução de tiossulfato de sódio 0,1% e então submetidos à agitação mecânica (Agitador *Vortex* – QL-901, Paulínia, São Paulo*)* de 200 rpm por 30s. Após 30 minutos em repouso, foram feitas diluições seriadas a 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,9%. Em seguida, três alíquotas de 25 μl, correspondente a diluição, foram gotejadas em três placas de Petri contendo o meio de cultura TSA.

A coleta de dados foi realizada por contagem de UFC/mL após 24h de incubação das placas em estufa a 37^0C.

Grupo II: (15 dentes): os dentes foram submetidos ao preparo químico cirúrgico empregando os instrumentos rotatórios EndoSequence (Brasseler, EUA) 25/.06, 30/.06, 35/.06 e 40/.06 com a associação do Endo PTC gel e hipoclorito de sódio 1% (Fórmula e Ação, São Paulo, Brasil). A cada troca de instrumento o canal foi irrigado com 2 mL de hipoclorito de sódio 1%. A irrigação final foi feita com 10 mL de EDTA-T 17%.

Grupo III: (15 dentes): os dentes foram submetidos ao preparo químico cirúrgico empregando os instrumentos rotatórios EndoSequence (Brasseler, EUA) 25/.06, 30/.06, 35/.06 e 40/.06 com a associação do Endo PTC gel e hipoclorito de sódio 1%. A cada troca de instrumento o canal foi irrigado com 2 mL de hipoclorito de sódio 1%. A irrigação final foi feita com 10 mL de EDTA-T 17% e 10 mL do gás ozônio na concentração de 40 µg/mL, utilizando o gerador de ozônio Philozon (Santa Catarina – Brasil).

Grupo IV: (15 dentes): os dentes foram submetidos ao preparo químico cirúrgico empregando os instrumentos rotatórios EndoSequence (Brasseler, EUA) 25/.06, 30/.06, 35/.06 e 40/.06 com a associação do Endo PTC gel e hipoclorito de sódio 1%. A cada troca de instrumento o canal foi irrigado com 2 mL de hipoclorito de sódio 1%. A irrigação final foi feita com 10 mL de EDTA-T 17% e 10 mL de água bidestilada estéril ozonizada na concentração de 40 µg/mL, utilizando o gerador de ozônio Philozon (Santa Catarina – Brasil).

Finalizado o preparo químico cirúrgico das amostras, foram feitos os procedimentos necessários para a contagem de unidades formadoras de colônias de acordo com o protocolo descrito no Grupo I.

4.4 REAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTURA DE FIBROBLASTOS DE GENGIVA

Para a realização desta fase experimental foi utilizada a linhagem celular de fibroblastos de gengiva humana (FMM1) fornecida pelo Laboratório de Pesquisas

Básicas do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Todos os procedimentos experimentais para a obtenção do cultivo celular de fibroblastos foram realizados em Capela de Fluxo laminar sob rígido protocolo de desinfecção, em temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata.

Um tubo criogênico contendo as células foi descongelado em banho de água por 2 minutos a 37°C. Após o descongelamento, as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação contendo 5 mL de meio DME (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA).

A centrifugação do tubo com as células foi feita em 1000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células ressuspenso em 1 mL de meio de cultura DME.

Essa suspensão de células foi transferida para um frasco de cultivo de 25 cm^3 contendo 5 mL de meio de cultura DME, com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico-antimicótico, mantido em estufa a 37°C e atmosfera úmida e 5% de CO_2.

O crescimento celular foi monitorado a cada 24h utilizando-se microscópio de fase invertido e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

O subcultivo dessas células foi realizado quando estas tivessem ocupado cerca de 70% da área cultivável do frasco, tornando-se subconfluente. Para isso, 5 mL do meio de cultura foi removido e reservado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada duas vezes com uma solução tampão fosfato-salina livre de cálcio e magnésio, PBSA de pH 7,2.

Para a remoção da monocamada celular do fundo do frasco, foi colocado 3 mL de solução de tripsina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) contendo 0,25% de EDTA 1mM (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), durante 3 minutos a 37°C.

A tripsina foi inativada utilizando-se o meio de cultura reservado anteriormente, e as células em suspensão foram transferidas para um tubo de 15 mL e

centrifugadas em 1.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante de células foi aspirado e ressuspenso em 1 mL de meio de cultura.

Para a perpetuação da linhagem celular, frações de 500 μL de suspensão de células foram distribuídas em frascos de 25 cm^3 contendo 5 mL de meio de cultivo. Os frascos foram novamente mantidos em estufa a 37°C, contendo atmosfera úmida e 5% de CO_2. Obtiveram-se assim dois frascos contendo as células para a realização da fase experimental.

4.4.1 Grupos Experimentais

Análise da viabilidade celular utilizando contato direto da substância a ser testada nos tempos experimentais de 0, 24, 48 e 72 horas.

Grupo I: Controle – Meio de Cultura
Grupo II: PBS ozonizado na concentração de 10 µg/mL
Grupo III: PBS ozonizado na concentração de 20 µg/mL
Grupo IV: PBS ozonizado na concentração de 40 µg/mL

4.4.2 Contagem celular para o plaqueamento

Nesta fase do experimento, as células crescidas nos frascos foram lavadas em PBS e posteriormente tripsinizadas e contadas para determinação do número de células existentes. Essa suspensão foi centrifugada por 5 minutos e o precipitado de células ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. Parte da suspensão (100 µL) foi depositada em um novo tubo de 15mL contendo 800 µL de PBS e 100 µL de azul de Trypan.

Essa suspensão foi aplicada em uma câmara de Neubauer e o número total de células do frasco obtido através do seguinte cálculo:

$$\frac{\text{N° total de células viáveis X } 10^4}{\text{Nº de quadrados do hemocitômetro utilizados na contagem}}$$

Foram plaqueadas 500 células em cada poço da placa, com oito poços para cada grupo experimental.

4.4.3 Aplicação das Substâncias a serem testadas

O PBS ozonizado para cada grupo experimental foi aplicado na cultura celular após 24h e permaneceu em contato com as células por um período de 5 minutos. Em seguida essa substância foi removida e aplicado o meio de cultura. O teste MTT foi aplicado de acordo com os tempos experimentais de 0, 24, 48 e 72 horas. Assim, o meio de cultura foi aspirado dos poços e 10 uL de solução de MTT (componente "A" do kit Vybrant MTT Cell Proliferation Assay kit, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) em PBS foi colocado nos poços e a placa foi novamente incubada por 4 h em estufa. A seguir, a solução de MTT dos poços foi removida e acrescidos 100 uL de DMSO e 25 uL de tampão glicina. Decorrido tempo de 15 minutos, foi realizada a leitura dos resultados em espectrofotômetro de ELISA que foi programada utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 562 nm.

4.5 Análise estatística dos resultados

Ao término dos experimentos microbiológicos e de viabilidade celular, os dados foram tabulados em planilha Excel™ (Microsoft Corporation, EUA) e submetidos à

análise estatística por intermédio do programa Biostat versão 5.0, com nível de significância de P≤0,5%.

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados coletados das análises microbiológicas e celular foram divididos em tópicos para o melhor entendimento e para o cálculo estatístico os números foram dispostos de maneira absoluta.

A tabela 5.1 mostra a relação entre o ozônio produzido pelo gerador e a real concentração obtida na água.

Tabela 5.1 **-** Relação da concentração de ozônio produzido pelo gerador e o absorvido pela água

Concentração do ozônio produzido pelo gerador	**Concentração do ozônio absorvido pela água**
5 μg/mL	2,0 ppm
20 μg/mL	5,0 ppm
40 μg/mL	8,0 ppm

5.1 RESULTADO DA ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DA ÁGUA OZONIZADA SOBRE AS SUSPENSÕES DE *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa E Staphylococcus aureus* – ESTUDO *IN VITRO*

A média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus* estão dispostos nas tabelas 5.2, 5.3 e 5.4 e ilustrados nos gráficos 5.1, 5.2 e 5.3, respectivamente.

O Grupo Controle do *Enterococcus faecalis* mostrou uma média aritmética de crescimento de $3{,}59X10^5$. Nos Grupos II (Ozônio 20) e III (Ozônio 40) não foi possível detectar contagem das UFC/mL. O Grupo I, que compreende a água ozonizada na concentração de 5 μg/mL apresentou uma média aritmética de crescimento de $1{,}52X10^4$ (Tabela 5.2 e Gráfico 5.1).

Diante do resultado ND obtido não foi possível a realização dos testes estatísticos.

Tabela 5.2 – Média aritmética do crescimento do *E. faecalis* nos grupos experimentais

Controle	Ozônio 5 (I)	Ozônio 20 (II)	Ozônio 40 (III)
3,59E+05	1,52E+04	ND	ND

ND=não detectável

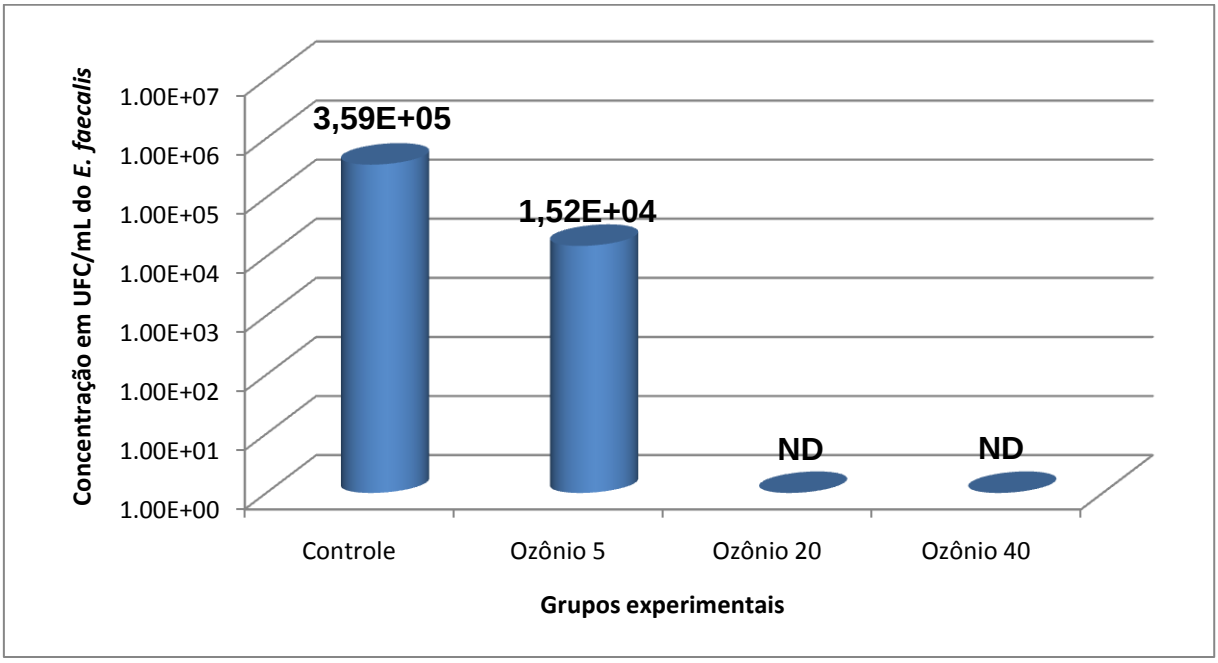


Gráfico 5.1 – Representação gráfica da média aritmética do crescimento do *E. faecalis*

A *P. aeruginosa* mostrou-se sensível a todos os grupos experimentais, assim, não foi possível detectar contagem das UFC/mL. Dessa forma, identicamente ao *E. faecalis* não foi possível realizar os testes da análise estatística (Tabela 5.3 e Gráfico 5.2).

Tabela 5.3 – Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre *P.aeruginosa*

Controle	Ozônio 5 (I)	Ozônio 20 (II)	Ozônio 40 (III)
3,08E+03	ND	ND	ND

ND=não detectável

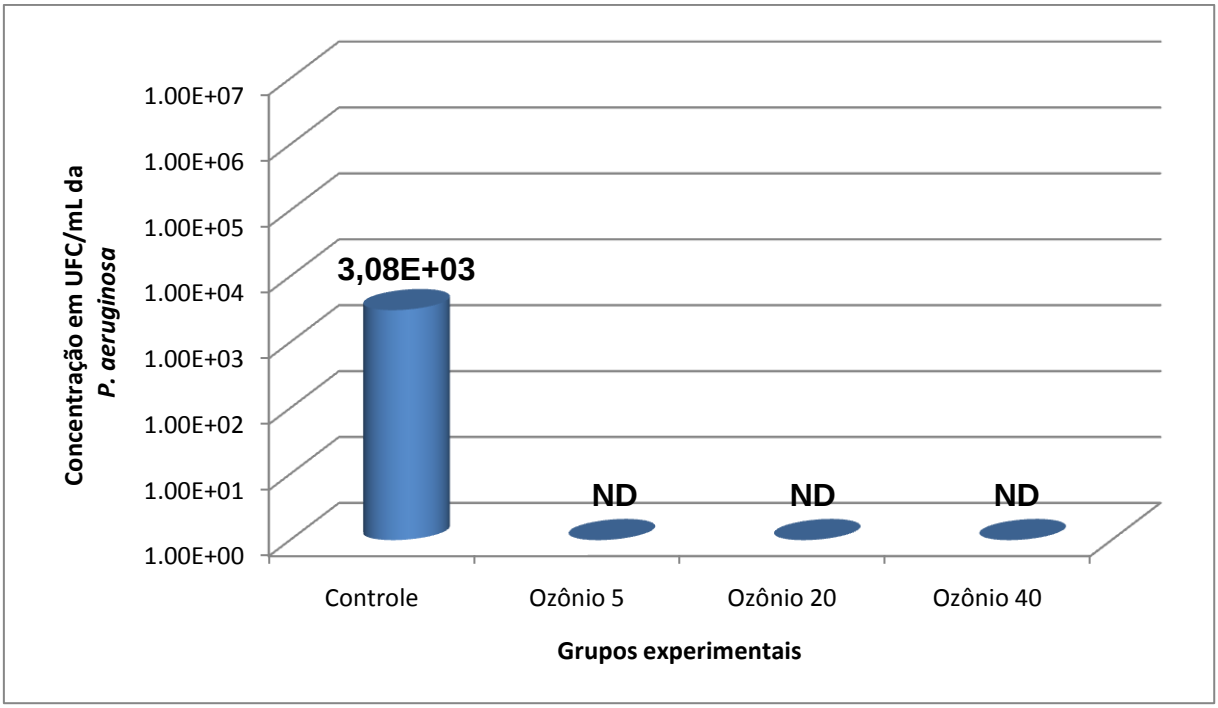


Gráfico 5.2 – Representação da redução da *P.aeruginosa* pelos grupos experimentais

O *S. aureus*, semelhante à *P. aeruginosa*, se mostrou sensível aos grupos experimentais, assim, não foi possível detectar contagem das UFC/mL, consequentemente, não foram realizados os testes estatísticos (Tabela 5.4 e Gráfico 5.3).

Tabela 5.4 – Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *S. aureus*

Controle	Ozônio 5 (I)	Ozônio 20 (II)	Ozônio 40 (III)
1,22E+05	ND	ND	ND

ND=não detectável

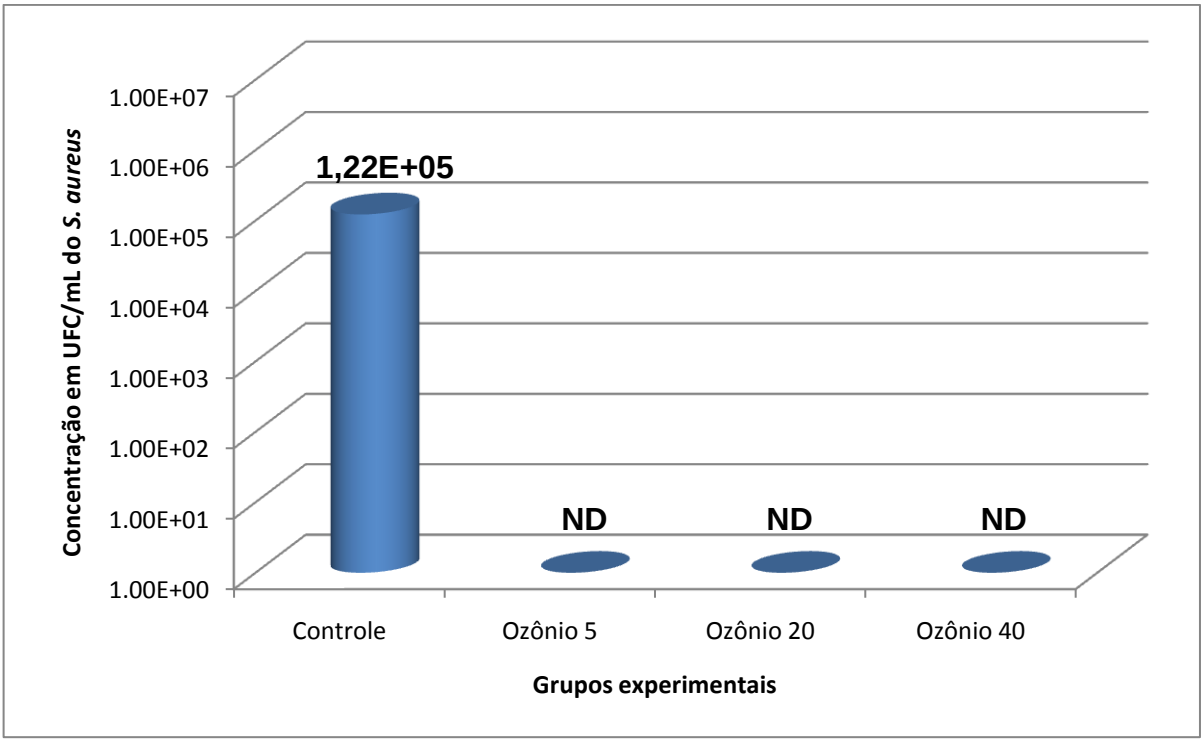


Gráfico 5.3 – Representação gráfica da redução do *S. aureus* pelos grupos experimentais

5.1.1 Resultado do teste de morte

Decorridos 7 dias de incubação, os tubos, sendo 15 para cada grupo experimental, foram retirados da estufa à 37°C e analisados com vistas ao turvamento do meio. Obteve-se como resultado que os 90 tubos com meio de cultura TSB relacionados aos Grupos I, II e III não apresentaram turvamento para o *S. aureus* e *P. aeruginosa.* Dos 45 tubos para o *E. faecalis,* 16 tubos apresentaram turvamento, sendo 14 para o Grupo I e 2 para o Grupo II, conforme apresentado pela tabela 5.5.

Tabela 5.5 – Quantidade de tubos contendo meio de cultura TSB que apresentaram turvamento após 7 dias de incubação em estufa 37°C

Microrganismos	Grupo I (Ozônio 5)	Grupo II (Ozônio 20)	Grupo III (Ozônio 40)
S. aureus	0	0	0
P. aeruginosa	0	0	0
E. faecalis	14	2	0

5.2 RESULTADO DA EFETIVIDADE DA ÁGUA OZONIZADA E DO GÁS OZÔNIO NA REDUÇÃO MICROBIANA REALIZADA EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS COM *Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa E Staphylococcus aureus* – ESTUDO *EX VIVO*

5.2.1 Interações dos dados provenientes da análise dos diferentes grupos experimentais em relação a cada microrganismo testado

Na análise da ação antimicrobiana dos grupos experimentais sobre o *E. faecalis* não foi possível detectar contagem das UFC/mL (Tabela 5.6 e Gráfico 5.4), indicando que todos os grupos experimentais foram efetivos, enquanto para o controle, a concentração de UFC/mL foi de $7{,}05X10^5$.

Tabela 5.6 – Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *E. faecalis*

Grupo I (controle de contaminação)	Grupo II (FOUSP)	Grupo III (FOUSP + $Ozônio_{gás}$)	Grupo IV (FOUSP + Água Ozonizada)
7,05E+05	ND	ND	ND

ND=não detectável

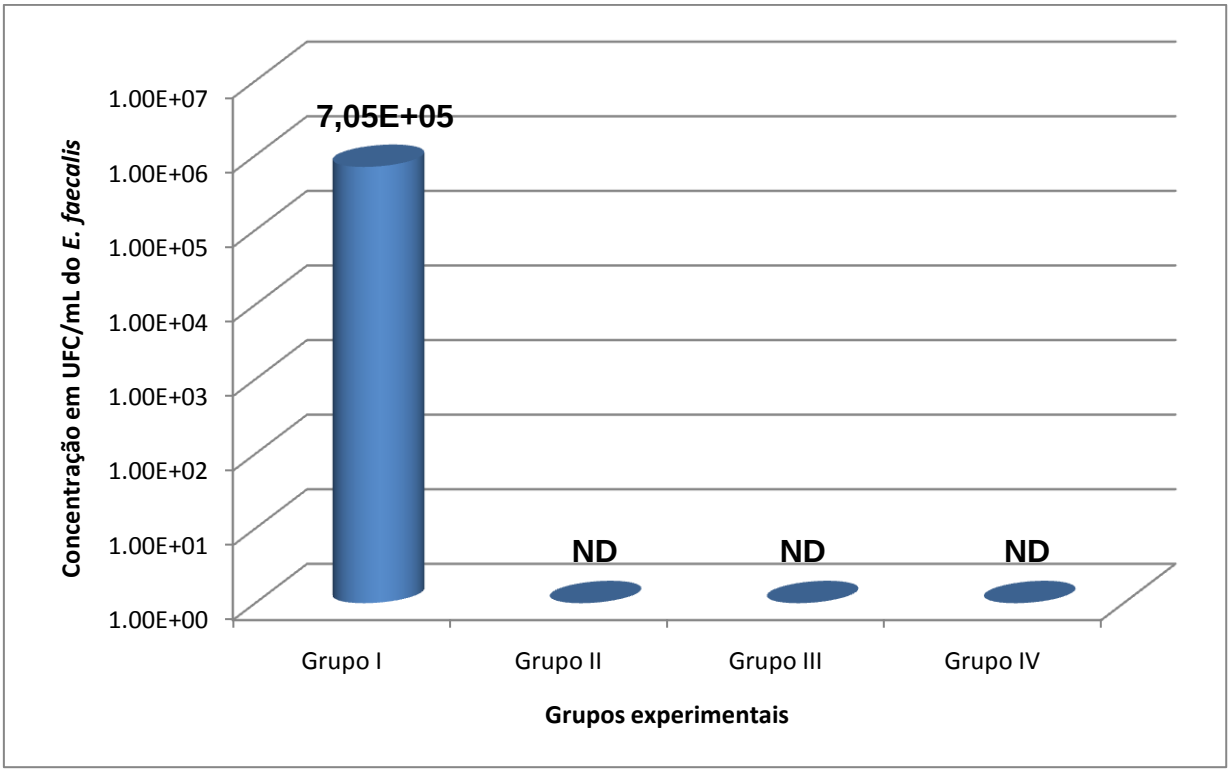


Gráfico 5.4 **-** Média aritmética dos grupos experimentais sobre *E. faecalis*

A média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *Staphylococcus aureus* estão ilustrados na tabela 5.7 e gráfico 5.5.

A análise da ação antimicrobiana dos grupos experimentais sobre o *S. aureus* apontou efeito sobre o microrganismo testado. O grupo controle contou com uma concentração de $8{,}15X10^5$ e os grupos experimentais II (FOUSP) e III (FOUSP + $Ozônio_{gás}$) apresentaram um decréscimo das UFC/mL para $6{,}76X10^2$ e $2{,}76X10^2$, respectivamente. O grupo IV foi o mais efetivo na redução microbiana, apresentando uma redução para $8{,}46X10^1$ (Tabela 5.7 e Gráfico 5.5).

Na análise estatística não ocorreu normalidade e homogeneidade nas amostras testadas, assim, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn com significância de 5%. Foi determinado que para o *S. aureus* não houve diferença significante entre os três grupos experimentais (Tabela 5.8). O Grupo I foi considerado controle de contaminação, portanto não foi incluído no cálculo estatístico.

Tabela 5.7 – Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre o *S. aureus*

Grupo I (controle de contaminação)	Grupo II (FOUSP)	Grupo III (FOUSP + Ozônio$_{gás}$)	Grupo IV (FOUSP + Água Ozonizada)
8,15E+05	6,76E+02	2,76E+02	8,46E+01

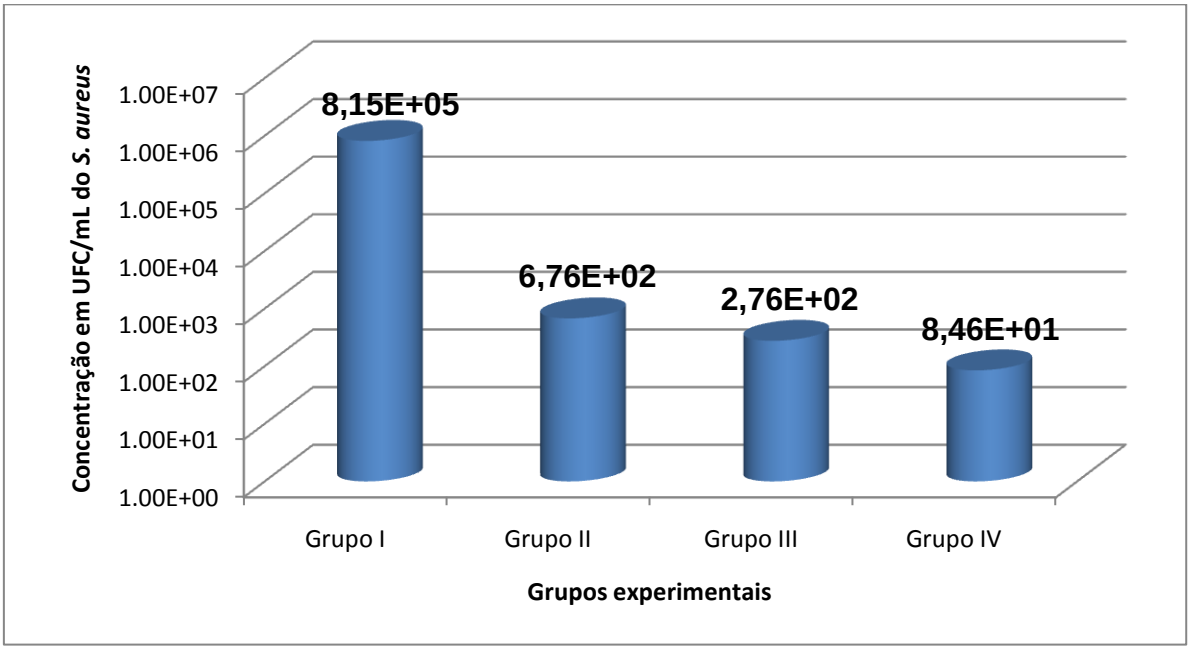


Gráfico 5.5 **–** Média aritmética dos grupos experimentais sobre *S. aureus*

Tabela 5.8 – Média dos postos e valor crítico da análise estatística da redução microbiana do *S. aureus* proporcionada pelos grupos experimentais

Grupos	Média dos postos	Valor crítico
II	24.4000[a]	2.635
III	23.1333[a]	2.635
IV	21.4667[a]	2.635

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

A análise da efetividade dos protocolos instituídos sobre *P. aeruginosa* na forma de média aritmética revelou um decréscimo da contagem das UFC/mL. O grupo controle contou com um crescimento de $6,71X10^6$ e os grupos experimentais

III, II e IV apresentaram contagem de $2,11X10^5$, $2,87X10^4$ e $2,44X10^3$, respectivamente (Tabela 5.9 e Gráfico 5.6).

O teste de normalidade na análise estatística revelou uma distribuição não normal e não homogênea nas amostras testadas, assim, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn, com grau de significância de 5%. Dessa forma, o Grupo IV revelou ser mais efetivo, com diferença significante para os Grupos II e III ($p<0.05$). Já os Grupos II e III não apresentaram diferença significante entre si, como apresentado na tabela 5.10. O Grupo I, por ser o controle de contaminação, não foi incluído na análise estatística.

Tabela 5.9 – Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre *P. aeruginosa*

Grupo I (controle de contaminação)	**Grupo II (FOUSP)**	**Grupo III (FOUSP + Ozônio$_{gás}$)**	**Grupo IV (FOUSP + Água Ozonizada)**
6,71E+06	2,87E+04	2,11E+05	2,44E+03

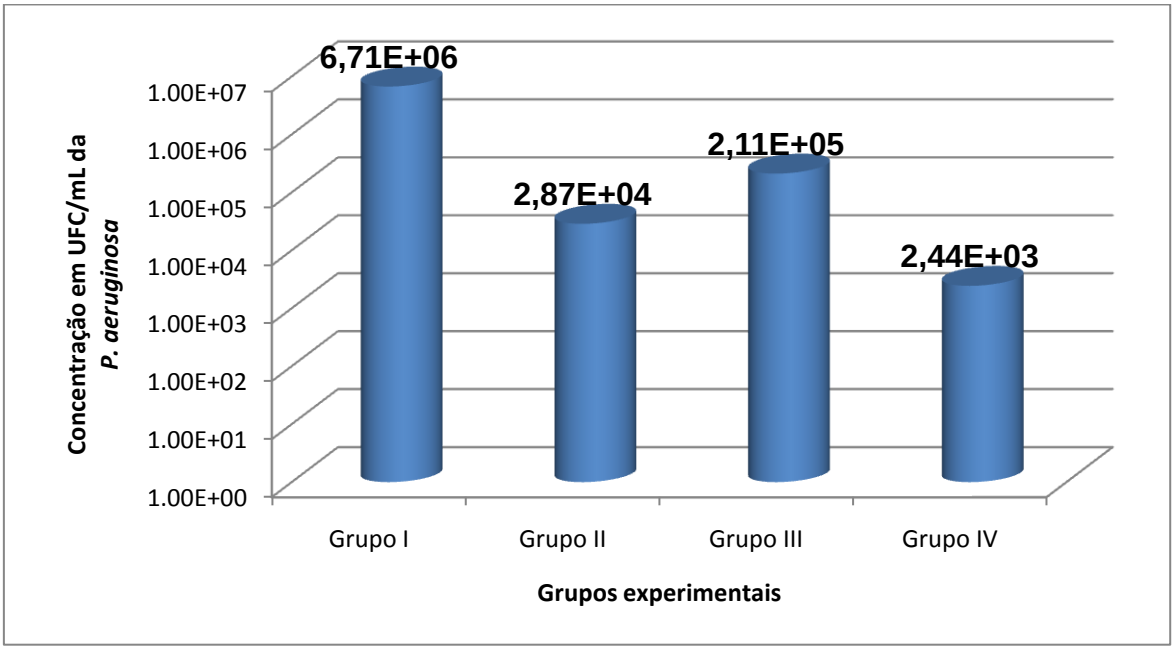


Gráfico 5.6 – Média aritmética da ação dos grupos experimentais sobre *P. aeruginosa*

Tabela 5.10 – Média dos postos e valor crítico da análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e Dunn da redução microbiana da *P. aeruginosa* proporcionada pelos grupos experimentais

Grupos	Média dos postos	Valor Crítico
II	27.4667 [a]	2.394
III	29.2000 [a]	2.394
IV	12.3333 [b]	2.394

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

5.2.2 Interações dos dados provenientes da análise de cada grupo experimental frente aos três microrganismos testados

O Grupo I foi destinado ao controle de contaminação, ou seja, a partir dele determinou-se a concentração total dos microrganismos. Foi possível observar um padrão semelhante de crescimento e as contagens das UFC/mL que foram realizadas após sete dias de incubação (Gráfico 5.7 e Tabela 5.11).

Na análise estatística não ocorreu normalidade e homogeneidade no grupo testado, assim, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn, com significância de 5%. Foi determinado que não houve diferença significante entre o crescimento dos três microrganismos testados.

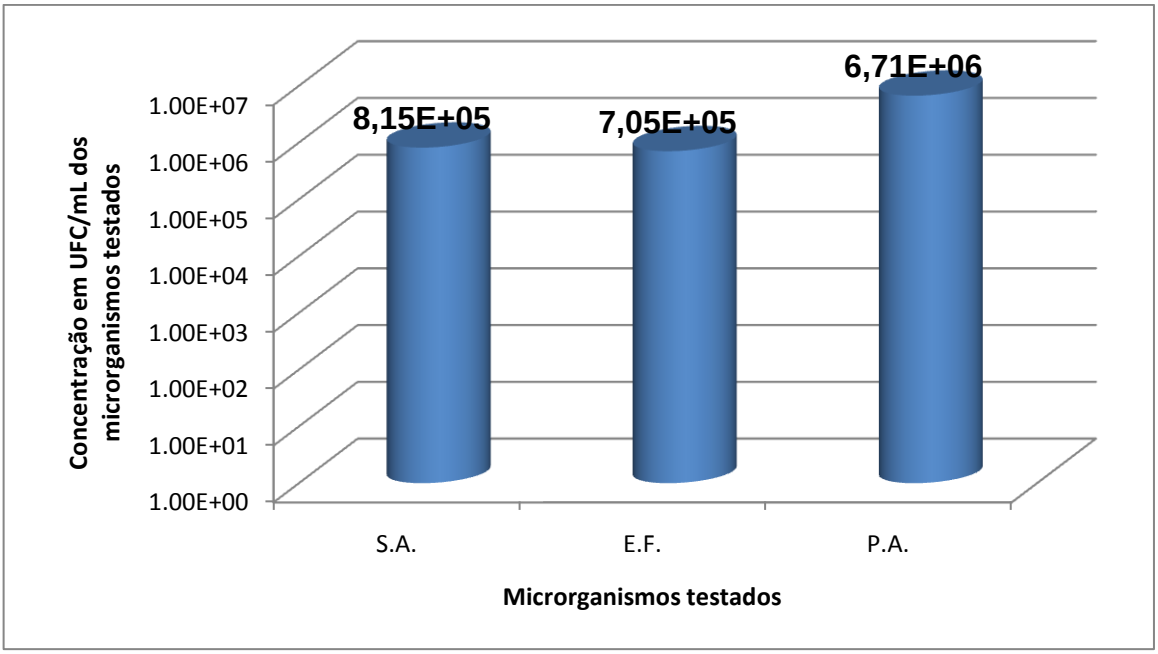


Gráfico 5.7 – Média aritmética do Grupo I sobre os três microrganismos testados

Tabela 5.11 – Média aritmética relativa ao Grupo I – controle de contaminação

Microrganismo	Médias aritméticas	Valor Crítico
S. aureus	8,15E+05[a]	0,2041
E. faecalis	7,05E+05[a]	0,2041
P. aeruginosa	6,71E+06[a]	0,2041

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

O Grupo II apresentou efetividade contra o *E. faecalis*, portanto não foi possível detectar contagem das UFC/mL. Para o *S. aureus e P. aeruginosa* houve uma redução de $8{,}15X10^5$ para $6{,}76X10^2$ e $6{,}71X10^6$ para $2{,}87X10^4$, respectivamente. A média aritmética dos dados está ilustrada na tabela 5.12 e no gráfico 5.8.

Tabela 5.12 – Média aritmética do Grupo II sobre os três microrganismos testados

Microrganismo	Médias aritméticas
S. aureus	6,76E+02
E. faecalis	ND
P. aeruginosa	2,87E+04

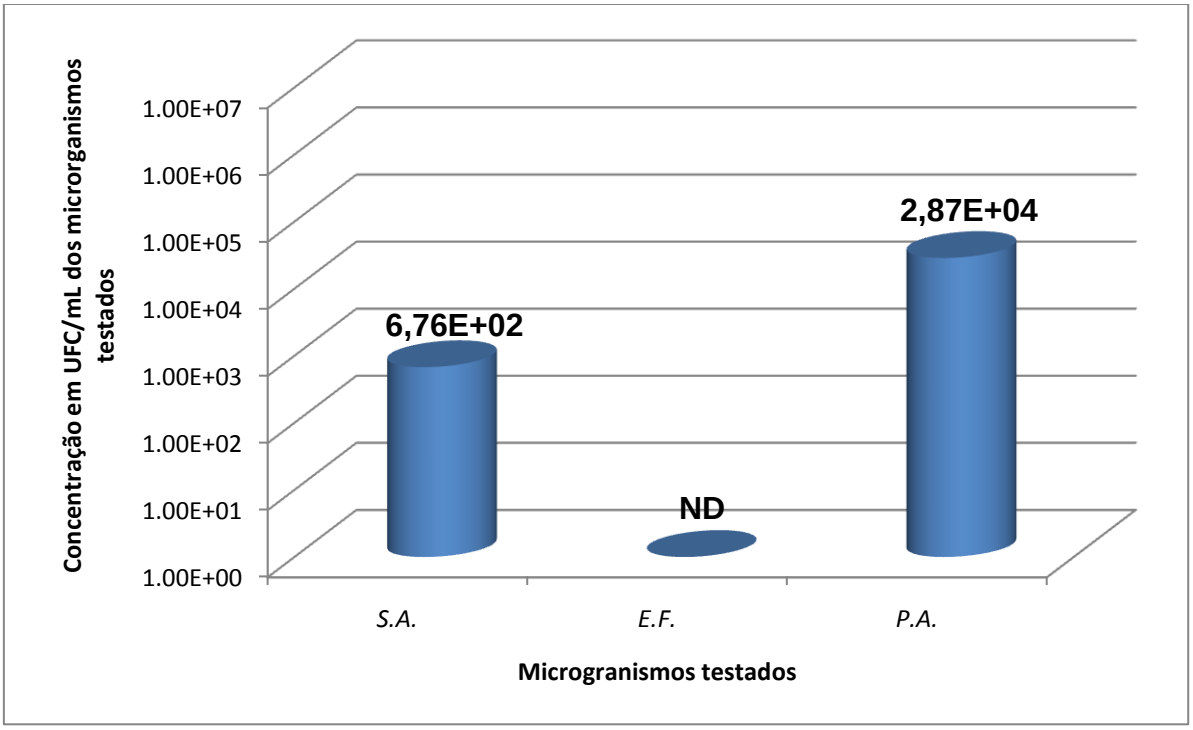


Gráfico 5.8 – Média aritmética do Grupo II sobre os três microrganismos testados

De acordo com a análise estatística, o teste de normalidade não apresentou uma distribuição normal e homogênea, assim, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com grau de significância de 5%. Dessa forma, foi determinado que a ação do Grupo II (protocolo FOUSP) frente ao *S. aureus e E. faecalis* não apresentou diferença significante. Já o *S. aureus e E. faecalis,* em relação à *P. aeruginosa,* apresentou diferença como demonstrado pela tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Média dos postos e valor crítico da ação antimicrobiana do Grupo II

Microrganismo	Média dos postos	Valor crítico
S. aureus	18,8667[a]	2,394
E. faecalis	15,5000[a]	2,394
P. aeruginosa	34,6333[b]	2,394

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

A tabela 5.14 e o gráfico 5.9 representam a média aritmética da ação do Grupo III (protocolo FOUSP + $Ozônio_{gás}$) sobre os microrganismos testados. A partir dessa análise, obteve-se como resultado que o protocolo instituído apresentou redução bacteriana, entretanto a *P. aeruginosa* mostrou-se resistente ao tratamento, totalizando uma concentração final de $2{,}11X10^5$, com diferença estatística significante para o *S. aureus e E. faecalis*, como ilustrado na tabela 5.15, pela média dos postos. O *S. aureus* apresentou crescimento de $2{,}76X10^1$, sem diferença estatística significante quando comparado ao *E. faecalis,* cuja contagem não foi detectável, sendo que a estatística realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com significância de 5%.

Tabela 5.14 - Média aritmética da ação do Grupo III sobre os microrganismos testados

Microrganismo	Médias aritméticas
S. aureus	2,76E+01
E. faecalis	ND
P. aeruginosa	2,11E+05

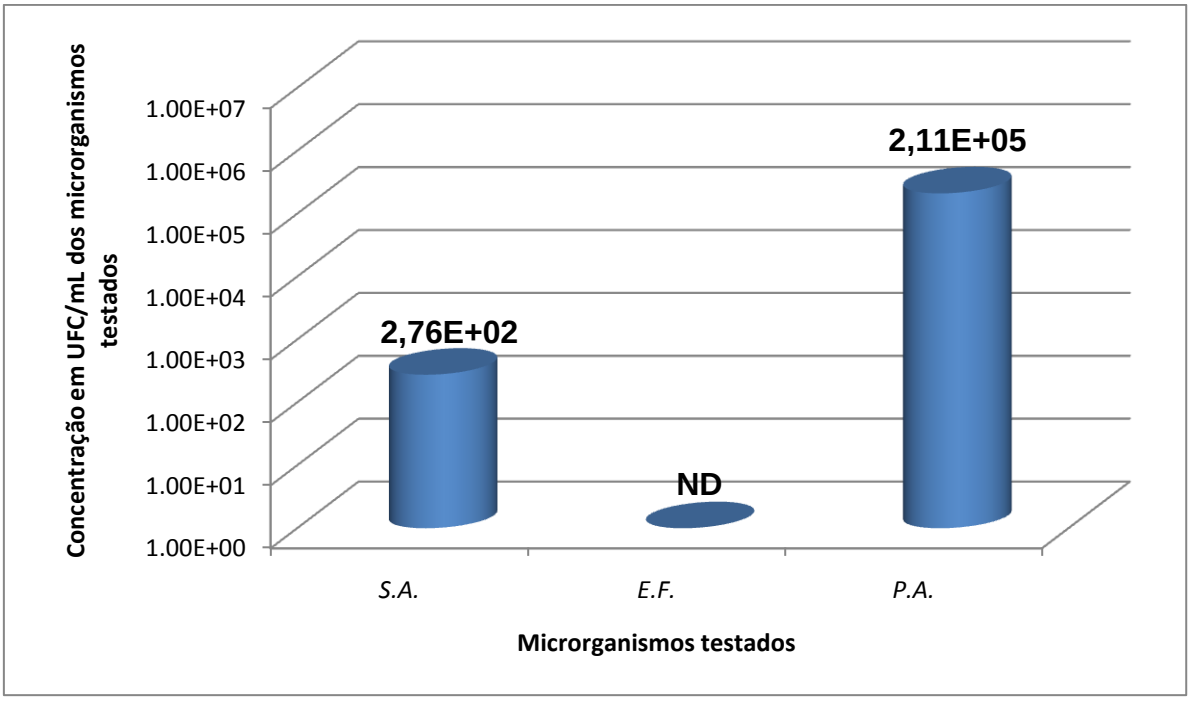


Gráfico 5.9 – Média aritmética da ação do grupo III sobre os microrganismos testados

Tabela 5.15 - Média dos postos e valor crítico da ação antimicrobiana do Grupo III

Microrganismo	Média dos postos	Valor crítico
S. aureus	18.2667 [a]	2.394
E. faecalis	16.0000 [a]	2.394
P. aeruginosa	34.7333 [b]	2.394

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

No Grupo IV (protocolo FOUSP + água ozonizada), o *E. faecalis* mostrou-se sensível a ponto da contagem final das UFC/mL não ser detectável. O *S. aureus* também se mostrou sensível ao protocolo instituído. A concentração inicial foi de $8{,}15X10^5$ e após a aplicação do grupo experimental houve redução para $8{,}47X10^1$. A contagem das UFC/mL da *P. aeruginosa* reduziu de $6{,}71X10^6$ para $2{,}44X10^3$. Tal fato é apresentado na tabela 5.16 e no gráfico 5.10.

A redução microbiana proporcionada pelo Grupo IV não foi estatisticamente significante em comparação aos demais grupos, pelo teste Kruskal Wallis, complementado pelo teste de Dunn com significância de 5%.

Tabela 5.16 - Média aritmética e valor crítico do Grupo IV sobre os microrganismos testados

Microrganismo	Médias aritméticas	Valor Crítico
S. aureus	8,47E+01[a]	0,8149
E. faecalis	ND[a]	0,8149
P. aeruginosa	2,44E+03[a]	0,8149

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

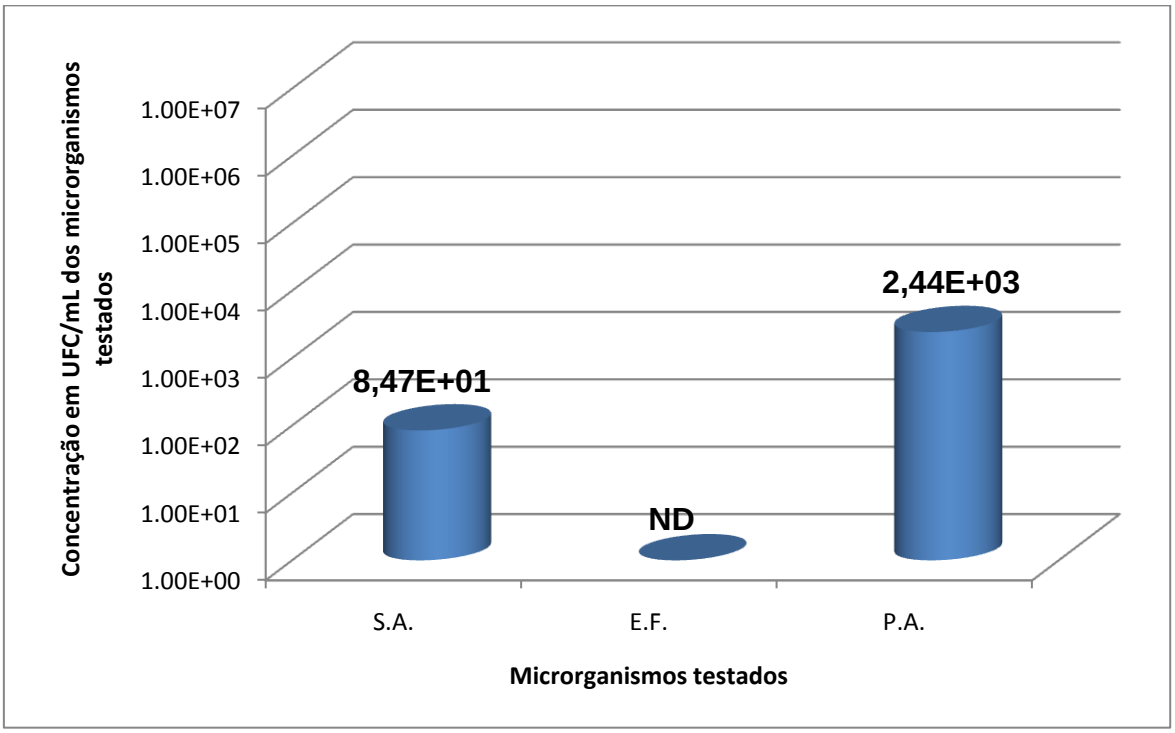


Gráfico 5.10 – Média aritmética do Grupo IV sobre os microrganismos testados

5.2.3 A análise da efetividade dos grupos experimentais sobre o conjunto dos microrganismos testados

Para efeito de uma representação de colônia mista fez-se a união dos resultados obtidos dos três microrganismos frente a cada grupo experimental.

A tabela 5.17 e o gráfico 5.11 ilustram os valores médios da análise da ação antimicrobiana dos grupos experimentais quando da união dos três microrganismos.

A concentração inicial do Grupo Controle foi de $2,74X10^6$. As concentrações finais dos Grupos II, III e IV foram de $9,78X10^3$, $7,06X10^4$ e $8,40X10^2$, respectivamente. O Grupo III foi o que apresentou menor redução microbiana, entretanto não houve diferença significante entre os Grupos, como apresentado na Tabela 5.18, pela média dos postos e valor crítico, cujo teste estatístico aplicado foi o Kruskal Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com significância de 5%.

Tabela 5.17 - Média aritmética da redução do conjunto de microrganismos proporcionada pelos diferentes grupos experimentais

Grupo	Média Aritmética
I (Controle de contaminação)	2,74E+06
II (FOUSP)	9,78E+03
III (FOUSP + Ozônio$_{gás}$)	7,06E+04
IV (FOUSP + Água Ozonizada)	8,40E+02

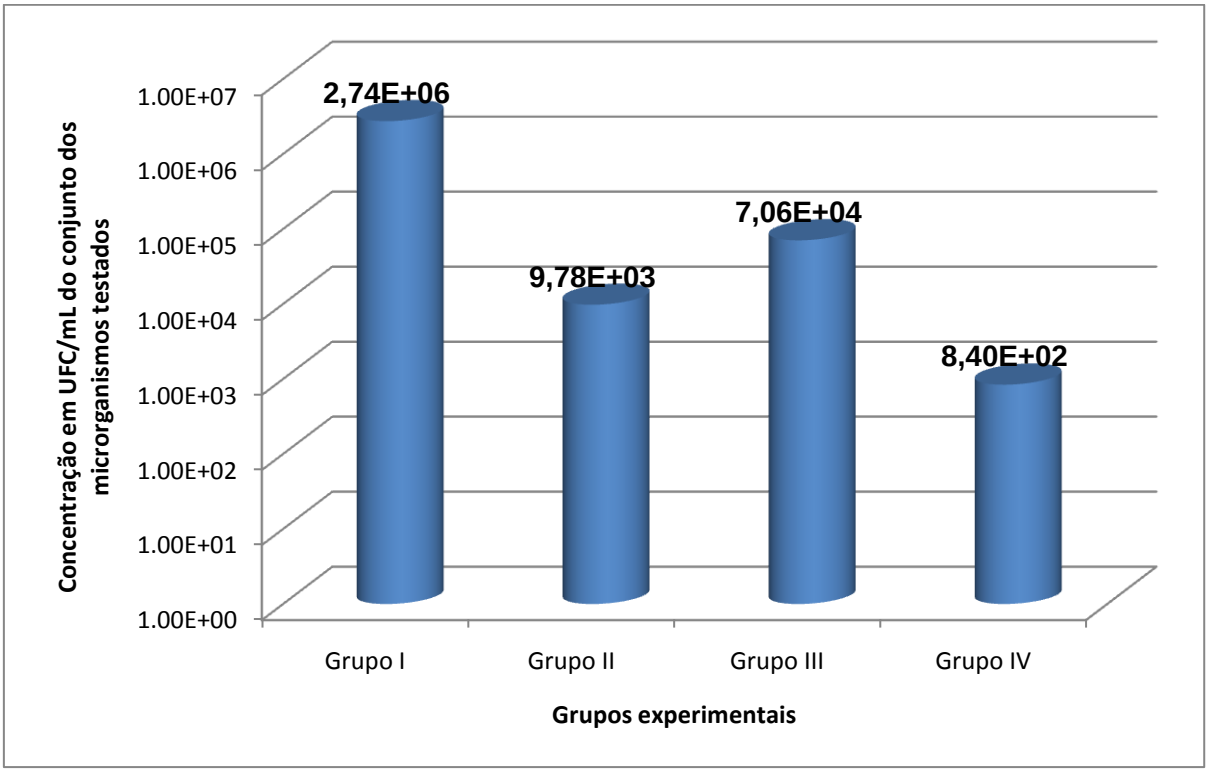


Gráfico 5.11 – Média aritmética da redução do conjunto de microrganismos proporcionada pelos diferentes grupos experimentais

Tabela 5.18 - Média dos postos e valor crítico dos grupos experimentais sobre os conjuntos de microrganismos testados

Grupo	Média dos postos	Valor Crítico
II	74,3111 [a]	2,394
III	73,6000 [a]	2,394
IV	56,0889 [a]	2,394

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

5.3 REAÇÃO BIOLÓGICA DA CULTURA DE FIBROBLASTOS SOB APLICAÇÃO DO OZÔNIO

Para o melhor entendimento, este item foi dividido de acordo com as relações dos dados do tempo experimental e da concentração utilizada do ozônio sobre os fibroblastos de gengiva humana (FMM1).

Importante ressaltar que os dados da atividade mitocondrial obtidos foram convertidos em porcentagens em relação à viabilidade do grupo controle, considerado 100%. Os valores médios estão expressos na tabela 5.19 e gráfico 5.12.

Tabela 5.19 – Média em percentual (%) de viabilidade celular de fibroblastos frente às concentrações de ozônio nos tempos experimentais testados

	0 Hora	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	100	100	100	100
Ozônio 10	98,18	103,2	105,48	105,77
Ozônio 20	77,32	104,29	105,28	107,49
Ozônio 40	68.61	112.94	115.66	121.25

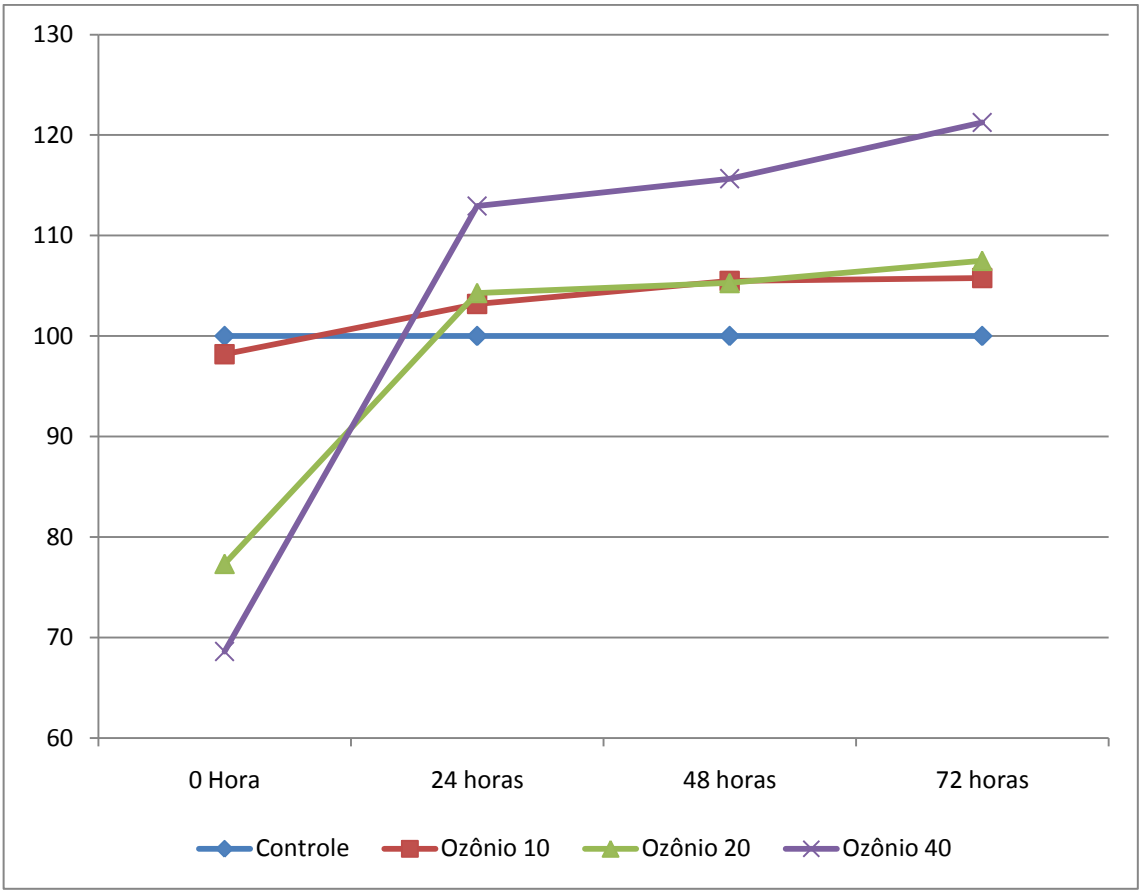


Gráfico 5.12 – Médias percentuais da viabilidade das células de fibroblastos em contato com o ozônio em diferentes concentrações em relação aos tempos experimentais

5.3.1 Relação da viabilidade da cultura de fibroblastos de gengiva quando exposto a cada uma das três diferentes concentrações de ozônio

O gráfico 5.13 ilustra a curva de crescimento celular proporcionada pela exposição do fibroblasto ao PBS ozonizado na concentração de 10 μg/mL. No contato imediato (0 horas) é possível ver uma viabilidade celular de 98,18% e nos tempos experimentais subseqüentes, um aumento da viabilidade em relação ao grupo controle. Pela distribuição não normal e não homogênea, foi aplicado o teste estatístico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com significância de 5%. Assim, os dados da viabilidade celular não apresentaram significância estatística em relação ao controle (Tabela 5.20).

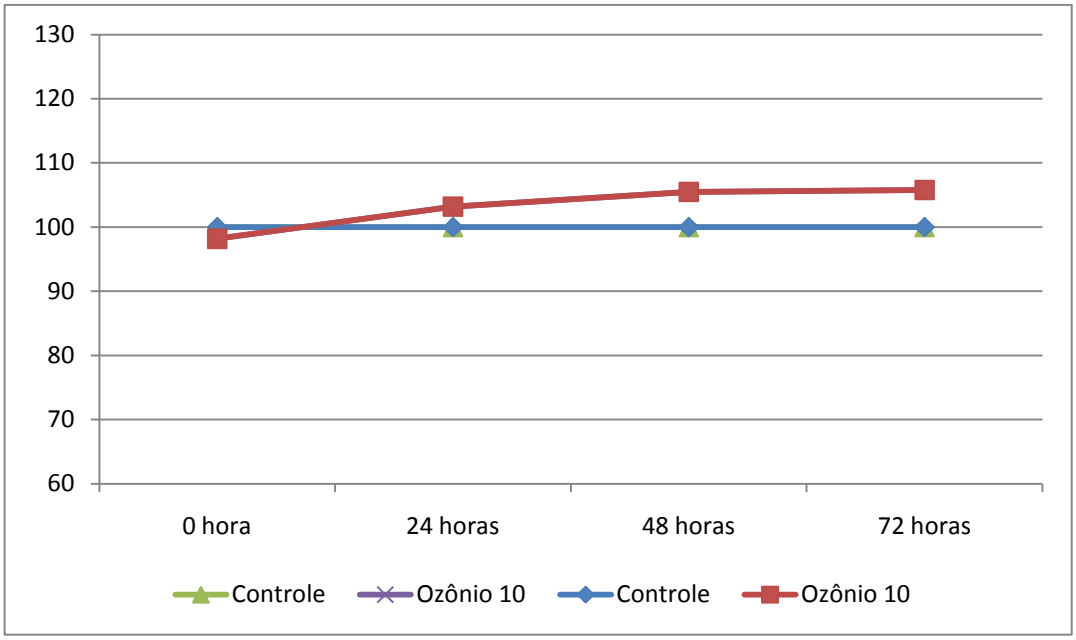


Gráfico 5.13 – Médias percentuais da viabilidade celular dos fibroblastos frente à exposição ao ozônio na concentração de 10 µg/mL, nos respectivos tempos experimentais

Tabela 5.20 - Média percentual e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos quando expostos ao ozônio na concentração de 10 µg/mL

Tempo Experimental	Médias Percentuais	Valor Crítico
0 horas	98,18[a]	0,6284
24 horas	103,20[a]	0,6284
48 horas	105,48[a]	0,6284
72 horas	105,77[a]	0,6284

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

Na concentração de 20 µg/mL, o gráfico 5.14 revela uma curva de crescimento semelhante à anterior com uma viabilidade celular de 77,32% em relação ao Controle em 0 horas, com diferença estatística significante para os demais tempos experimentais ($p<0,05$). A partir de 24 horas, é possível visualizar um aumento no número de células viáveis em relação ao controle, entretanto, sem diferença estatística entre os tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas (Tabela 5.21).

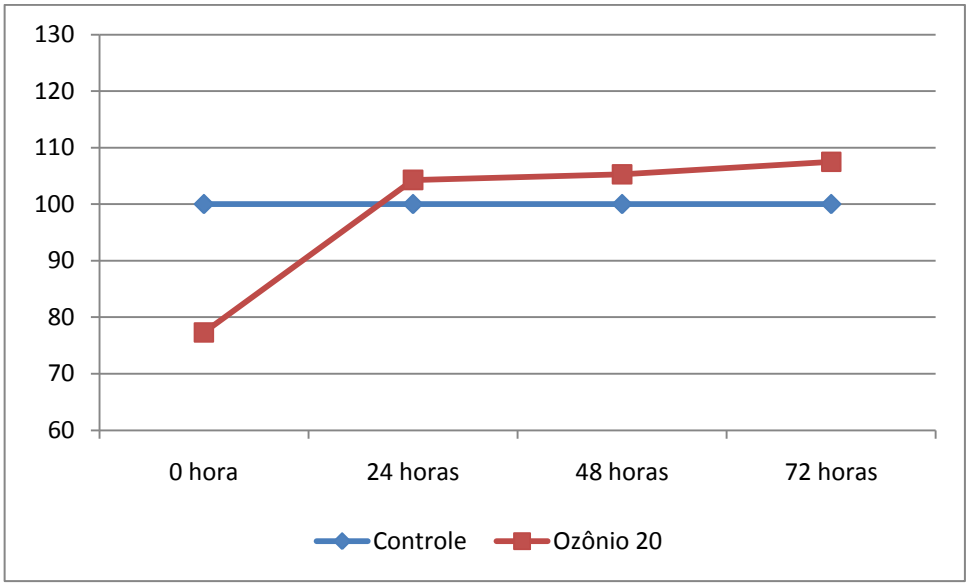


Gráfico 5.14 – Médias percentuais da viabilidade celular dos fibroblastos frente à exposição do ozônio na concentração de 20 μg/mL, nos respectivos tempos experimentais

Tabela 5.21 - Média dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos quando expostos ao ozônio na concentração de 20 μg/mL, diante do teste estatístico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn

Tempo Experimental	Média dos Postos	Valor Crítico
0 horas	14,15[a]	2,635
24 horas	37,625[b]	2,635
48 horas	36,8125[b]	2,635
72 horas	40,8125[b]	2,635

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

A curva de crescimento promovida pelo ozônio na concentração de 40 μg/mL é ilustrada pelo gráfico 5.15 e tabela 5.22 que ilustram uma viabilidade celular de 68,61% em relação ao Grupo Controle, em 0 horas. Os tempos experimentais subsequentes apresentaram um aumento no número de células viáveis em relação ao controle, com diferença estatística significante como aponta o teste estatístico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com significância de 5%.

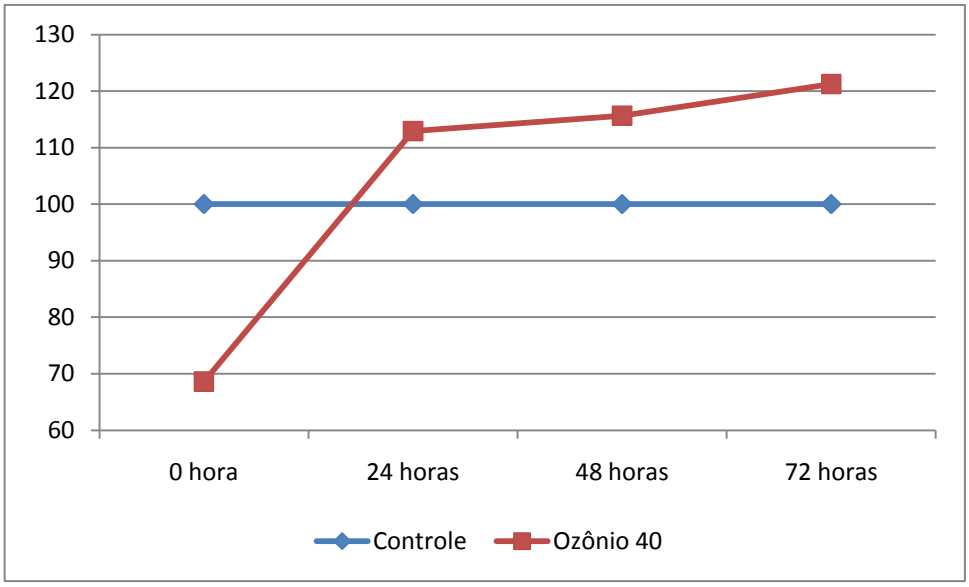


Gráfico 5.15 - Média percentual da viabilidade celular dos fibroblastos frente à exposição do ozônio na concentração de 40 /mL, nos respectivos tempos experimentais

Tabela 5.22 - Média dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos quando expostos ao ozônio na concentração de 40 μg/mL

Tempo Experimental	Média dos Postos	Valor Crítico
0 horas	10,75[a]	2,635
24 horas	38,2188[b]	2,635
48 horas	39,9375[b]	2,635
72 horas	41,0938[b]	2,635

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

5.3.2 Relação entre as concentrações de ozônio em cada tempo experimental na viabilidade celular

No gráfico 5.16 é possível visualizar que em 0 horas todas as concentrações de ozônio promoveram uma redução na viabilidade celular em relação ao controle. A análise estatística revelou que a concentração de 10 μg/mL não apresentou diferença significante em relação ao controle. As concentrações de 20 e 40 μg/mL

não apresentaram diferença significante entre si, mas foram estatisticamente diferentes ao Grupo Controle e à concentração 10 μg/mL (Tabela 5.23).

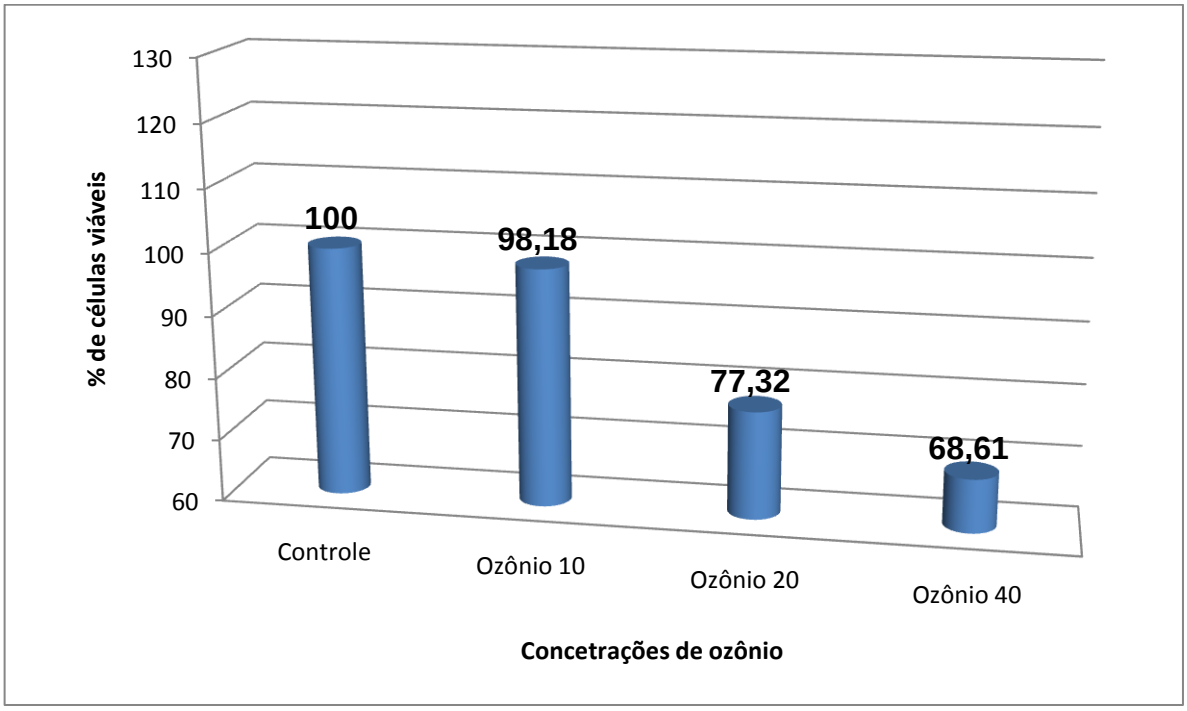


Gráfico 5.16 – Médias percentuais da viabilidade dos fibroblastos de gengiva em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 0 horas

Tabela 5.23 - Médias dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 0 horas

Grupo	Média dos Postos	Valor Crítico
Controle	47,5[a]	2,635
Ozônio 10 (II)	44,25[a]	2,635
Ozônio 20 (III)	20,75[b]	2,635
Ozônio 40 (IV)	17,5[b]	2,635

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

O gráfico 5.17 ilustra a viabilidade celular dos fibroblastos expostos ao ozônio no tempo experimental de 24 horas. Diante do teste estatístico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com nível de significância de 5%, é possível analisar que a partir deste momento inicia-se um estímulo às células, em que todas as concentrações promoveram um aumento no número de células viáveis, entretanto sem diferença estatística significante em relação ao controle (Tabela 5.24).

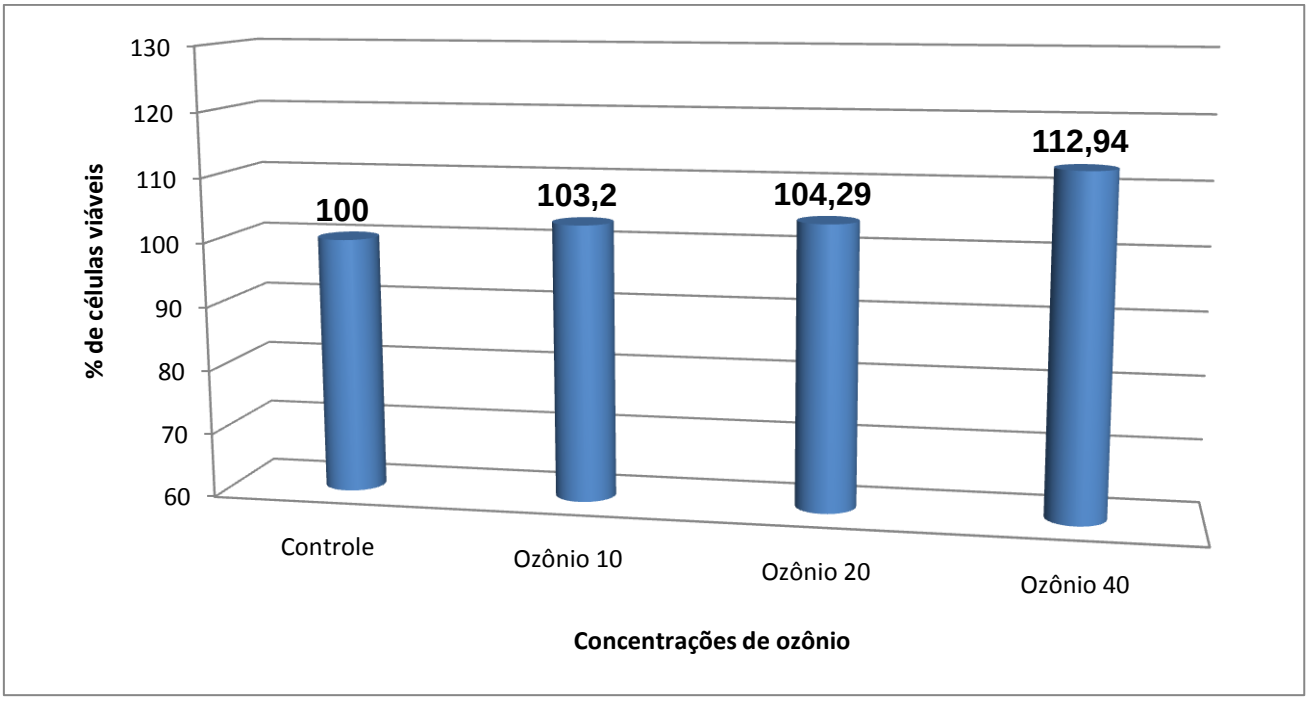


Gráfico 5.17 – Viabilidade celular dos fibroblastos em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 24 horas

Tabela 5.24 – Média percentual e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 24 horas

Grupo	Média Percentual	Valor Crítico
Controle	100,00[a]	0,0584
Ozônio 10 (II)	103,20[a]	0,0584
Ozônio 20 (III)	104,29[a]	0,0584
Ozônio 40 (IV)	112,94[a]	0,0584

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

No gráfico 5.18 é possível observar que o aumento de células viáveis ainda ocorre em todas as concentrações do ozônio, no tempo experimental de 48 horas. De acordo com o teste Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn, com significância de 5%, a concentração de 40 μg/mL promoveu maior estímulo às células em comparação às outras concentrações, entretanto sem diferença estatística significante (Tabela 5.25).

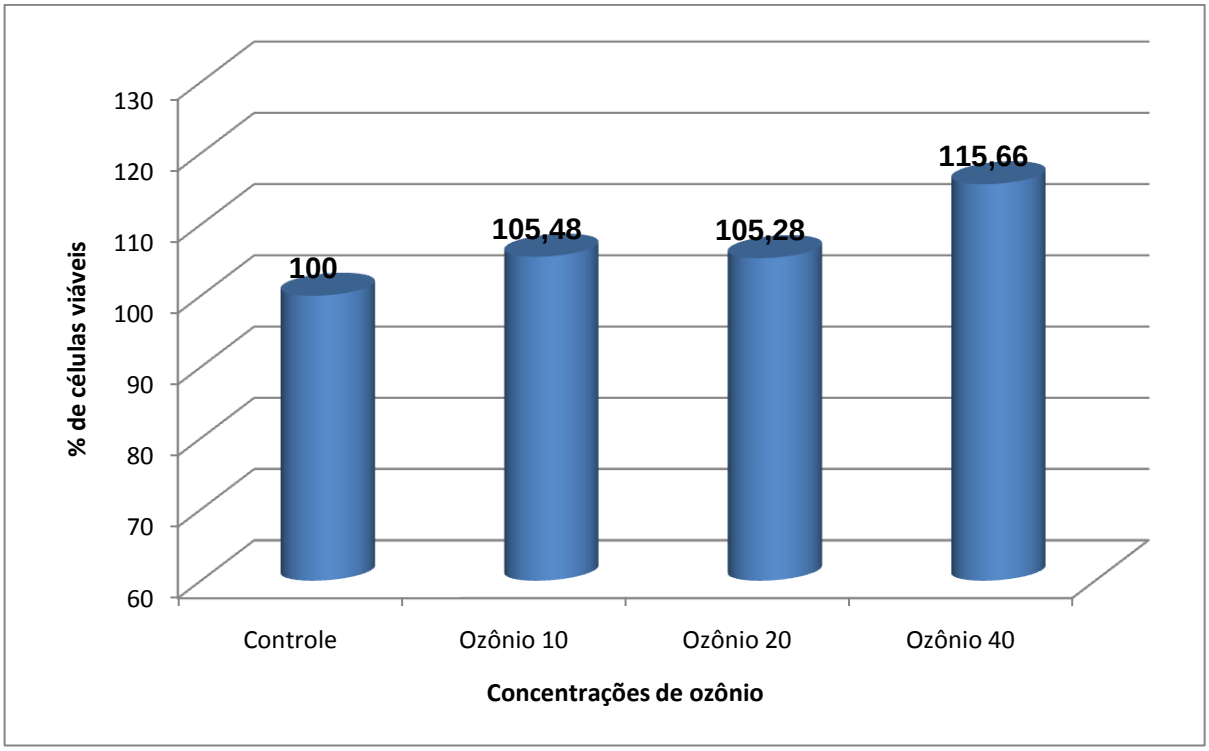


Gráfico 5.18 - Viabilidade celular dos fibroblastos em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 48 horas

Tabela 5.25 – Média percentual e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 48 horas

Grupo	Média Percentual	Valor Crítico
Controle	100,00[a]	0,1383
Ozônio 10 (II)	105,48[a]	0,1383
Ozônio 20 (III)	105,28[a]	0,1383
Ozônio 40 (IV)	115,66[a]	0,1383

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

O gráfico 5.19 apresenta o aumento no número de células viáveis em 72 horas de exposição dos fibroblastos ao PBS ozonizado. É possível visualizar que a concentração de 40 μg/mL promoveu o maior estímulo às células, com diferença estatística significante em relação ao grupo controle, porém não significante em comparação às outras concentrações testadas, como demonstrado pelo teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn, com significância de 5% (Tabela 5.26).

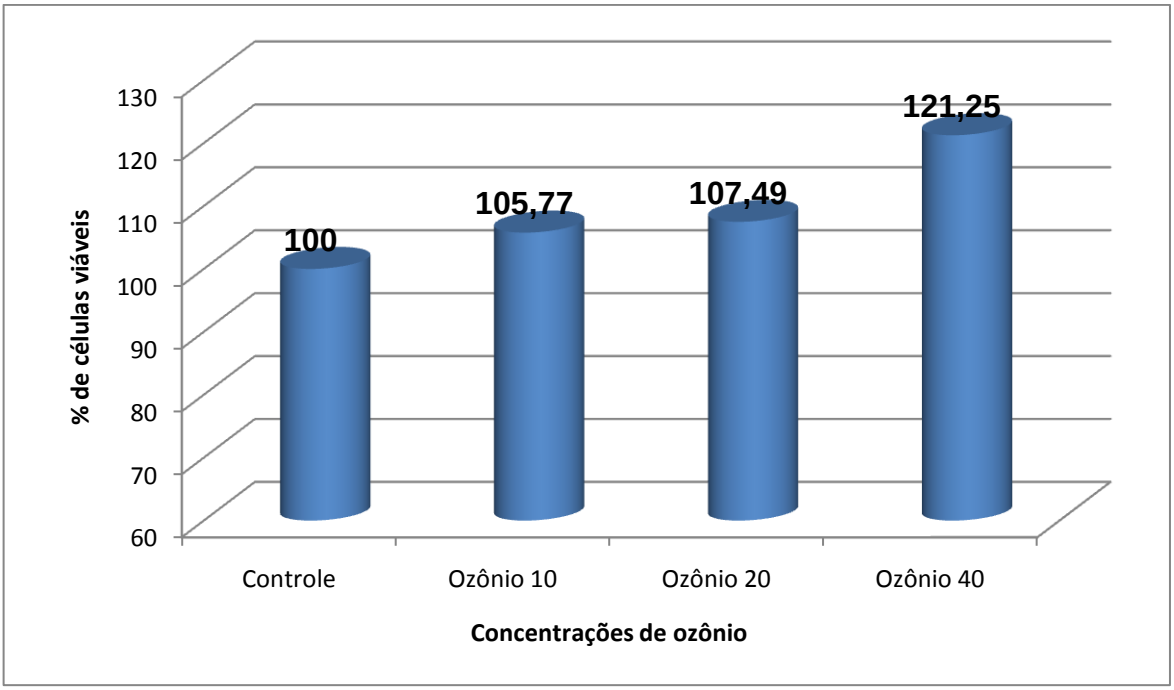


Gráfico 5.19 - Viabilidade celular dos fibroblastos em contato com o PBS ozonizado em diferentes concentrações, no tempo experimental de 72 horas

Tabela 5.26 - Média dos postos e valor crítico da viabilidade celular dos fibroblastos em 72 horas

Grupo	Média dos Postos	Valor Crítico
Controle	21,5[a]	2,635
Ozônio 10 (II)	31,1875[a,c]	2,635
Ozônio 20 (III)	33,75[a,c]	2,635
Ozônio 40 (IV)	43,5625[b,c]	2,635

Letras semelhantes = sem diferença estatística; letras diferentes = diferença estatística significante

Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 DA PROPOSTA

A seleção de qualquer substância química para a utilização no tratamento endodôntico deve ser baseada em estudos que comprovem sua ação antimicrobiana assim como sua biocompatibilidade. Dessa forma, deve atuar sobre os microrganismos de tal maneira a promover a desinfecção e o condicionamento do sistema de canais radiculares e paralelamente, não agredir os tecidos periapicais, favorecendo a reparação. Assim, novas estratégias terapêuticas para o tratamento da periodontite apical devem considerar não apenas os efeitos antimicrobianos das substâncias químicas, mas também a permeabilidade dentinária e a influência na resposta imune do hospedeiro.

Em casos de necrose pulpar, a abordagem clínica deve ser diferente quando comparada com casos de inflamação. As substâncias químicas e a medicação intracanal exercem papel importante na obtenção do sucesso terapêutico. Para tal, o conhecimento do tipo de infecção instalada guia o profissional para o correto planejamento.

Estudos mostram que o tipo de infecção endodôntica varia de acordo com a condição clínica do dente, levando em consideração a ausência de tratamento prévio, tratamento realizado de maneira inadequada e/ou a persistência da infecção, em casos do tratamento anterior bem qualificado. Tais fatores clínicos modulam a microbiota existente que basicamente é formada por anaeróbios estritos Gram-Negativos, anaeróbios facultativos, *E faecalis, S. aureus* e *P. aeruginosa,* entre outros (Siqueira Jr, 2002; Sassone et al., 2007).

Estudos apontam a resistência destes microrganismos aos procedimentos de limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, como evidenciado por Siqueira Jr et al. (2002), Sassone et al. (2007) e Huth et al. (2007, 2009), exigindo muitas vezes a inserção de métodos alternativos ao tratamento endodôntico com a finalidade de potencializar a fase de sanificação. Assim, a seleção dos microrganismos para este estudo centrou-se na predominância do *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus*.

O ozônio utilizado com finalidade terapêutica, atua como uma terapia bio-oxidativa, ou seja, através de seu alto poder oxidante apresenta potente ação antimicrobiana, como demonstrada pelos estudos de Velano et al. (2001), Nagayoshi et al. (2004), Hems et al. (2005), Estrela et al. (2006, 2007), Cardoso et al. (2008), Lynch (2008), Stoll et al. (2008), Huth et al. (2009) e Kustarci et al. (2009) e, paralelamente, com uma ação biológica estimuladora, como relatam os estudos de Nagayoshi et al. (2004) e Huth et al. (2006, 2007).

A produção científica relacionada ao ozônio apresentou um aumento significativo na última década. Levando em consideração que os primeiros relatos na Odontologia da utilização da água ozonizada se dão em 1950, com Edward Fisch, como relatam Bocci (2005) e Nogales et al. (2008), esse período de tempo a literatura se fez escassa devido à má prática ou pelo emprego do ozônio de forma empírica.

Os trabalhos que propõe o ozônio como uma alternativa terapêutica no tratamento endodôntico não chegam a uma conclusão com relação ao protocolo a ser empregado, seja ele em pesquisas ou na rotina clínica. Inúmeras concentrações são propostas, seguidas por variadas formas de produção do gás ozônio e principalmente da água ozonizada. Essa falta de padrão esbarra na problemática da reatividade do gás, tanto *in natura*, como na forma aquosa e, principalmente, na formação de subprodutos. Critérios bem definidos devem ser seguidos para garantir a qualidade e confiabilidade do ozônio produzido.

Segundo Bocci (2005), Viebahn-Hansler (2007) e Nogales et al. (2008) há necessidade da utilização do oxigênio medicinal pelos geradores de ozônio. Levando-se em consideração que o ar ambiente é formado em sua maioria por Nitrogênio, os equipamentos que utilizam o ar ambiente como fonte para a produção de ozônio, incorrem em risco de produção de compostos nitrogenados, fato que impossibilita a produção da água ozonizada.

O presente estudo seguiu criteriosamente os padrões metodológicos propostos por Bocci (2005) e Viebahn-Hansler (2007) com relação à produção do gás ozônio e da água ozonizada, como também é possível verificar nos estudos de Estrela et al. (2007) e Huth et al. (2009). A utilização da água bidestilada para a produção da água ozonizada confere à solução uma segurança para a utilização,

pois inibe a formação de compostos tóxicos ou subprodutos provenientes da reação do ozônio com íons presentes na água. O objetivo de se utilizar a água resfriada vai ao encontro das propriedades de instabilidade do gás, ou seja, quanto menor a temperatura, mais estável se encontra o ozônio, assim, permanecendo ativo por mais tempo.

A sequência experimental adotada por este trabalho, iniciando pela análise da ação antimicrobiana do ozônio e posteriormente a ação sobre os fibroblastos de gengiva buscou determinar a concentração ideal e efetiva sobre os microrganismos que não atue como agente agressor às células, abrindo a opção de futuros estudos clínicos.

6.2 DA METODOLOGIA EMPREGADA

6.2.1 Para os ensaios microbiológicos

Os procedimentos de padronização dos microrganismos foram baseados no estudo de Kairalla (2006).

A década de 70 foi marcante para a Endodontia pelo avanço nas técnicas de isolamento e cultivo dos microrganismos. Isso permitiu o conhecimento das infecções que acometem o sistema de canais radiculares e assim foi possível desenvolver técnicas de abordagem mais específicas de acordo com a patologia. Experimentalmente, o método de difusão em ágar foi muito empregado, como nos estudos de Siqueira Jr. et al., 1998, 2000; Pereira et al., 2005 e Herrera et al., 2010. Diante da limitação técnica, a metodologia avançou para a diluição em meio de cultura e contagem das UFC/mL, uma grande variedade de estudos utilizaram esta técnica, (Siqueira Jr et al., 2000; Gomes et al., 2001; Siqueira Jr 2002; Zehnder et al.,2002; Estrela et al., 2003, 2006, 2007; Menezes et al., 2004; Nagayoshi et al., 2004; Vianna et al., 2004; Hems et al., 2005; Pereira et al., 2005; Sirtes et al., 2005; Berber et al., 2006; Sena et al., 2006; Ferraz et al., 2007; Sassone et al, 2007; Cardoso et al., 2008; Britto et al., 2009; Huth et al., 2009; Kustarci et al., 2009; Tirali

et al., 2009; Retamozo et al., 2010; Herrera et al., 2010). Com base nesses estudos, o presente trabalho selecionou esta técnica que cumpre os requisitos de reprodutibilidade, facilidade de execução e com resultados fiéis. Vianna e Gomes (2009) utilizaram os dois métodos para avaliação, a difusão em agar e a diluição em meio. A evolução dos procedimentos microbiológicos levou ao desenvolvimento de técnicas de isolamento como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que faz a detecção de DNA do microrganismo e dessa maneira proporciona um resultado fiel com relação à presença ou não do microrganismo. Esta técnica já é aplicada, porém com um custo elevado.

Os estudos *in vitro* e/ou *ex vivo* microbiológicos na área da Endodontia tem como padrão de concentração bacteriana o valor logarítmico de 10^8, por ser a concentração geralmente encontrada nos canais radiculares infectados (Siqueira Jr et al., 2000; Gomes et al, 2001; Siqueira Jr, 2002; Zehnder et al., 2002; Estrela et al., 2003; Menezes et al., 2004; Nagayoshi et al., 2004; Vianna et al., 2004; Hems et al., 2005; Pereira et al., 2005; Sirtes et al., 2005; Berber et al., 2006; Estrela et al., 2006; Sena et al., 2006; Estrela et al., 2007; Ferraz et al., 2007; Sassone et al, 2007; Cardoso et al., 2008; Britto et al., 2009; Huth et al., 2009; Kustarci et al., 2009; Vianna et al., 2009; Tirali et al., 2009; Herrera et al., 2010 e Retamozo et al., 2010). A proposta dos estudos laboratoriais é simular o que seria a realidade clínica, tal fato se aplica também ao presente trabalho, que padronizou o crescimento bacteriano em 10^8 e inoculou separadamente nos dentes extraídos, caracterizando o biofilme mono espécie.

O meio de cultura utilizado para a incubação dos microrganismos varia de acordo com a cepa cultivada. Com o intuito de criar um padrão de cultivo bacteriano o presente estudo utilizou o meio líquido TSB (Tryptone Soya Broth) e o meio sólido TSA (Tryptone Soya Agar), que é um meio bem aceito pelos os microrganismos testados e utilizados em inúmeros trabalhos (Velano et al., 2001; Zehnder et al., 2002; Menezes et al., 2004; Sirtes et al., 2005; Cardoso et al., 2008; Stoll et al., 2008; Britto et al., 2009). Já os estudos de Siqueira Jr et al. (1998), Siqueira Jr et al. (2000), Gomes et al. (2001), Estrela et al. (2003), Nagayoshi et al. (2004), Pereira et al. (2005), Berber et al. (2006), Estrela et al. (2006); Sena et al. (2006), Estrela et al. (2007), Ferraz et al. (2007), Huth et al. (2009), Kustarci et al. (2009); Tirali et al. (2009), Vianna; Gomes (2009), Herrera et al. (2010), Retamozo et al. (2010) e Rossi-Fedele et al. (2010) utilizaram o meio BHI (*Brain Heart Infusion*). Sendo que os três

meios de cultura, BHI, TSA e TSB se equivalem e não interferem ou comprometem a fidelidade dos resultados obtidos nos experimentos.

A literatura apresenta duas formas de se realizar a quantificação e padronização da concentração dos microrganismos. Pelo método visual, a partir do turvamento do meio de cultura, compara-se com a escala de MacFarland, que possui padrões numericamente definidos correspondente à concentração conseguida. Trabalhos como de Estrela et al. (2006), Estrela et al. (2007), Ferraz et al. (2007), Huth et al. (2009), Kustarci et al. (2009), Tirali et al. (2009), Rossi-Fedele et al. (2010) utilizaram-se desse método para a manipulação bacteriana, variando entre o grau 0,5 e 1 que corresponde aos valores de $1,5X10^8$ UFC/mL e $3X10^8$ UFC/mL, respectivamente. O segundo método para a padronização da concentração bacteriana corresponde ao espectrofotométrico, que é um método mais fiel graças a ausência de subjetividade da análise visual, diante disso, foi utilizado por este estudo e por Gomes et al. (2001), Zehnder et al. (2002), Menezes et al. (2004), Vianna et al. (2004), Sirtes et al. (2005), Berber et al. (2006), Sena et al. (2006), Cardoso et al. (2008), Vianna et al. (2009), e Herrera et al. (2010).

Nos estudos ex vivo, a inoculação dos microrganismos nos dentes extraídos apresenta variedade de tempo de incubação em estufa. O objetivo desse período é permitir que o microrganismo penetre na dentina radicular, simulando a situação clínica de infecção. Segundo Siqueira Jr. (2002) e Sassone et al. (2007) os microrganismos presentes na infecção endodôntica não se encontram exclusivamente na luz do canal mas também no interior dos túbulos dentinários. Neste estudo os microrganismos foram incubados em estufa a 37°C por sete dias, com renovação do meio de cultura a cada 48 horas. O objetivo de tal procedimento foi evitar o ressecamento do meio de cultura no interior do canal radicular e, assim, prevenir a morte bacteriana. Essa metodologia está de acordo com Gomes et al. (2001), Menezes et al. (2004), Vianna et al. (2004), Britto et al. (2009) e Tirali et al. (2009). Já Siqueira Jr. et al. (2000) e Retamozo et al. (2010) cultivaram os microrganismos testados por apenas 24 e 72 horas, respectivamente. Zehnder et al. (2002) fizeram a incubação do E. faecalis por 3 dias; Berber et al. (2006) e Cardoso et al. (2008) trabalharam com o tempo de 21 dias de incubação em estufa e finalmente Estrela et al. (2007) trabalharam com o tempo de 60 dias.

A metodologia para avaliação do ozônio também é um ponto bastante controverso. A diferença nos equipamentos, maneira de produção do gás e da água

e formas de aplicação são tópicos que merecem atenção. Este estudo trabalhou dentro dos critérios citados por Bocci (2005) e Viebahn-Hansler (2007). A utilização de um gerador de ozônio médico (Philozon, Santa Catarina, Brasil) dá a possibilidade do controle da concentração do gás produzida de maneira micrométrica, ao passo que os equipamentos que utilizam o ar ambiente como fonte de alimentação trabalham com uma concentração constante com variação no tempo de aplicação, como demonstrado por Stoll et al. (2008), Lynch (2008) e Kustarci *et al.* (2009).

A estabilidade e fidelidade da concentração conseguida na água ozonizada estão intimamente relacionadas com fatores como pureza do meio e temperatura. Como preconizado por Bocci (2005) e Viebahn-Hansler (2007) a utilização da água bidestilada, em baixa temperatura confere ao ozônio a estabilidade necessária para a utilização clínica. Seguindo esses critérios, o processo ozonização da água encontra a saturação em um período de 5 minutos, como utilizado por este estudo.

Os estudos microbiológicos que avaliaram a ação do ozônio apontam para diversos tempos de contato com o microrganismo. Este estudo adotou 1 minuto de tempo de contato do ozônio com o *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os estudos de Kairalla (2006) e Huth et al. (2009) corroboram este período. Já Velano et al. (2001) e Estrela et al. (2006, 2007) deixaram a água ozonizada em contato com *o* microrganismo por até 20 minutos. Trabalhos que utilizaram o aparelho HealOzone, como de Stoll *et al.* (2008) e Kurstaci et al. (2009) utilizaram o tempo de 120 segundos de exposição do microrganismo ao ozônio. Já Hems et al. (2005), trabalharam com o tempo de 240 segundos de exposição.

Este estudo buscou trabalhar com os mais rígidos critérios de produção do gás ozônio e água ozonizada, visando minimizar o máximo possível as variáveis que cercam essa terapia.

6.2.2 Para o preparo químico cirúrgico

O preparo da entrada dos canais com as brocas Gates-Glidden seguida pela instrumentação até a lima tipo K número 25, previamente à contaminação dos

dentes, teve como objetivo padronizar o volume dos canais radiculares das amostras, como de acordo com Cardoso et al. (2008). Após a contaminação com os microrganismos testados, a fase de preparo relacionada com os grupos experimentais foi utilizada a instrumentação rotatória, com a finalidade de simular uma situação clínica.

Siqueira Jr et al. (2002) e Sassone et al. (2007) alertavam que os microrganismos presentes na infecção endodôntica estão presentes nos túbulos dentinários e não apenas na luz do canal. O presente estudo buscou valorizar a permeabilidade dentinária com o emprego de substâncias químicas e associações que permitem que o irrigante com poder antimicrobiano tenha sua ação potencializada, justificado pela facilitação de penetração nos túbulos dentinários.

Este estudo utilizou-se da associação da solução de hipoclorito de sódio 1% com o Endo-PTC gel com base no exposto por Ferreira et al. (2005) e confirmado por Kairalla (2006) e Monteiro et al. (2008). O Endo-PTC gel apresenta uma ação importante no condicionamento da dentina intracanal, atuando também como lubrificante, diminuindo o atrito do instrumento endodôntico.

6.2.3 Para os ensaios em cultura de célula

A metodologia aplicada para a avaliação da viabilidade de fibroblastos de gengiva está de acordo com o estudo de Ferreira et al. (2010).

Os resultados dos testes *in vitro* de citotoxicidade devem ser interpretados com cautela, haja vista que seu objetivo é demonstrar o grau de toxicidade de uma substância e não a reação tecidual provocada, sempre em relação ao grupo controle. Um material que apresenta resultados insatisfatórios nessa modalidade de teste pode ou não ser descartado. Caso os princípios para a limitação sejam seguidos, esse material pode vir a ter aplicabilidade clínica.

A opção pela utilização dos fibroblastos de gengiva humana recai sobre a facilidade de manipulação das células, potencial metabólico muito semelhante às células encontradas no tecido periapical e a possibilidade de trabalhar com elevadas

concentrações celulares. Nagayoshi et al. (2004) também avaliaram a citotoxicidade do ozônio entretanto em fibroblastos de rato L-929.

De acordo com o proposto por Ferreira et al. (2010), a renovação do meio de cultura celular foi feito a cada 48 horas, pois a falta de nutrientes é um fator que pode influir diretamente na viabilidade das células.

A utilização da metodologia de análise de viabilidade pelo método MTT vai ao encontro do apresentado por Nagayoshi et al. (2004) e Ferreira et al. (2010) que tem como foco analisar a atividade mitocondrial das células. Segundo Bocci (2005) e Nogales e Lage-Marques (2010) o mecanismo de ação do ozônio desencadeia uma cascata de reações bioquímicas e em nível celular se dá nas mitocôndrias. O estresse oxidativo causado pela liberação de agentes oxidantes, estimula a mitocôndria a aumentar a síntese de superóxido dismutase, agente anti-oxidante, que tem por função quebrar as ligações das espécies reativas de oxigênio, dessa forma, estimular os sistemas anti oxidantes.

A metodologia MTT empregada neste experimento é um método fácil de ser realizado, reprodutível e conta com a vantagem de não ser subjetivo, em comparação com o método de contagem celular de exclusão pelo azul de Trypan, como realizado por Huth et al. (2006). O corante MTT é incorporado pelas células em sítios enzimáticos mitocondriais, quando então, são metabolizados e passam a ter a forma de cristais de formazina. Esses cristais são solubilizados e assim permitem o cálculo por absorbância no leitor de ELISA com comprimento de onda 560 nm, sendo o índice de absorbância diretamente proporcional à concentração celular.

O contato direto da droga com as células, por vezes, pode se tornar agressivo e não reproduzir a realidade com relação à ação da substância em teste. Para evitar tais distorções, é necessário induzir o meio de cultura para que o contato da droga com as células se faça de maneira indireta. Para tal, como realizado neste estudo e por Huth et al. (2006), trabalhou-se com o PBS ozonizado. Ao contrário de Nagayoshi et al. (2004) que utilizou água destilada como controle.

6.3 DOS RESULTADOS

Como constatado por este estudo e evidenciado por Bocci (2005) e Viebahn-Hansler (2007) o meio líquido não é capaz de reter todo o ozônio ofertado, sendo assim, a concentração conseguida na água ozonizada será inferior ao ajustado no gerador. Tal fato foi ponto marcante neste estudo, onde as concentrações de 5, 20 e 40 μg/mL, obtiveram 2, 5 e 8 ppm de concentração final, respectivamente.

6.3.1 Do estudo microbiológico X estudo em células

A substância química ideal para a utilização na prática da Endodontia deve aliar ação antimicrobiana com a biocompatibilidade, ou seja, ser efetiva contra os microrganismos e não agredir os tecidos periapicais, pelo contrário, estimular a reparação.

A interação dos resultados conseguidos pela análise microbiana com a parte biológica deste estudo é fundamental para que se possa ter uma visão global do ozônio, como um elemento coadjuvante à terapia endodôntica que cumpre os quesitos de uma substância ideal.

Dessa interação obteve-se como resultado que o protocolo instituído para a fase de preparo químico cirúrgico onde se associou a água ozonizada, na concentração de 40 µg/mL, foi mais efetivo que os demais protocolos aplicados. Paralelamente, esta mesma concentração, na análise biológica, foi a que apresentou menor número de células viáveis em 0 horas e maior estímulo em 72 horas, final do tempo experimental, em relação às outras concentrações testadas.

Os estudos que fazem esse tipo de associação são escassos. Apenas Nagayoshi et al. (2004) fizeram a análise microbiológica complementada pelo estudo biológico em fibroblastos de rato L-929, cujos resultados vão de encontro ao colocado por este estudo: o ozônio é um agente antimicrobiano potente que associado à água, apresenta um alto grau de biocompatibilidade.

Importante salientar que a concentração do ozônio tida como ideal foi inicialmente definida pela primeira parte deste estudo. A água ozonizada nas concentrações de 20 e 40 μg/mL, correspondentes aos Grupos II e III, respectivamente, não apresentaram contagem das UFC/mL, entretanto, a concentração de 20 μg/mL apresentou o turvamento de dois tubos com meio de cultura no teste de morte, indicando o crescimento bacteriano. Tal fato indica que a concentração de 40 μg/mL foi a única capaz de efetivamente eliminar os microrganismos testados, não sendo detectável a contagem das UFC/mL, tampouco a visualização dos meios de cultura turvos. Por conta disto, esta concentração foi selecionada para os demais testes.

6.4 IMPORTÂNCIA DO TRABALHO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os primeiros relatos do uso biológico do ozônio apontam para 1840, com Friedrich Schönbein, químico alemão. Desde essa data, muitos estudos foram realizados com o anseio de elucidar as dúvidas relacionadas com a ação, reação, efeito colateral, dose ideal, protocolos de aplicação e patologias a serem tratadas.

O ozônio passou por um período de total reprovação, onde acidentes e complicações relacionados com o mau emprego da terapêutica proporcionaram um lapso na produção científica. Tal fato resultou na proibição da prática da ozonioterapia no Brasil.

Das duas últimas décadas até os dias de hoje, a importância do ozônio voltou à tona com o aumento nos trabalhos científicos tanto na área médica como na Odontologia. Estudos investigaram a ação microbiológica da terapêutica nos mais diversos microrganismos, com resultados realmente satisfatórios. A análise biológica revelou uma filia importante do ozônio às células de mamíferos, atuando como modulador do sistema imune, estimulador do metabolismo celular pelo aumento na síntese de ATP, importante agente cicatrizador, entre outras propriedades.

Atualmente o ozônio é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada em países da Europa, América Central, Estados Unidos, e alguns países asiáticos. Tal a importância desta terapêutica que em Cuba encontra-se o *Centro de Investigaciones Del Ozono*, onde é oferecido à população tratamento para as mais diversas patologias, e para os profissionais da área da saúde do mundo inteiro, treinamento teórico e prático. Dessa forma, Cuba é uma referência mundial em termos de aplicação do ozônio, graças a Drª Silvia Menendez, introdutora do ozônio no país.

No campo da Odontologia a literatura é farta em trabalhos *in vitro* e *ex vivo*, entretanto, ao contrário da área médica, a falta de ensaios clínicos e padronização na metodologia de avaliação dificultam a implementação de protocolos de tratamento nas mais diversas especialidades.

Atualmente, a Endodontia adota o ozônio como um potencial agente para integrar a terapia. Confiar um tratamento endodôntico única e exclusivamente ao ozônio, não é indicado. Como apresentado por este estudo, a associação apresentou os melhores resultados. A solução de hipoclorito de sódio é soberana por fatores que compreendem a capacidade de dissolução tecidual que o ozônio não apresenta e amplo espectro de ação que são propriedades fundamentais no tratamento do sistema de canais radiculares.

Tal fato foi marcante neste trabalho, onde a inserção da água ozonizada ao protocolo tradicional foi superior ao tratamento convencional. A complementação pela análise biológica revelou uma substância biocompatível às células testadas.

A união e interação desses resultados são encorajadores para a continuidade do estudo, avançando para a avaliação clínica, com o objetivo maior de proporcionar saúde aos pacientes, por intermédio de um tratamento biológico, ou seja, que respeita a biologia e atua diretamente na cura da doença.

É fundamental a complementação deste estudo por ensaios clínicos para a determinação de protocolos de utilização do ozônio para o tratamento da periodontite apical.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com as metodologias aplicadas e de suas limitações, foi possível concluir que:

1. A concentração de 40 μg/mL foi a mais efetiva para reduzir o número do *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis;*

2. O protocolo instituído para a fase de preparo químico cirúrgico que associou a terapia tradicional com a água ozonizada na concentração de 40 μg/mL foi o mais efetivo na redução dos microrganismos testados;

3. O ozônio em contato com os fibroblastos de gengiva, inicialmente causaram uma diminuição na viabilidade celular, que foi revertida nos tempos experimentais subseqüentes. A concentração de 40 μg/mL foi a que causou maior redução no número de células viáveis, porém foi a que proporcionou maior estímulo ao final do experimento, mostrando-se biocompatível com a linhagem celular testada; e,

4. Diante do conjunto dos dados experimentais, a água ozonizada na concentração de 40 μg/mL, comparada com as demais concentrações testadas, é a que apresenta melhor desempenho quanto ao seu poder antimicrobiano e biocompatibilidade, justificando sua inserção no arsenal clínico na terapia de canais radiculares.

Referências

REFERÊNCIAS[1]

Amorim CVG, Lage-Marques JLS. Avaliação comparativa da permeabilidade dentinária após preparo do canal variando as substâncias químicas. Pesq Odontol Bras. 2001;15, suplemento:75-75.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing Enterococcus faecalis within root canals and dentinal tubules. Int Endod J. 2006;39(1):10-7.

Bocci V et al. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. J Trans Med. 2011;9(66):2-11.

Bocci V. Physical-chemical properties of ozone. Natural production of ozone. The toxicology of ozone. In:Ozone, a new medical drug. Itália: Springer; 2005. p. 5-8.

Britto PR, Souza LC, Machado de Oliveira JC, Alves FR, De-Deus G, Lopes HP, et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal Enterococcus faecalis populations: an in vitro study. J Endod. 2009;35(10):1422-7.

Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on Candida albicans, Enterococcus faecalis, and endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;105(3):e85-91.

Deboni MCZ. Antissepsia de alvéolos pós-exodontia empregando irrigações trans-operatórias de solução de ozônio diluído em água [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Estrela C, Estrela CR, Decurcio DeA, Silva JA, Bammann LL. Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against Staphylococcus aureus. Braz Dent J. 2006;17(2):134-8.

Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. Int Endod J. 2007;40(2):85-93.

[1] De acordo com estilo Vancouver

Estrela CRA, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pécora JD. Control of microorganisms *in vitro* by endodontic irrigants. Braz Dent J 2003;14(3):187-92.

Ferraz CCR, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J. 2007;18(4): 294-8.

Ferreira MB, Carvalho EMOF, Lage-Marques JL. Avaliação da permeabilidade dentinária dos canais radiculares utilizando gel e creme Endo-PTC como substâncias químicas auxiliares. Rev Pós Grad. 2005;12(1):32-7

Ferreira MB, Myiagi S, Nogales CG, Campos MS, Lage-Marques JL. Time- and concentration-dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. J Appl Oral Sci. 2010 Jun;18(3):259-63.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis.* Int Endod J. 2001;34:424-8.

Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of Enterococcus faecalis. Int Endod J. 2005;38(1):22-9.

Herrera DR, Tay LY, Rezende EC, Kozlowski VA, Santos EB. In vitro antimicrobial activity of phytotherapic Uncaria tomentosa against endodontic pathogens. J Oral Sci. 2010;52(3):473-6.

Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. Eur J Oral Sci. 2006;114(5):435-40.

Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. Int Endod J. 2009;42(1):3-13.

Kairala EC. Estudo da redução microbiana intracanal utilizando laser de baixa potencia associado à fotossensibilizador e laser de alta potencia [dissertação]. São Paulo; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2006.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20:340–9.

Kuştarci A, Sümer Z, Altunbaş D, Koşum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against Enterococcus faecalis compared with gaseous ozone: an ex vivo study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(5):e73-9.

León OS, Menéndez S, Merino N, Castilho R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. Med Inflam. 1998;7:289-94

Lynch E. Evidence-based efficacy of ozone for root canal irrigation. J Esthet Restor Dent. 2008;20(5):287-93.

Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int Endod J 2004;37:311-9.

Miller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. Dent. Cosmos. 1894;36:505-28.

Monteiro PG, Bombana A, Santos M, Zaragoza RA. Análise da limpeza dentinária em canais radiuclares preparados com um sistema rotatório e diferentes substâncias químicas. RGO. 2008;56(1):7-15.

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. J Endod. 2004;30(11):778-81.

Nogales CG. Ozonioterapia – aplicações médicas e odontológicas [monografia de especialização]. São Paulo: Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia da Faculdade de Odontologia; 2006.

Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. J Contemp Dent Pract. 2008;9(4):75-84.

Nogales CG, Lage-Marques JL. Ozonioterapia: grande potencial para o controle da infecção. In: Ferrari PH, Bombana AC. A infecção endodôntica e sua resolução. São Paulo: Editora Santos; 2010. p. 299-308.

Olszewer E. Radicais livres. In: Olszewer E. Clínica Ortomolecular. 2a ed. São Paulo: Editora Roca; 2008. p. 3-8.

Paiva JG, Antoniazzi JH. O uso de uma associação de peróxido de uréia e detergente (Tween 80) no preparo químico-mecânico dos canais radiculares. Ver Assoc Paul Cir Dent. 1973;27(3):416-22.

Pereira JV, Bergamo DCB, Pereira JO, França SC, Pietro RCLR, Silva-Sousa YTC. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. Braz Dent J. 2005:16(3):192-6.

Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate Enterococcus faecalis. J Endod. 2010;36(3):520-3

Rossi-Fedele G, Figueiredo JA, Steier L, Canullo L, Steier G, Roberts AP. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against Enterococcus faecalis in a bovine root canal model. J Appl Oral Sci. 2010;18(5):498-502.

Rubin MB. The history of ozone – the Schöbein period, 1839 – 1868. Bull Hist Chem. 2001;26(1):40-56.

Sassone L, Fidel R, Figueiredo L, Fidel S, Faveri M, Feres M. Evaluation of the microbiota of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(6):390-7.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. Int Endod J. 2006;39(11):878-85.

Siqueira JF, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod. 1998;24(6):414-6.

Siqueira Jr JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002;94:281-93.

Siqueira Jr JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. 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. 2000;26(6):331-4.

Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. J Endod. 2005;31(9):669-71.

Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study. Quintessence Int. 2008;39(3):231-6.

Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108(5):e117-20.

Velano HE, Nascimento LC, Barros LM, Panzeri H. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. Pesqui Odontol Bras. 2001;15(1):18-22.

Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against Enterococcus faecalis in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(4):585-9.

Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;97:79-84.

Viebahn-Hansler R. El uso del ozono en Medicina. 5a ed. Alemanha: Odrei; 2007.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltino T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;94:756-62.

Anexo

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 154/06

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"Ação da Ozonoterapia na Clínica Endodôntica"**, de responsabilidade do Pesquisador Professor Doutor **José Luiz Lage-Marques**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de novembro de 2006

Prof.Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-000
São Paulo – SP - Diretoria Telefax (011)3091-0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7825