



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS OZONIZADOS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS – UM ESTUDO *ex-vivo*.

MARCIO RICARDO SILVA PEREIRA

Salvador

2023

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS
OZONIZADOS EM CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS – UM ESTUDO *ex-
vivo*.**

MARCIO RICARDO SILVA PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como crédito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Antônio Veloso Cerqueira

Linha de Pesquisa: Número 02 - Avaliação de Fármacos, Biomarcadores, Produtos Naturais e Sintéticos.

Salvador

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Biblioteca Professor **Edivaldo Machado Boaventura** - UNEB – Campus I
Bibliotecária: Célia Maria da Costa – CRB5/918

P436a Pereira, Marcio Ricardo Silva
Avaliação da atividade antimicrobiana de produtos ozonizados em canais radiculares contaminados – Um estudo ex-vivo / Marcio Ricardo Silva Pereira. – Salvador, 2023.
96 f.: il.

Coorientador: Bruno Antônio Veloso.
Dissertação (Mestrado Acadêmico) – Universidade do Estado da Bahia.
Departamento Ciências da Vida. Campus I. Programa de Pós-Graduação Stricto Senso em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, 2023.

Contém referências.

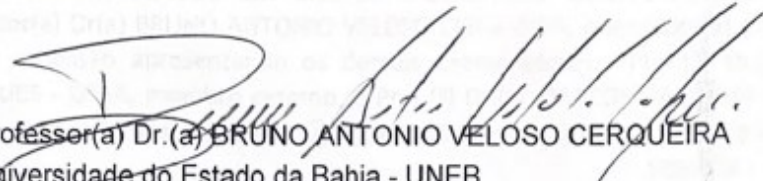
1. Endodontia. 2. Canal radicular - Tratamento. 3. Irrigantes do Canal Radicular. 4. Endodontia – Azeite de oliva – Uso terapêutico. 5. Endodontia – Óleo de girassol – Uso terapêutico. 6. Endodontia – Ozônio – Uso terapêutico Veloso, Bruno Antônio. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.

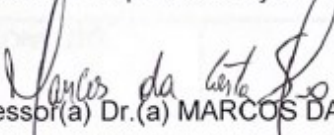
CDD: 617.6342

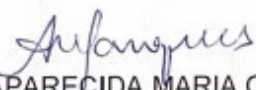
FOLHA DE APROVAÇÃO
"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS OZONIZADOS EM
CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS – UM ESTUDO EX-VIVO"

MARCIO RICARDO SILVA PEREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 27 de julho de 2023, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:


Professor(a) Dr.(a) BRUNO ANTONIO VELOSO CERQUEIRA
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Patologia Humana
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ BA


Professor(a) Dr.(a) MARCOS DA COSTA SILVA
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Imunologia
Universidade Federal da Bahia - UFBA


Professor(a) Dr.(a) APARECIDA MARIA CORDEIRO MARQUES
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Doutorado de Laser Em Odontologia
Universidade Federal da Bahia - UFBA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

À Inteligência Divina,

A meus pais Aylton e Meyre,

À Ângelo,

À família PPGFARMA/UNEB.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Bruno Antônio Veloso Cerqueira pela orientação, paciência e por me proporcionar conhecimento e crescimento em pesquisa e em docência.

Ao Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior pelo incentivo ao mestrado, pela ajuda em momentos desesperadores e pelas conversas francas e diretas.

Ao amigo e incentivador Ms. Rodrigo Tavares Bonfim, por me apresentar ao mundo da ozonioterapia e pelas muitas ideias.

Ao meu querido amigo Ms. Luiz Eduardo Lacerda de Oliveira, por me orientar em tantas situações possivelmente impossíveis de serem resolvidas.

À Prof^a. Dr^a. Daylis Quinto Pereira, ao Prof. Dr. Alex Correia Vieira e ao Banco de Dentes Humanos (BDH) da Universidade Estadual de Feira de Santana, pela colaboração na realização da pesquisa.

Às minhas fiéis escudeiras Nildes e Adna, por me aturarem, auxiliarem e agilizassem meu trabalho, e dividirem deliciosos cafés e lanchinhos;

Ao laboratório Jaime Cerqueira, especialmente Claudiana, Jaci, Hosanna, por me orientarem nos experimentos laboratoriais.

À família da pós-graduação, aos professores, colegas e em especial a secretária Leia Omena Leal, que nos salvava nos momentos de socorro.

À equipe da Philozon Indústria e Comércio de Geradores de Ozônio Ltda, pelas amostras dos óleos ozonizados.

A meus Pais, por me ensinarem correção, justiça, humanidade, amor e respeito ao próximo. Sem vocês nada seria possível.

A meus amigos, em especial Deivison Kedoshim I. Menezes, por me oferecer desde livros, esclarecimentos laboratoriais e por me emprestar os ouvidos para as minhas bobagens.

Ao meu amado esposo Ângelo Carlos Biset Priático Dias, meu eixo, minha sustentação, meu apoio, meu porto seguro, sem seu incentivo nada disso seria realidade.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Quando eu morder a palavra, por favor,
não me apressem, quero mascar, rasgar entre
os dentes, a pele, os ossos, o tutano do verbo,
para assim versejar o âmago das coisas.”

Conceição Evaristo

RESUMO

RESUMO

PEREIRA, M. R. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de produtos ozonizados em canais radiculares contaminados – Um estudo *ex-vivo* [dissertação]. Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2023; 96p.

As doenças pulpares e periapicais têm origem na colonização microbiana dos canais radiculares. Durante o tratamento endodôntico, o conteúdo existente do interior do canal radicular deve ser removido para o reestabelecimento da saúde do dente e da região periapical. O hipoclorito de sódio e o hidróxido de cálcio, são adjuvantes terapêuticos nas condutas endodônticas. Recentemente, o ozônio ganhou impulso e desponta como terapia promissora na Endodontia. Objetivo: Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana de água ozonizada e de óleos ozonizados em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Materiais e Métodos: Foram utilizados 84 pré-molares inferiores humanos, divididos em 4 grupos com 7 dentes cada, de acordo com o micro-organismo a serem desafiados: grupo 1 – *Candida albicans*; grupo 2 – *Staphylococcus aureus*, grupo 3 – *Enterococcus faecalis* e grupo 4 – *Pseudomonas aeruginosa*. Cada dente recebeu um dos cinco medicamentos além dos controles positivo e negativo. Resultados e Discussão: A atividade antimicrobiana dos óleos ozonizados na desinfecção dos canais radiculares foram comparáveis àquelas estabelecidas pelos adjuvantes terapêuticos em uso, hipoclorito de sódio e do hidróxido de cálcio. Conclusão: O uso do ozônio está em franca expansão na literatura como possível adjuvante terapêutico, sendo prospectado como importante conduta na Endodontia. O óleo de girassol e o azeite de oliva ozonizados estão como estruturas promissoras para o entendimento de novas rotas metabólicas e condutas adicionais na Endodontia.

Palavras-chave: Endodontia, ozônio, canal radicular, irrigantes, azeite de oliva, óleo de girassol.

ABSTRACT

ABSTRACT

PEREIRA, M. R. S. Evaluation of the antimicrobial activity of ozonated products in contaminated root canals – An ex-vivo study [dissertation]. Salvador: Department of Life Sciences (DLS), State University of Bahia, 2023; 96p.

Pulp and periapical diseases originate from microbial colonization of root canals. During endodontic treatment, the content that exists inside the root canal must be removed to restore the health of the tooth and the periapical region. Sodium hypochlorite and calcium hydroxide are therapeutic adjuvants in endodontic procedures. Recently, ozone gained boost and emerged as a promising therapy in endodontics. Objective: This study evaluated the antimicrobial activity of ozonated water and ozonated oils in root canals infected with *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Materials and Methods: Eighty-four lower human premolars were used, divided into 4 groups with 7 teeth each, according to the microorganism received: group 1 – *Candida albicans*; group 2 – *Staphylococcus aureus*, group 3 – *Enterococcus faecalis* and group 4 – *Pseudomonas aeruginosa*. Each tooth received one of the five drugs besides positive and negative controls. Results and Discussion: The antimicrobial activity of ozonized oils in the disinfection of root canals were comparable to those established by the therapeutic adjuvants in use, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. Conclusion: The use of ozone is booming in the literature as a possible therapeutic adjuvant, being prospected as an important conduct in Endodontics. Sunflower oil and ozonized olive oil are in line with the therapeutic adjuvants in use and are therefore characterized as promising structures for understanding new metabolic routes and additional approaches in Endodontics.

Keywords: Endodontics, ozone, root canal, irrigants, olive oil, sunflower oil, drug association.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ARE – Elementos de resposta antioxidante, do inglês Antioxidant responsive elements;

ATCC® - American Type Culture Collection;

BDH – Banco de dentes humanos;

BHI – Infusão cérebro coração, do inglês Brian heart infusion;

C. albicans – *Candida albicans*;

Ca(OH)₂ – Hidróxido de cálcio;

CAT – Catalase;

CFO – Conselho Federal de Odontologia;

CHX – Digluconato de clorexidina / clorexidina;

CLSI - Comitê de Padronização de Laboratórios Clínico, do inglês The Clinical & Laboratory Standards Institute;

DNA – Ácido desoxiribonucléico, do inglês Deoxyribonucleic acid;

DCV - Departamento de Ciências da Vida;

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid;

EPS – Substância extracelular, do inglês Extracellular polymeric substance;

eHOMD – Banco de dados de Microbioma Oral estendido, do inglês The expanded Human Oral Microbiome Database;

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*;

EPS – Polissacarídeos extracelulares, do inglês extracellular polysaccharides;

FISH – Hibridização fluorescente *in situ*, do inglês Fluorescence *in situ* hybridization;

GPx – Glutathione peroxidase;

GST – Glutathione S-transferase;

HO-1 – Heme-oxidase 1;

HSP – Proteínas de choque térmico, do inglês Heat shock proteins;

IL-1 β – Interleucina 1 beta;

LOP – Produtos de peroxidação lipídica, do inglês Lipidic peroxidation products;

LTA – Ácido lipoteicoico, do inglês Lipoteichoic acid;

MS – Ministério da Saúde;

NaOCl – Hipoclorito de sódio;

NGS – Sequenciamento de próxima geração, do inglês Next-generation sequencing;

NQO-1 – NADPH quinona oxirredutase 1;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

OTU – Unidades taxonômicas operacionais, do inglês Operational taxonomic unit;

PA – Periodontite apical;

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*;

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase chain reaction;

PGE2 – Prostaglandina E2;

PICS – Práticas Integrativas e Complementares;

PUFA – ácidos graxos poli-insaturados, do inglês poly unsaturated fatty acids;

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês Reactive oxygen species;

S. aureus – *Staphylococcus aureus*;

S. anginosus – *Streptococcus anginosus*;

S. constellatus – *Streptococcus constellatus*;

S. intermedius – *Streptococcus intermedius*;

SOD – Superóxido dismutase;

TNF- α – Fator de necrose tumoral, do inglês Tumor necrosis factor;

TSA – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos;

UFC – Unidade formadora de colônia;

UESF – Universidade Estadual de Feira de Santana;

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gerador de Ozônio e Torre de Água.....	56
Figuras 2 - Ilustração da placa de ágar com os poços perfurados.....	57
Figuras 3 – 5 - Presença de canal único de pré-molares humanos.....	58
Figuras 6 e 7 - Remoção das coroas dos dentes.....	59
Figura 8 - Instrumento no forame apical.....	59
Figura 9 - Impermeabilização com esmalte	60
Figura 10 - Placa modelo para cultura celular.....	61
Figura 11 - Inclusão dos dentes nas placas de poliestireno.....	58
Figuras 12 e 13 -Turvação em caldo a 0,5 da escala McFarland.....	62
Figura 14 - Esquema ilustrativo das placas com os dentes numerados.....	63
Figuras 15 –18 - Teste de difusão dos óleos <i>in natura</i> e ozonizados.....	66
Figuras 19 – 22 - Teste de sensibilidade a medicamentos em poços.....	67
Figuras 24 - Desafio das cepas de <i>C. albicans</i> com os medicamentos.....	69
Figura 25 - Placas com <i>S. aureus</i> desafiadas pelos medicamentos.....	70
Figura 26 - Placas com <i>E. faecalis</i> desafiadas pelos medicamentos.....	70
Figura 27 - Placas com <i>P. aeruginosa</i> desafiadas pelos medicamentos.....	71

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	68
Tabela 2 - Percentual de eliminação das cepas testadas.....	71

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	29
2. 1 OBJETIVO GERAL	30
2. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	31
3. 1 MICRO-ORGANISMOS EM ENDODONTIA	32
3. 2 <i>Enterococcus faecalis</i>	34
3. 3 <i>Candida albicans</i>	36
3. 4 OUTROS PATÓGENOS	37
3. 5 TRATAMENTO ENDODÔNTICO	38
3. 6 SOLUÇÕES IRRIGANTES	41
3. 7 HIPOCLORITO DE SÓDIO.....	42
3. 8 HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO MEDICAMENTO INTRACANAL	45
3. 9 OZÔNIO E OZONIOTERAPIA	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 PRODUTOS TESTADOS	55
4. 2 GERAÇÃO DA ÁGUA DE OZÔNIO	55
4. 3 SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	56
4. 4 TESTE DE SENSIBILIDADE AANTIMICROBIANOS.....	56
4. 5 PREPARO DOS ESPÉCIMES.....	58
4. 6 INCLUSÃO EM PLACAS DE POLIESTIRENO	60
4.7 DIVISÃO EM GRUPOS.....	61

4. 8 PREPARO DO INÓCULO	61
4. 9 CONTAMINAÇÃO DOS ESPÉCIMES	62
4. 10 CONFIRMAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO	63
4. 11 TESTE DE CONTATO DIRETO EM DENTES <i>EX-VIVO</i>	63
4. 12 COLETA DAS AMOSTRAS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	64
4. 13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	64
5 RESULTADOS.....	65
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral humana abriga a microbiota mais abundante depois da existente no trato gastrointestinal. Traumatismos dentários, de acordo com Verma, Garg, Dubey (2018), podem ser formas de entrada para micro-organismos, além de cavidades abertas pelo processo carioso ou através dos túbulos dentinários sem exposição pulpar. As bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas são as primeiras colonizadoras, sendo os carboidratos a principal fonte de energia. Dioguardi e colaboradores (2019), afirmaram que os produtos metabólicos aeróbios a partir dos carboidratos estabelece pressão seletiva com predomínio final de anaeróbios que utilizam aminoácidos e peptídeos, por sua vez nas rotas de obtenção energética.

Tonini e colaboradores (2022) relataram que metade da população mundial já experimentou, em pelo menos um momento em suas vidas, dor relacionada a doenças endodônticas causadas pela infecção bacteriana dos canais radiculares, a periodontite apical (PA). A prevalência de PA varia de 16 a 86% e aumenta com a idade.

Em um estudo na cidade de Salvador– Bahia publicado em 2010, Chaves e colaboradores observaram que 73,3% dos pacientes que buscaram tratamento em Centros de Especialidade Odontológicas da Prefeitura, vinculados ao SUS, estavam relacionados a tratamentos endodônticos.

Para Franciscatto e colaboradores (2020) cinquenta por cento (50%) das visitas de urgências em Odontologia são atribuídas as dores referidas a colonização bacteriana dos canais radiculares e a dor de dente ou dor orofacial associado a impactos na qualidade do sono, apetite e nas atividades laborais.

Apesar de presente em infecções primárias, o *Enterococcus faecalis* constitui uma pequena parcela dentre as espécies microbianas isoladas dos canais radiculares de dentes com polpa necrosada. No entanto, para Prada e colaboradores (2019a), aquela é a espécie mais comumente isolada de infecções endodônticas secundárias. Avaliando a capacidade de persistência do *E. faecalis* nos canais radiculares tratados, Jiang e colaboradores (2015), reportaram a sua viabilidade peculiar como fator associado a permanência no sítio, mas não cultivável quando expostos a condições ambientais adversas. Assim o canal radicular obturado é um nicho único, pobre em

nutrientes e relativamente bem fechado, onde o *E. faecalis* expressa aquela característica.

Todavia, o *E. faecalis* não é o único patógeno associado a infecções secundárias e ao insucesso do tratamento endodôntico. Cosan e colaboradores (2022) descreveram que, em virtude de sua natureza polimórfica, o fungo *Candida albicans* pode ser encontrado em canais radiculares malsucedidos. Além disso, Louzada e colaboradores (2020) afirmaram que as doenças de origem pulpar são polimicrobianas e não existe uma predominância de um ou mais microrganismos ou pool de microrganismos como agentes causadores das patologias endodônticas primárias ou secundárias.

A doença endodôntica se caracteriza por colonização bacteriana diversa do espaço do canal radicular, para Kumar e colaboradores (2020) o objetivo primordial do tratamento endodôntico é criar um ambiente biologicamente aceitável dentro do sistema dos condutos radiculares que permita a remoção da contaminação radicular, a cura e o restabelecimento da saúde do tecido perirradicular. O tratamento endodôntico para Siqueira Júnior e colaboradores (2018), tem como finalidade a remoção e eliminação do material contaminante, a modelagem, a sanificação e a obturação hermética do interior do canal radicular.

Entretanto, a instrumentação por si só não promove a remoção e eliminação das bactérias no interior do sistema de canais radiculares, faz-se assim, necessário a utilização de um ou mais produtos antimicrobianos para desinfecção e limpeza do interior dos condutos (Abuhaimed; Abou Neel, 2017; Prada *et al.*, 2019b; Rath *et al.*, 2020). O objetivo do tratamento endodôntico é a remoção daquele conteúdo séptico no interior dos canais e consequente eliminação das alterações periapicais. No entanto, entre 35 e 53% das paredes do canal permanecem sem serem tocadas pelas limas como relataram Prada e colaboradores (2019b), demonstrando que os instrumentos endodônticos em associação com adjuvantes químicos como irrigantes do sistema de canais radiculares apresentam maior eficiência terapêutica.

Conforme relatado por Nirwana e colaboradores (2018), o hipoclorito de sódio (NaOCl) devido a suas propriedades bactericida, desodorizante e lubrificante é a solução halogenada mais utilizada na desinfecção do sistema de canais. Possui baixa tensão superficial, ação detergente e capacidade de dissolução de tecidos. Embora

concentrações mais elevadas de NaOCl melhorem significativamente seus efeitos antimicrobianos e de dissolução de tecidos, ele pode se tornar mais citotóxico e induzir resposta inflamatória quando em contato com tecidos periapicais, como observaram Blattes e colaboradores (2017), ocasionando hemorragia, edema e ulceração da pele. Apesar da frequência de acidentes com o hipoclorito de sódio, como são chamados a extrusão de NaOCl para os tecidos periapicais, e a taxa de lesões causadas pelo extravasamento serem baixas (0,89% e 0,18%, respectivamente), Özdemir e colaboradores (2022) reportaram que nos acidentes com hipoclorito, a gravidade das lesões após o acidente pode levar a resultados pós-operatórios graves e críticos.

Para assegurar a desinfecção completa do sistema de canais radiculares é comum a utilização de medicamento intracanal. Vasavada; Kapoor (2020) reportaram que o hidróxido de cálcio permanece como o produto de primeira escolha devido as suas propriedades bactericidas, estabilidade e capacidade de conter exsudatos inflamatórios, além de aliviar a dor pós-operatória. Todavia estes autores alertam que para atingir sua eficácia terapêutica, o hidróxido de cálcio precisa estar associado com um veículo que favoreça a sua dissociação.

Procurando driblar a toxicidade do NaOCl e buscando novos produtos antimicrobianos para o sistema de canais radiculares, Kist e colaboradores (2017) reportaram que já existem esforços para o desenvolvimento de novos agentes desinfetantes e terapêuticos, sendo o ozônio uma promissora estratégia para garantir segurança.

Apesar de ser aplicado desde o século 19, o ozônio passou a ser mais estudado como substância coadjuvante de diversos procedimentos médicos e odontológicos, nas últimas décadas, pela atividade antibacteriana e biocompatibilidade como relatado por Nogales e colaboradores em 2016. Soluções gasosas, aquosas ou oleosas ozonizadas têm sido utilizadas de acordo com Tiwari e colaboradores (2017), como coadjuvantes na limpeza dos canais radiculares ao final da instrumentação ou como medicamento entre sessões do tratamento endodôntico.

Além da atividade antimicrobiana, sendo muito eficiente em cepas de microrganismos resistentes a medicamentos, para Ajeti e colaboradores (2018), o ozônio estimula a imunidade celular e humoral do organismo humano, a proliferação

de células imunocompetentes, a síntese de imunoglobulinas e a ativação de macrófagos.

Os dados sobre a qualidade e perfil antimicrobiano do ozônio direcionam pesquisas em busca de possíveis substitutos para o hipoclorito de sódio e o hidróxido de cálcio. Água e óleos ozonizados, por sua melhor estabilidade em relação ao gás de ozônio, menor toxicidade e gatilhos imunológicos, de acordo com Anzolin, Da Silveira Kaross, Bertol em 2020, se tornam alternativas promissoras no tratamento de infecções endodônticas.

Utilizando o ozônio gasoso a 40 ug/ml e água ozonizada com 8 ug/ml de ozônio como auxiliares do tratamento endodôntico, Nogales e colaboradores (2016), reconheceram a atividade antimicrobiana do ozônio pela descontaminação de canais radiculares em dentes *ex-vivo* e reportaram que as terapias com ozônio despontam como promissoras durante a Endodontia.

O azeite de oliva ozonizado obteve redução da formação de até 84% de biofilmes de monoculturas de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* e de até 79% de culturas mistas destas espécies como reportaram Elshinawy e colaboradores (2018), além de apresentar baixa toxicidade em culturas de fibroblastos humanos, sendo considerado o produto mais seguro do estudo que o comparou com nanopartículas de quitosana e de prata.

Ao avaliar a capacidade de óleos ozonizados em células aderidas e biofilmes de *Staphylococcus aureus* susceptíveis e multirresistentes a metilina, Silva e colaboradores (2020) enumeraram que o ozônio não possui citotoxicidade, é cicatrizante e possui alta atividade antimicrobiana sobre bactérias, vírus, protozoários e fungos, e os óleos ozonizados nas concentrações de 8 e 17 µg/g mostraram halo de inibição de crescimento bacteriano de 15 a 17 mm e foram responsáveis pela inibição de 51 a 75% dos microrganismos resistentes e 76 a 99% dos microrganismos susceptíveis a metilina.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil antimicrobiano da água, do óleo de girassol e do azeite de oliva ozonizados em amostras contaminados por endopatógenos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar, em placas de ágar, os halos de inibição da água de ozônio, do óleo de girassol e do azeite de oliva ozonizados em cepas ATCC;
- b. Caracterizar a eficiência do hipoclorito de sódio e do hidróxido de cálcio frente aos patógenos testados;
- c. Correlacionar as atividades antimicrobianas dos produtos ozonizados em relação ao hipoclorito de sódio e ao hidróxido de cálcio.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 MICRO-ORGANISMOS EM ENDODONTIA

A cavidade oral humana abriga a segunda mais abundante microbiota depois da existente no trato gastrointestinal. O banco de dados de Microbioma Oral Humano expandido (eHOMD), atualizado em 2017, conforme relatado por Verma, Garg, Dubey, (2018), contém as informações de aproximadamente 772 espécies procarióticas onde 70% são cultiváveis e 30% pertencem à classe incultivável de microrganismos, todas com potencial para levar à contaminação da polpa dentária e dos canais radiculares.

A principal via de acesso dos micro-organismos ao interior da polpa dentária é através das cáries. A cárie é, para Duncan e colaboradores (2019), uma doença induzida por biofilme bacteriano, impulsionada por um suprimento de carboidratos fermentáveis. A mudança ecológica resultante da comunidade bacteriana presente, cria um nicho acidogênico e cariogênico que destrói o tecido duro do dente com formação da cavidade.

É provável que os canalículos dentinários e a polpa dentária exposta sejam alvos da gama diversificada de espécies bacterianas da cavidade bucal, no entanto, como relatado por Kumar e colaboradores (2020), dependendo das técnicas de identificação, certas cepas são mais frequentemente isoladas do que outras e na maioria dos canais radiculares infectados.

Dentro do canal radicular, as bactérias podem ser classificadas como células planctônicas (livres) e em biofilmes. Os biofilmes bacterianos são agregados ou congregações de micro-organismos aderidos às paredes dos canais radiculares por meio de uma matriz de substâncias poliméricas extracelular. Conforme Prada e colaboradores (2019a), os microrganismos que vivem em biofilmes tem a capacidade de se auto-organizar (autopoiese), de resistir às alterações do meio em que vivem (homeostase), de ser mais eficaz em grupos do que isolados (sinergismo), além da capacidade de responder às mudanças como uma unidade e não como indivíduos isolados.

A identificação de micro-organismos do interior dos canais radiculares infectados depende da lesão endodôntica e das características metodológicas, cultura bacteriana ou sequenciamento genético, dos estudos envolvidos nessa temática. Para

Anderson e colaboradores (2012), não existe uma variedade que seja predominante nas patologias endodônticas.

Ao explorar a microbiota intra-radicular de dentes com infecções agudas e crônicas através do sequenciamento metagenômico *shotgun*, Kumari e colaboradores (2023) conseguiram reconstruir e identificar cinco gêneros *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactocaseibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e um gênero não classificado. Esses autores correlacionaram o gênero *Pseudomonas* a 90,90% dos casos de periodontite apical aguda e os gêneros *Enterobacter* e *Enterococcus* a 69,88% e 15,42%, respectivamente, das periodontites apicais crônicas.

As abordagens de identificação de espécies bacterianas em canais radiculares infectados por meio de cultura, PCR, ensaios de hibridização de DNA ou hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e sequenciamento genômico permitem catalogar um conjunto de 20 a 30 espécies bacterianas. Entretanto, Manoil, Al-Manei, Belibasakis (2020) afirmaram que as tecnologias de sequenciamento de DNA de alto rendimento, chamadas de sequenciamento de próxima geração (NGS) são capazes de identificar em média 400 unidades taxonômicas operacionais (OTU) em canais radiculares infectados e destas espécies, não há uma espécie específica para os tipos de infecções endodônticas, mas sim quantidades relativas e interações entre elas.

As infecções endodônticas são caracterizadas por comunidades de biofilmes multiespécies. A doença pulpar ou periapical depende da patogenicidade coletiva dessas comunidades. A patogenicidade, como relataram Siqueira Júnior e colaboradores (2018), é o resultado de vários fatores, como espécie, virulência dos tipos clonais presentes, interações sinérgicas entre os membros da comunidade e os números (contagens) de cada espécie que a compõe.

Louzada e colaboradores (2020) descrevem a ação do lipopolissacarídeo das bactérias gram-negativas e do ácido lipoteicóico das gram-positivas, além da existência física das bactérias, nas modificações do sistema imunológico do hospedeiro e estimulação da reabsorção óssea nas infecções endodônticas primárias e persistentes.

De acordo com Martinho e colaboradores (2018), quando as bactérias e suas toxinas, presentes na infecção do canal radicular, saem para os tecidos periapicais

através do forame apical, produzem a periodontite apical (PA), que se caracteriza em um distúrbio inflamatório complexo, envolvendo uma variedade de células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e prostaglandina E2 (PGE2).

As reações inflamatórias provocadas pela saída de micro-organismos infectantes e seus metabólitos para os tecidos perirradiculares, de acordo com Kumari e colaboradores (2023) incluem atividade proteolítica por várias células imunes, como os polimorfonucleócitos, macrófagos e mastócitos, culminando no recrutamento de osteoclastos no local e na formação de uma cavidade óssea. Dependendo do nível de infecção, a cavidade óssea periradicular pode ser preenchida com detritos celulares, micro-organismos (vivos e mortos), fibroblastos, osteoclastos, cristais de colesterol e células imunes em proporções variadas.

A periodontite apical é uma doença endodôntica insidiosa com alta prevalência na população e se caracteriza pela ausência de sintomas ou dor aguda. De acordo com Ordinola-Zapata e colaboradores (2022), as manifestações clínicas não são influenciadas pela composição microbiana existente no interior dos canais radiculares e sim pela carga e interações bacterianas, fatores de virulência dos micro-organismos, resistência do hospedeiro e predisposição genética.

3.2 *Enterococcus faecalis*

Em estudos moleculares por reação em cadeia da polimerase (PCR), Siqueira e colaboradores (2016) detectaram *Enterococcus faecalis* do filo Firmicutes como mais prevalente no microbioma do sistema de canal radicular em dentes com alterações periapicais, seguidos por filos como Proteobactéria, Bacteróides e Actinobactéria. Avaliando as espécies microbianas detectadas em casos de periodontite apical secundária por PCR, Siqueira, Rôças (2004) relataram o *E. faecalis* como a espécie mais prevalente, em 77% dos casos e *Candida albicans* em 9% das amostras.

Os enterococos são bactérias gram-positivas, dispostas em cocos em cadeia, que fazem parte da microbiota comensal do trato gastrointestinal e são amplamente distribuídas no meio ambiente. Para Diouguardi e colaboradores (2019), a espécie *Enterococcus faecalis* é responsável por 80% das infecções humanas, é capaz de

resistir em condições extremas, colonizar os túbulos dentinários profundamente, associado a formação biofilme, e metabolização das fibras de colágeno dos túbulos em caso de redução de nutrientes.

Ao relatar a dificuldade de eliminar o *E. faecalis* durante a Endodontia, Reis e colaboradores (2018) afirmaram que o *E. faecalis* tem a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, o que não é observado em outras espécies bacterianas, se adaptando e tolerando às condições ecológicas extremas em canais tratados. Além da capacidade de aderir ao colágeno, como fator perpetuador da periodontite apical, associando a resistência a antimicrobianos e medicamentos intracanaís.

Sua alta virulência, patogenicidade e resistência a antibióticos foi estudada por Barbosa-Ribeiro e colaboradores (2016), que observaram que os fatores de virulência do *E. faecalis* estão frequentemente relacionados a capacidade de produzir antígenos de superfície, substâncias agregantes e enzimas líticas como a hialuronidase, citolisina, protease e collagenase. Nesse estudo, os autores pautaram que as cepas pesquisadas apresentaram diferentes padrões de genes de virulência e perfis variáveis de resistência.

Adicionalmente, Wei e colaboradores (2021) afirmaram que o *E. faecalis* apresenta uma gama de genes de resistência intrínseca e devido à sua eficiente troca de elementos genéticos móveis, em condições de estresse, é capaz de adquirir genes de resistência a antibióticos, genes que codificam a hemolisina, que é um fator de virulência, e genes que alteram os sistemas de transporte de fosfato, que auxilia na adaptação frente a microambientes desfavoráveis.

Deng e colaboradores (2023) afirmaram que o ácido lipoteicóico (LTA), um componente da parede celular dos *E. faecalis* que atua como um importante fator de virulência, pode desencadear cascatas resultando na liberação de citosinas pró-inflamatórias e de danos aos tecidos periapicais. Além disso, em ambientes com escassez de nutrientes e alcalinos, ocorrem alterações na síntese de exopolissacarídeos solúveis e insolúveis em água e polissacarídeos intracelulares, contribuindo para a defesa de *E. faecalis* contra o estresse ambiental.

Kumar e colaboradores (2020) observaram a correlação positiva entre dor e a presença de *E. faecalis* em infecções primárias e secundárias, hipotetizando a

formação dos biofilmes em canais radiculares como importante fator para resistência bacteriana e persistência após procedimentos endodônticos.

Todavia não existe consenso se estes micro-organismos são os maiores responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico. Pereira e colaboradores (2017) descrevem que a periodontite apical parece ter uma microbiota heterogênea, na qual várias comunidades bacterianas, incluindo fenótipos não cultiváveis, podem produzir doenças semelhantes, logo, não existindo consenso se o gênero *Enterococcus* é o maior responsável pelo insucesso do terapia endodôntica.

O *E. faecalis*, pode suportar condições ambientais adversas, incluindo a alta alcalinidade própria do tratamento endodôntico, como bem reportaram Jiang e colaboradores (2015), o que o leva a entrar em um estado viável, mas não cultivável, onde perde a capacidade de formar colônias em meios de cultura, mas permanece vivo e produzindo componentes antigênicos e fatores de virulência. Uma vez as condições ambientais permissivas ao crescimento são restauradas, o *E. faecalis* se torna capaz de retomar a divisão celular e promover a transmissão e persistência da doença.

3.3 *Candida albicans*

Apesar do papel bacteriano bem estabelecido na patogênese das infecções endodônticas, Abraham e colaboradores (2020) mencionaram fungos, vírus e *archaea* na fisiopatologia da doença endodôntica. Listam ainda que os eucariotos fúngicos compostos por espécies de *Candida* compreendem uma pequena parte do microbioma oral, sendo a *Candida albicans* a espécie com maior frequência.

Mergoni e colaboradores (2018), em uma revisão sistemática e meta-análise descreveram pequena participação das espécies de *Candidas* nas infecções endodônticas, sendo a *C. albicans* a espécie mais detectada em canais radiculares.

A prevalência de *C. albicans* nas superfícies mucosas dos organismos vivos, segundo Du e colaboradores (2022) é de 18,5 a 40,9%. Estes autores relataram que esta levedura pode interagir com uma variedade de micro-organismos orais por meio de fixação física às paredes celulares fúngicas, por proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares (EPS), sinais extracelulares, alimentação cruzada de metabólitos e alterações ambientais. Tais interações entre reinos microbianos

demonstraram estar envolvidas na patogênese de diversas doenças bucais, incluindo cárie dentária, candidíase oral, doença endodôntica, periodontite e outras doenças orais relacionadas ao biofilme bacteriano.

Francisco e colaboradores (2018) identificaram 720 proteínas microbianas diferentes pelo método proteômico 2D-LC-MS/MS, sugerindo a existência um microbioma nos canais radiculares. Apresentaram nesse estudo a presença de importantes adesinas oriundas, provavelmente, de cepas de *C. albicans* associadas a formação de biofilme.

A *C. albicans* se liga a superfícies abióticas e bióticas, como próteses e paredes dentárias, com preferência à dentina, conforme declararam Yoo e colaboradores (2020). O biofilme maduro formado contém múltiplas camadas de células pleiomórficas constituídas de células leveduriformes, hifas e pseudo-hifas incrustadas por interações físico-químicas.

Segundo Elshinawi e colaboradores (2018) a β -1,3 glucana produzida pela *C. albicans* proporciona estabilidade a matriz do biofilme. Além disso, a secreção de substância polimérica extracelular (EPS) proporciona aderência e fatores de proliferação ao microbioma misto do biofilme em canal radicular. A presença do *E. faecalis* e o incremento oxidativo dos superóxidos lançados estimulam a formação de hifas em cooperação simbiótica.

Para Maekawa e colaboradores (2013) a capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies, de se adaptar a diferentes condições ambientais, tornando-se comensal, de transição morfológica e de invadir profundamente os canalículos dentinários está relacionada aos mecanismos de resistência de *C. albicans* aos medicamentos comumente aplicados nos canais radiculares.

3.4 OUTROS PATÓGENOS

Ao investigar *in vivo* a presença de microorganismos em dentes obturados com periodontite apical, quantificando as unidades formadoras de colônias (UFC) e por reação em cadeia da polimerase – PCR 16S rDNA, Endo e colaboradores (2013) descreveram que os procedimentos por meio de cultura, apesar de ser tradicionalmente utilizado para a avaliação da microbiota e ter seu lugar nas pesquisas científicas, tem como desvantagens resultar em subestimação dos micro-organismos,

além de ser difícil simular as condições ambientais necessárias para o cultivo de microrganismos exigentes. Já o método da PCR é mais específico, preciso, sensível e rápido que a técnica de cultura, permitindo a detecção de micro-organismos não-cultiváveis e fastidiosos, no entanto não tem o poder de avaliar a viabilidade microbiana.

Buscando avaliar a frequência de espécies bacterianas orais em abscessos apicais agudos e periodontite apical assintomática, Rôças; Siqueira (2018) demonstraram através de métodos moleculares em amostras de 133 pacientes, que os taxóons mais prevalentes foram *Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister invisus*, *Olsenella uli*, *Parvimonas micra* e *Prevotella baroniae*. Mencionaram ainda que algumas espécies/filótipos ocorreram em contagens significativamente maiores em abscessos (*T. denticola* e estreptococos pertencentes ao grupo anginosus: *S. Anginosus*, *S. Constellatus* e *S. Intermedius*). Entretanto, esclarecem que as infecções endodônticas são caracterizadas por comunidades de biofilmes multibacterianos, sem haver alguma espécie especificamente comprovada como principais causadoras das pulpo e periapicopatias.

Em uma pesquisa por hibridização *checkerbord DNA-DNA*, Louzada e colaboradores (2020) visando investigar o perfil microbiano e os níveis de endotoxinas em diferentes fases do tratamento endodôntico, encontraram *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella nigrescens*, *Filifactor alocis* e *Tannerella forsythia* predominando nas alterações dos canais radiculares. Acrescentaram que a utilização de medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio reduziu a presença de *E. faecalis* e *F. nucleatum* nos canais infectados e sugeriram o uso de medicamento intracanal para complementar a desinfecção do sistema de canais radiculares.

3.5 TRATAMENTO ENDODÔNTICO

O tratamento químico-mecânico do canal radicular é caracterizado pelo alargamento e modelagem do conduto com instrumentos endodônticos, além da limpeza do espaço com desinfetantes químicos. Essa ação tem o objetivo de remover tecidos remanescentes vitais ou necróticos, eliminar a microbiota existente dentro do sistema de canal radicular, incluindo o biofilme microbiano e remover as raspas de

dentina acumuladas formadas durante a instrumentação do canal radicular (Blattes *et al.*, 2017).

Kist e colaboradores (2017) relataram que a taxa de sucesso dos tratamentos endodônticos de canais radiculares infectados é de mais de 90% com teste microbiológico negativo e até 26% menor, com um teste microbiológico positivo antes da obturação. Portanto, a remoção do maior número possível de bactérias do sistema de canal radicular infectado está associada ao tratamento endodôntico bem-sucedido e a diminuição de alterações periapicais detectadas nas imagens radiográficas.

O uso de técnicas e equipamentos endodônticos contemporâneos durante o alargamento e a modelagem dos canais, como os dispositivos de aumento (lupas e microscópio), os localizadores apicais eletrônicos, as limas rotatórias de níquel titânio acionadas por motor (em rotação contínua, alternada e recíproca), a irrigação sônica e ultrassônica com movimentos ativos e passivos e assim por diante, não só busca aumentar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico, conforme reportaram Erdem Hepsenoglu, Eyuboglu, Özcan (2018), mas também diminuir o tempo necessário para o tratamento.

No entanto, Coaguila-Llerena e colaboradores (2020), demonstraram que os instrumentos endodônticos são incapazes de entrar em contato com todas as paredes do canal radicular, uma vez que a anatomia do sistema de canais radiculares é complexa. Como resultado se observa menor eliminação de microrganismos em áreas intocadas pelas limas endodônticas, incluindo os túbulos dentinários.

Assim, para Rath e colaboradores (2020), o uso de substâncias auxiliares é considerado primordial no tratamento do canal radicular. Esses adjuvantes químicos se enquadram em uma das seguintes categorias: agentes proteolíticos (hipoclorito de sódio), agentes desmineralizantes/quelantes (ácido etilenodiaminotetracético) e antissépticos (clorexidina) / antibióticos tópicos (doxicilina).

Prada e colaboradores (2019a) afirmaram que 35 a 53% das paredes dos canais radiculares permanecem intocadas após o preparo mecânico dos condutos. Desta forma, o meio de eliminar os restos de tecido e micro-organismos destas áreas é usando soluções irrigantes durante o preparo químico-mecânico. Esses autores relataram que os efeitos dos irrigantes em Endodontia são principalmente 1) efeitos

químicos: dissolução de tecido orgânico e inorgânico, remoção de dentina e remoção da camada residual (*smear layer*); 2) efeitos mecânicos: lubrificação do canal radicular, remoção mecânica de micro-organismos/biofilme, restos de tecido pulpaes e raspas de dentina; e 3) efeitos biológicos: atividade antimicrobiana, inativação de endotoxinas e biocompatibilidade.

O preparo químico-mecânico dos canais radiculares usando instrumentos manuais ou rotatórios produzem uma camada residual de detritos orgânicos e inorgânicos, denominada *smear layer*. Shekhar e colaboradores (2022) afirmaram que a *smear layer* quando contaminada por micro-organismos, os protege no interior dos túbulos dentinários e deve ser removida para melhorar a vedação hermética e impedir a percolação de fluidos para o sistema de canais radiculares.

A remoção da camada residual, para Tahir e colaboradores (2023), é necessária para que a obtenção de um ambiente estéril e que o cimento penetre nos túbulos dentinários, melhorando a adaptação marginal, a retenção mecânica, além de sepultar bactérias residuais. Esses autores relataram que para a remoção da *smear layer* é obrigatório o uso de um agente quelante como o ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido cítrico, ácido maleico e ácido fítico.

De acordo com Holland e colaboradores (2017) o ideal para os procedimentos terapêuticos em canais radiculares é a obturação do conduto com o selamento completo do sistema de canais, dificultando a comunicação entre a via principal e o tecido periodontal apical. Isso favorece o processo de reparo tecidual em torno da raiz do dente. Afirmam também que um cimento ideal em Endodontia deve ter propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas buscando o vedamento do complexo radicular. Apesar disso, a desinfecção do sistema de canais radiculares deve sempre preceder o uso de cimentos biocompatíveis para o reparo tecidual completo e sucesso terapêutico.

Embora os cimentos obturadores do canal radicular tenham atividades antibacterianas, algumas bactérias, como *E. faecalis*, devido a sua resistência a ambientes desfavoráveis, pode se manter viável mesmo após a obturação dos canais radiculares em áreas intocadas pelas limas endodônticas, como istmos, canais laterais e acessórios, ou outras irregularidades dos canais radiculares, conforme

relataram Lin e colaboradores (2021). Esses autores afirmaram que a presença da contaminação bacteriana impedirá a cicatrização de lesões perirradiculares.

O selamento coronário conclui o tratamento endodôntico. O restaurador coronário ideal, reportado por Kumar e colaboradores (2018), deve selar as margens dos dentes, não ter porosidade, suportar amplitudes, ser de fácil inserção e remoção, ter boa resistência à abrasão e compressão, ser compatível com medicamentos endodônticos, além de proporcionar melhor estética. O vedamento coronário dificulta o percolamento de fluidos para o interior da obturação dos canais e reduz a possibilidade de insucesso do tratamento endodôntico.

O objetivo do tratamento endodôntico é, em conformidade com Tabassum; Khan (2016), o debridamento completo e a limpeza do sistema de canais radiculares, de qualquer tecido pulpar infectado, para que o espaço do canal possa ser moldado e preparado, para ser preenchido com um material inerte, evitando ou minimizando quaisquer chances de reinfecção. A persistência de bactérias intra ou extracanal, canais não obturados ou obturados inadequadamente (sub-obturações), extravasamento de material obturador (sobre-obturações); selamento coronário inadequado e iatrogenias (desvios, zips, rasgos, perfurações e fraturas de instrumentos) estão elencados com fator predisponente ao insucesso terapêutico e maior chance de recidivas.

3.6 SOLUÇÕES IRRIGANTES

A desinfecção do sistema de canais radiculares como conduta odontológica acontece com o uso paralelo de instrumentos endodônticos e das substâncias sanitizantes. Shi e colaboradores (2019) mencionam a irrigação do canal radicular como condição base para o sucesso terapêutico no interior do canal radicular.

Alshanta e colaboradores (2019) descrevem que o irrigante ideal deve ter capacidade inicial de lavagem, seguido de atividade antimicrobiana de amplo espectro, inativação de endotoxinas bacterianas, dissolução de tecidos orgânicos necróticos, remoção da *smear layer*, poucos efeitos agressivos contra a dentina e ser biocompatível com o tecido perirradicular.

O material ideal para irrigação do canal radicular, citado por Nirwana e colaboradores (2018), em estudo para um novo irrigante em Endodontia, deve ter

baixa tensão superficial, baixa toxicidade, bem como pureza, baixo custo e fácil manuseio pelo especialista. Além de atuar como solvente de detritos com ação microbiana potente e auxiliar na fluidez dos instrumentos endodônticos durante o preparo do canal radicular. Para Ravinanthanan e colaboradores (2018), embora sejam amplamente usados em dentes vitais e não vitais, aqueles podem ser extravasados inadvertidamente para os tecidos periapicais e levar a potenciais complicações.

De acordo com Prada e colaboradores (2019b), o hipoclorito de sódio (NaOCl), a clorexidina (CHX) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) são os irrigantes mais conhecidos e utilizados atualmente. Nenhuma dessas substâncias é considerada ideal, todas apresentam vantagens e desvantagens, logo convém o uso em combinação. Seguindo essa lógica, novos compostos ou potencializadores são rotineiramente lançados.

Em meta-análise sobre a atividade do hipoclorito de sódio e da clorexidina (CHX), Ruksakiet e colaboradores (2016) não encontraram diferenças entre os dois irrigantes quanto a eficácia antimicrobiana, entretanto afirmaram que o efeito antimicrobiano depende da frequência, do tempo de contato do produto com as paredes dos canais radiculares e acrescentaram a associação de mecanismos de ativação para melhorar a atividade antimicrobiana, bem como recomendaram o desenvolvimento de agentes antimicrobianos mais potentes e mais biocompatíveis.

3.7 HIPOCLORITO DE SÓDIO

Para Abuhaimed, Abou Neel, (2017) o hipoclorito de sódio, composto em solução aquosa pelo ácido hipocloroso e hidróxido de sódio, é a solução halogenada mais utilizada na desinfecção do sistema de canais radiculares. O ácido hipocloroso tem forte ação antibacteriana devido a sua capacidade de interromper a fosforilação oxidativa e outras atividades associadas à estabilidade da membrana celular, além de apresentar rápido efeito inibitório mitocondrial e em síntese de ácidos nucleicos. O hidróxido de sódio além de ser capaz de dissolver a polpa remanescente e o componente orgânico da dentina, também tem a capacidade de neutralizar tecidos necróticos ou componentes bacterianos residuais no canal radicular.

A ação bactericida do NaOCl está no elevado pH elevado, como mencionaram Blattes e colaboradores (2017). Possui baixa tensão superficial, ação detergente e capacidade de dissolução de tecidos. Esses autores relataram que embora concentrações mais altas de NaOCl incrementem os efeitos antimicrobianos e de dissolução de tecidos, podem torná-lo mais citotóxico e induzir resposta inflamatória em tecidos periapicais. Outra limitação importante ao uso do NaOCl é sua instabilidade química. Agentes externos como temperatura, luz e condições de armazenamento influenciam na disponibilidade de íons cloro, caracterizando a menor estabilidade daquele composto, portanto a manutenção e preservação de suas propriedades estão associadas ao sucesso do tratamento endodôntico.

Nunes e colaboradores (2022) afirmaram que o hipoclorito de sódio é o irrigante de escolha devido aos seus efeitos antibacterianos e dissolução tecidual. Entretanto, a citotoxicidade se torna mais elevada em altas concentrações, além de diminuir a resistência à flexão e resiliência da dentina, tornando os dentes mais enfraquecidos e suscetíveis a deformações e possivelmente fraturas. Desta forma, esses autores propõem pesquisas com novas metodologias e novos irrigantes para minimizar o efeito negativo do NaOCl.

Frough-Reyhani e colaboradores (2016) demonstraram que o NaOCl pode ser usado em diversas concentrações, entretanto as concentrações de 2,5% e 5% foram capazes de eliminar completamente o biofilme de *E. faecalis* em três estágios de desenvolvimento do biofilme, sem haver diferenças significativas, justificando o uso clínico da menor concentração, visando driblar assim a toxicidade em concentrações elevadas.

Segundo Guivarc'h e colaboradores (2017), a extrusão de NaOCl durante a terapia de canal radicular é comumente referida como “o acidente com hipoclorito”, causando sinais e sintomas imediatos agudos como dor, sangramento e edema. Em contato com os tecidos vivos, o NaOCl oxida rapidamente os tecidos próximos, inibe a migração de neutrófilos, associa-se a destruição das células endoteliais e fibroblastos, resultando em ulcerações.

O termo “acidente com hipoclorito” e suas consequências subsequentes foram primeiramente relatados por Becker *et al.*, em 1974, de acordo com Al-Sabaei; Halabi; Hakim (2015) e pode ocorrer devido ao uso inadequado do dique de borracha e dos

grampos para o isolamento absoluto da unidade a ser tratada; ao desconhecimento do uso do NaOCl, como concentração elevada; a força excessiva aplicada na injeção do líquido; ao posicionamento profundo da agulha de irrigação e da anatomia da região e forame apical (reabsorções externas, deltas apicais, ápices dentários abertos).

Caso o irrigante atinja a área periorbitária, o lábio superior ou mesmo bochecha, pode ser acompanhada de sangramento intersticial profuso com hemorragia da pele e mucosa. Se ocorrer vazamento para o seio maxilar, o paciente pode relatar um gosto de cloro e irritação na garganta. Finalmente, necrose e infecções secundárias podem se tornar evidentes e outras complicações graves como anestesia ou parestesia podem ser diagnosticadas, como expuseram Bosch-Aranda e colaboradores (2012).

Complicações neurológicas, como parestesia e anestesia são muito raras, mas podem afetar os ramos mental, alveolar inferior e infra-orbital do nervo trigêmeo, e a resolução até a sensação de normalidade pode levar muitos meses, conforme Perotti; Bim; Cecchi (2018), ou ainda evoluir para complicações permanentes nos nervos facial e trigêmeo.

A incidência desses acidentes é rara, conforme relataram Behrents; Speer; Noujeim (2012), mas aumenta quando há necrose pulpar com radiolucidez perirradicular; é mais comum em dentes superiores do que em dentes inferiores e é mais comum em mulheres do que em homens. Postularam ainda que o prognóstico do dente envolvido não é afetado negativamente pelo acidente em si.

Embora a frequência de extrusão de NaOCl para os tecidos periapicais e periorais (0,89%), e a taxa de lesão causada pela extrusão (0,18%) sejam baixas, como informaram Özdemir e colaboradores (2022), os acidentes com hipoclorito de sódio podem levar a resultados pós-operatórios críticos, sendo imprescindível uma avaliação pré-operatória da vitalidade pulpar, estado periapical, controle do comprimento de trabalho do (s) canal (is) tratado (s), concentração da solução, pressão aplicada no êmbolo da seringa de irrigação, movimento livre da agulha ou irrigação com pressão negativa, visando minimizar qualquer contratempo.

O hipoclorito de sódio, é descrito por Sedigh-Shams e colaboradores (2016) como altamente tóxico para os seres vivos, especialmente em altas concentrações. Pode não remover completamente as bactérias e endotoxinas do sistema de canais radiculares, além de estar associado a danos na estrutura do canal radicular durante a instrumentação. Essas características adversas, foco de ensaios na literatura, podem ser ajustados com a adição de enzimas proteolíticas, detergentes ou pela modificação de sua estrutura química e reatividade.

Além disso, Vajrabhaya e colaboradores (2017) concordaram que a desvantagem do NaOCl é o odor do cloro gasoso, que se origina da desintegração do ácido hipocloroso, que pode ser desagradável para o paciente e para a equipe odontológica e propuseram um hipoclorito de sódio que exhibe as mesmas características de dissolução tecidual, efeitos antibacterianos e citotóxicos semelhantes as preparações com o hipoclorito de sódio a 2,5%, sem o odor característico do cloro.

A combinação de NaOCl com outros antimicrobianos em concentrações ideais ou com surfactantes tem sido sugerida para aumentar a eficiência da irrigação. Yanling e colaboradores (2018), portanto, propuseram a adição de relacina ao hipoclorito de sódio a 2,5% em canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis*. Vieira e colaboradores (2018) sugeriram a adição de oleorresinas de *Copaifera duckei* em canais radiculares infectados com *Staphylococcus aureus*, e Nogales e colaboradores (2016) preconizaram a ozonioterapia em associação ao hipoclorito de sódio a 2,5% em canais contaminados com *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*.

3.8 HIDRÓXIDO DE CÁLCIO COMO MEDICAMENTO INTRACANAL

Devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, áreas intocadas pelos instrumentos podem subsistir após o preparo químico-mecânico dos condutos, seguido pela impregnação patogênica. Tal microbioma residual é apontado por Lei e colaboradores (2016) como a principal causa de infecções periapicais persistentes.

A instrumentação do canal radicular com irrigação antimicrobiana apresenta eficiência antimicrobiana em apenas 50-70% para o sistema de condutos radiculares, em conformidade com o que Raof e colaboradores (2019) afirmaram e

recomendando, portanto, o uso de um medicamento intracanal entre sessões no tratamento endodôntico para a erradicação eficaz dos micro-organismos.

Alshanta e colaboradores (2019), caracterizam que as patologias endodônticas possuem origem bacteriana polimicrobiana com amplo espectro de sensibilidade, sendo importante a personalização das condutas. Ajustes terapêuticos para irrigação e ação mecânica se fazem necessários em casos específicos com o prolongamento inflamatório e / ou persistência das lesões.

O hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) foi descrito para aplicação em odontologia por Hermann em 1920, segundo Estrela e colaboradores (2023) e continua sendo um material indicado para o tratamento de infecções de canal radicular, apicificação, tratamento endodôntico regenerativo, reabsorção radicular, entre outras aplicações. As propriedades do Ca(OH)_2 derivam de sua dissociação iônica em íons cálcio e íons hidroxila e a ação desses íons sobre bactérias e tecidos explica suas propriedades antimicrobianas e biológicas.

O Ca(OH)_2 apresenta importante atividade antimicrobiana, propriedades mineralizantes e ação efetiva sobre endotoxinas, sendo, portanto, o medicamento mais utilizado entre sessões da terapia endodôntica, considerado o padrão ouro. (Estrela *et al.*, 2005; Maekawa *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2016; Holland *et al.*, 2017; Raoof *et al.*, 2019; Louzada *et al.*, 2020; Dutta, Maria, 2020; Vasavada, Kapoor, 2020; Sy *et al.*, 2021; Cosan *et al.*, 2022; Katebi *et al.*, 2022).

As ações terapêuticas do Ca(OH)_2 são atribuídas ao pH alcalino entre 12,5 – 12,8, liberação de íons hidroxila, com papel na desnaturação das enzimas bacterianas, além de íons cálcio associado a mineralização tecidual em reflexo a expressão do gene da fibronectina, conforme pautaram Vassavada, Kapoor (2020).

A eficácia do Ca(OH)_2 contra os endopatógenos está relacionada à difusão dos íons hidroxila através do sistema de canais radiculares e túbulos dentinários. Entretanto, Lei e colaboradores em 2016 reportaram que em função da complexa anatomia e capacidade tamponante da dentina, o pH do hidróxido de cálcio pode não ser mantido nas camadas mais profundas dos túbulos dentinários, podendo estar hipotetizado a possível resistência de micro-organismos no interior dos túbulos.

Martinho e colaboradores em 2018 apontaram que os efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio se dão apenas por contato direto com os micro-organismos e é afetado pela baixa solubilidade e difusibilidade, dificultando o alcance em áreas complexas da anatomia do sistema de canais radiculares, como os deltas apicais. Tais limitações, adicionados a alta capacidade tamponante da dentina, reduz a eficácia antimicrobiana, podendo não afetar toda a microbiota endodôntica existente num canal radicular infectado.

As cepas de *E. faecalis* apresentam resistência relativa ao Ca(OH)_2 no interior dos túbulos dentinários, Maekawa e colaboradores (2013) descreveram que bombas de prótons de efluxo na parede celular possibilita a acidificação citoplasmática e resistência a elevação de pH com consequente sobrevivência. Esse mecanismo é limitado a ambientes com pH inferior a 11,5, alcalinização superior está associada a inativação da bomba de prótons e lise bacteriana. Esses autores sugerem que a *C. albicans* resista a pH ácidos e alcalinos por possíveis similaridades metabólicas citadas anteriormente em parede fúngica, além transição morfológica para estruturas de hifas com consequente invasão tecidual e formação de biofilmes em diferentes nichos.

Apesar das ações destacadas do Ca(OH)_2 , Dutta, Maria, (2020) e Katebi e colaboradores (2022) informam que a resistência microbiana ao hidróxido de cálcio não está isolada em possíveis efeitos deletérios. Descrevem a associação a desnaturação do colágeno da dentina, enfraquecimento da porção radicular, descoloração e fraturas do dente, como adjuvantes adversos.

Inúmeros estudos, como apresentados em seguida, têm sido realizados ao longo do tempo visando melhorar as características do hidróxido de cálcio. A associação da clorexidina e do hidróxido de cálcio foi estudada por Maekawa e colaboradores (2011) e por Valverde e colaboradores (2017), e a incorporação de substâncias de origem mineral e vegetal, como nanopartículas de óxido de magnésio (Yousefshahi *et al.*, 2018); paramonoclorofenol canforado (Lei *et al.*, 2016); relacina (Yanling *et al.*, 2018); quitosana (Nunes *et al.*, 2022); extrato de própolis e gengibre (Maekawa *et al.*, 2013); extrato de folha de figueira (Nirwana *et al.*, 2018); nanopartículas de própolis (Parolia *et al.*, 2021) tem aumentado a eficácia, ao menos *in vitro*, dos medicamentos intracanal e ajustado de alguma forma os inconvenientes adversos pelo uso isolado do Ca(OH)_2 .

Outros produtos medicamentosos intracanal, vegetal ou mineral, além de novas tecnologias também têm sido estudados por vários autores como meios para a desinfecção do sistema de canais radiculares. Maekawa e colaboradores (2011) pesquisaram a ação da polimixina B. Nanopartículas de prata foram avaliadas por Yin e colaboradores (2020), González-Luna e colaboradores (2016) e Chávez-Andrade e colaboradores (2019). Nanopartículas de prata e quitosana foram analisadas por Elshinawy e colaboradores (2018). Yadav e colaboradores (2017) estudaram a quitosana. O extrato de aroeira foi investigado por Mattos (2017) e por Bueno e colaboradores (2018). Katebi e colaboradores (2022) exploraram a curcumina e a *Aloe vera*. Terapia fotodinâmica foi examinada por Diogo e colaboradores (2017) e Ahangari e colaboradores (2021). Os diversos tipos de lasers foram averiguados por Hendi e colaboradores (2021) e Wenzler e colaboradores (2021). Todos os estudos obtiveram resultados promitentes na sanificação dos canais radiculares.

3.9 OZÔNIO E OZONIOTERAPIA

A primeira menção ao ozônio foi feita pelo físico holandês Martin van Marun em 1785, entretanto Naik e colaboradores em 2016, afirmaram que foi Christian Friedrich Schonbein em 1840, professor da Universidade de Basel, Suíça, que demonstrou as mudanças nas propriedades do oxigênio com a formação do gás particular chamado ozônio. A palavra ozônio é derivada da palavra grega 'OZEIN' que significa odor e está presente em pequenas quantidades no ar atmosférico.

É um gás cujas moléculas são compostas por três átomos de oxigênio, possui peso molecular de 47,98, é instável com liberação rápida de átomos de oxigênio nascente, apresenta meia-vida de 40 minutos a 20° C e 140 minutos a 0° C, é levemente azulado e tem cheiro característico. De acordo com Lubojanski e colaboradores (2021), está presente na camada de ozônio, sendo um filtro biológico contra a radiação ultravioleta e protetor dos organismos vivos.

O ozônio (O₃) é produzido naturalmente pela fotodissociação do oxigênio molecular (O₂) em átomos de oxigênio ativados, que então reagem com outras moléculas de oxigênio. Esse ânion radical transitório torna-se rapidamente protonado, gerando trióxido de hidrogênio (HO₃), que, por sua vez, se decompõe em um oxidante ainda mais poderoso, o radical hidroxila (OH). Nogales em 2011 declarou que o gás

ozônio tem um alto potencial de oxidação e é 1,5 vezes maior que o cloreto quando usado como agente antimicrobiano.

O ozônio medicinal é uma mistura de oxigênio e ozônio puros na proporção de 0,05% à 5% de O₃ e 99,95% a 95% de O₂. Devido à instabilidade da molécula de O₃, Kumar e colaboradores (2014) declararam que ele deve ser preparado imediatamente antes do uso. Em menos de uma hora depois preparação apenas metade da mistura ainda é ozônio enquanto a outra metade é transformada em oxigênio. Como resultado, é impossível armazenar ozônio por longos períodos de tempo. E para controlar a decomposição do ozônio em oxigênio pode ser associado a um veículo com propriedades aquosas para promover a conversão mais rapidamente ou com um veículo com propriedades mais viscosas para retardar a conversão.

A função do ozônio compartilha semelhanças com a de um pró-fármaco, pois ele se modificada ao reagir com moléculas para criar substratos mais ativos, estimulando uma cascata endógena de respostas. Por outro lado, Smith e colaboradores em 2017, afirmaram que é difícil classificá-lo simplesmente como um pró-fármaco, devido à sua capacidade de interagir diretamente com fosfolipídios, lipoproteínas, envelopes celulares de bactérias e fungos, e capsídeos virais.

Di Mauro e colaboradores (2019) descreveram que os efeitos terapêuticos do ozônio decorrem da sua ação indireta sobre as mais variadas células e órgãos. Tais mecanismos de ação do ozônio envolvem dois processos bioquímicos fundamentais que ocorrem no plasma sanguíneo. Inicialmente uma reação imediata onde o ozônio se dissolve no componente aquoso do plasma sanguíneo, interagindo com ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e água, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) que são inativadas pelo sistema antioxidante endógeno e uma reação tardia onde se forma uma mistura de produtos da peroxidação lipídica (LOP), incluindo radicais lipoperoxil, hidroperóxidos, malonildialdeído, isoprostanos, ozonídeos e alquenais e 4-hidroxinonenal (4-HNE).

Adicionalmente, Inal e colaboradores (2011), elencaram que o estresse oxidativo moderado induzido pela formação de ROS aumenta a ativação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que é responsável por ativar a transcrição dos elementos de resposta antioxidante (ARE). A ativação dos ARE induz a transcrição de uma variedade de enzimas antioxidantes que atuam como

sequestradores de radicais livres clinicamente relevantes para uma ampla variedade de doenças. Os antioxidantes criados incluem a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona S-transferase (GST), catalase (CAT), heme oxigenase-1 (HO-1), NADPHquinona oxidorreductase (NQO-1), proteínas de choque térmico (HSP), enzimas de fase II do metabolismo de drogas, dentre outras.

A terapia com ozônio foi definida por Tiwari e colaboradores (2017) como uma versátil terapia bio-oxidativa, em que oxigênio/ozônio é administrado via gás ou em água ou em base de óleo para obter benefício terapêutico. Dentre as propriedades estão a capacidade imunoestimulante, analgésico, anti-hipóxico, desintoxicante, antimicrobiano, além de ações bioenergéticas e biossintéticas. Apresenta natureza atraumática, indolor, não invasiva, ausência de desconforto e efeitos colaterais com baixa significância, resultando no aumento da aceitabilidade e conformidade do paciente.

O ozônio passou a ser utilizado em Odontologia na década de 1930, quando o dentista Edward Fisch usou a terapia com ozônio para desinfetar e curar feridas em suas cirurgias odontológicas. Atualmente, a ozonioterapia tem mostrado sucesso na cicatrização de feridas, cárie dentária, líquen plano oral, gengivite e periodontite, halitose, osteonecrose da mandíbula, dor pós-cirúrgica, contra placa e biofilmes bacterianos, em canais radiculares, hipersensibilidade dentinária, distúrbios da articulação temporomandibular e clareamento dos dentes como mencionado por Suh e colaboradores (2019).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza o reconhecimento e a incorporação das Medicinas Tradicionais e Complementares, dentre elas, a ozonioterapia, nos sistemas nacionais de saúde. No Brasil, a ozonioterapia está inserida no rol das Práticas Integrativas e Complementares (PICS) do Ministério da Saúde (MS), regulamentada pela Portaria nº 702, de 21 de março de 2018 do MS (PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES (PICS), 2023). Ao cirurgião Dentista, devidamente habilitado com formação em Ozonioterapia aplicada a Odontologia, é permitido a utilização do ozônio com fins de diagnóstico e terapêutica, autorizada pela Lei nº 14.648 de 04 de agosto de 2023 e regulamentada pela Resolução do Conselho Federal de Odontologia - 166/2015 (RESOLUÇÃO CFO-166, 2015; BRASIL, 2023).

Devido às suas múltiplas atividades biológicas, o ozônio tem sido estudado como coadjuvante na prática médica e odontológica nas últimas duas décadas. Em Endodontia, a utilização do ozônio vem sendo relatada com resultados promissores, entretanto alguns questionamentos devem ser avaliados (Hubbezoglu *et al.*, 2014; Boch *et al.*, 2016; Nogales *et al.*, 2016; Kist *et al.*, 2017) como a caracterização da atividade antimicrobiana, a posologia, a dose efetiva, o volume aplicado e a efetividade dos produtos ozonizados.

Sen, Sen em 2020 declararam que o ozônio leva à destruição dos micro-organismos principalmente por danos à membrana citoplasmática das células como consequência da ozonólise e, em segundo lugar, por alterações no conteúdo intracelular devido ao efeito oxidante secundário que leva à perda de função das organelas. Aqueles autores relataram que a ação anti-oxidante próprias das células animais não permite que estas sejam danificadas, assim a atividade oxidante do ozônio permanece inespecífica e seletiva para as células microbianas.

Avaliando o efeito do ozônio gasoso no tratamento de canal radicular infectado de pacientes humanos, Ajeti e colaboradores (2018) afirmaram que o ozônio tem alto poder antimicrobiano sem promover resistência dos microrganismos; estimula a imunidade celular, humoral, proliferação de células imunocompetentes, a síntese de imunoglobulinas e ativação de macrófagos. Resultados promissores na atividade antimicrobiana estão na associação do ozônio gasoso com o hipoclorito de sódio a 2,5% comparado com o hipoclorito de sódio a 0,9% e com a clorexidina a 2% e a 2,5%.

Em um estudo de eficácia antimicrobiana da ozonioterapia gasosa e aquosa em dentes contaminados com *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphilococcus aureus*, Nogales e colaboradores em 2016, afirmaram que o efeito antimicrobiano do ozônio se dá pela produção de radicais livres, como oxigênio nascente, peróxido de oxigênio e ânion superóxido. Descreveram que a melhor concentração para atingir a eficácia antimicrobiana foi de 40 µg/ml para o ozônio gasoso e 8 µg/ml para água ozonizada.

Avaliando a atividade antimicrobiana da água ozonizada em canais radiculares com curvatura severa de molares inferiores contaminados com *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, Pinheiro e

colaboradores (2018), observaram redução do biofilme bacteriano de 98,02% e mencionaram que o ozônio em fase aquosa induz a destruição das paredes celulares bacterianas, membrana citoplasmática, glicoproteínas, glicolipídios e aminoácidos bacterianos, um importante desinfetante, portanto, no tratamento endodôntico.

Anzolin, Silveira-Kaross, Bertol (2020) apresentam o ozônio com veículo oleoso para obtenção de formulações mais estáveis, fácil manuseio, melhor armazenamento, permitir tratamento extra-hospitalar e reduzir o risco na forma gasosa, em doses altas e inadequadas. Em óleo, o ozônio reage com as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados presentes nos óleos vegetais, formando ozonídeos (1, 2, 4 – trioxolanos) e peróxidos (hidroperóxidos, peróxido de hidrogênio e peróxidos poliméricos). Esses compostos são caracterizados por Elshinawi e colaboradores em 2018 como base para o efeito do óleo de oliva ozonizado contra patógenos persistentes em tratamentos endodônticos. Observaram naquele estudo que a ozonioterapia alcançou a eliminação dos micro-organismos do biofilme bacteriano de *E. faecalis*, *S. mutans* e *C. albicans* em menor tempo que a ação intracanal usual com hidróxido de cálcio.

As quantidades e proporção destes compostos formados na ozonólise das soluções vegetais oleosas, dependem conforme Radzimierska-Kazmierczak e colaboradores em 2021, além do número de ligações duplas carbono-carbono dos ácidos graxos insaturados, do tempo de ozonização, da temperatura do processo e do tipo de reator, produzindo óleos com índice de peróxidos mais elevado e maior atividade antibacteriana.

A atividade antimicrobiana do ozônio, para Silva e colaboradores (2020) se dá por ação inespecífica pela oxidação dos fosfolipídios e das lipoproteínas do envelope da célula bacteriana, irrompendo a integridade citossólica e pelo bloqueio da função enzimática ao clivar glicoproteínas e glicolipídios. Esses autores relatam que para os óleos ozonizados, o valor do peróxido representa a medida essencial para estabelecer a dose terapêutica, pois mede a quantidade dos principais produtos da ozonização.

Santa-Rosa e colaboradores em 2019 reportam que a ação antimicrobiana do óleo de girassol ozonizado, ocorre pela alteração nos ácidos graxos poli-insaturados da parede bacteriana, pela oxidação no protoplasma bacteriano, de nucleosídeos e aminoácidos, tornando-se microbicida, bactericida, fungicida e parasiticida. Informam,

além disso, ação anti-inflamatória e analgésica associada a melhora da oxigenação celular e reparo tecidual.

A presença de ozonídeos formados em reações de ozonização de óleos brasileiros são caracterizados por Díaz e colaboradores (2021) como moléculas chave na ação contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Relataram que os produtos produzidos por esse processo têm baixo impacto ambiental, não estão associados a resistência bacteriana e contribuem para o pilar científico de novos compostos bactericidas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo analítico observacional experimental *ex-vivo*.

4.1 PRODUTOS TESTADOS

a. Óleo de girassol ozonizado, com índice de peróxido igual a 505,82 meq/kg (mmol-equiv/kg), fabricado por Philozon Indústria e Comércio de Geradores de Ozônio Ltda (Balneário Camboriú - Santa Catarina, Brasil);

b. Azeite de oliva ozonizado, com índice de peróxido de 377,6 meq/kg (mmol-equiv/kg) fabricado por Philozon Indústria e Comércio de Geradores de Ozônio Ltda (Balneário Camboriú - Santa Catarina, Brasil);

c. Hidróxido de cálcio a 50% em propilenoglicol (Elementar, Farmácia de manipulação, Salvador - Bahia, Brasil);

d. Hipoclorito de sódio a 2,5% (Asfer – Industria Química Ltda, São Caetano do Sul – São Paulo, Brazil);

e. Água ozonizada, a 8 µg/ml – produzida em aparelho de ozônio Philozon Indústria e Comércio de Geradores de Ozônio Ltda (Balneário Camboriú - Santa Catarina, Brasil);

f. Solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril (controle).

4.2 GERAÇÃO DA ÁGUA DE OZÔNIO

A produção da água ozonizada, seguiu o protocolo recomendado por Viebahn-Haensler em 2007, com algumas modificações (Nogales, Ferreira, Lago-Marques, 2014). A partir de litro de água bidestilada, estéril e resfriada a 14^o C, foi recolhido 250 mL, em seguida colocado na torre de água (Philozon Industria e Comercio de Geradores de Ozônio Ltda) conectada ao gerador de ozônio (Figura 1, pág. 56) com fornecimento equivalente a 40 µg/ml de ozônio por cinco minutos para gerar água ozonizada a 8 µg/mL. Foi gerado água de ozônio separadamente para cada micro-organismo estudado.

Figura 1 - Gerador de ozônio e Torre de água



4.3 SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

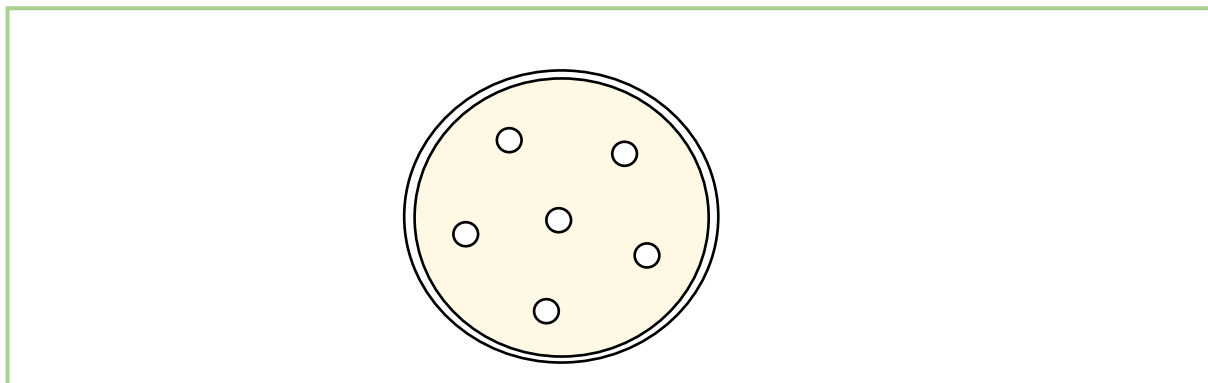
Cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29.212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6.538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853 e *Candida albicans* ATCC 10.231, obtidas do Laboratório de Imunorregulação da UNEB, coordenado pelo Prof. Dr. Bruno Cerqueira. As culturas bacterianas foram semeadas em ágar sangue Mueller-Hinton e o fungo em ágar Sabouraud seguida de incubação em estufa (Olidéf CZ, Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil) a 37°C por 24 horas.

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS (TSA)

O teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) em placa de ágar dos produtos testados seguiu a metodologia sugerida por Pietrocola e colaboradores (2018), em que poços equidistantes de 5 mm foram feitos no ágar, com cânula de metal estéril, para receber os medicamentos experimentais (Figura 2, pág. 57). Após o crescimento bacteriano, foram preparadas suspensões em tubos contendo 5 ml de solução salina esterilizada até a obtenção de turvação compatível com o grau 0,5 da escala McFarland, correspondente a aproximadamente 10^8 UFC/mL para *Escherichia coli*. Em seguida um *swab* estéril foi embebido na suspensão de cada tubo,

comprimindo-o contra as paredes do tubo para remover o excesso da suspensão e semeado de forma suave em todas as direções (técnica de semeadura *spread-plate* ou distensão) em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, para as bactérias e ágar Sabouraud para a levedura.

Figura 2 - Ilustração da placa de ágar com os poços perfurados:



Inicialmente foi realizado os testes de susceptibilidade do óleo de girassol e azeite de oliva *in natura* e ozonizados para determinar a existência de atividade antimicrobiana dos óleos sem ozônio (placas de ágar com cinco furos). Foram dispensados com micropipetas, em cada poço, 10 μ L de cada óleo e de solução salina estéril.

Para avaliar os produtos experimentais, em placas com ágar Mueller-Hinton e Sabouraud previamente perfuradas (placas de ágar com 6 furos), foi semeado o inóculo de cada suspensão microbiana em todas as direções, cobrindo toda a superfície das placas. Após cinco minutos de absorção da suspensão com microorganismos pelo ágar, foi aplicado em cada um dos poços, distintamente, 10 μ L do óleo de girassol ozonizado, do azeite de oliva ozonizado, do hidróxido de cálcio a 50%, do hipoclorito de sódio a 2,5%, da água de ozônio a 8 μ g/mL e da solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril, e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 18-24 horas. Após a incubação, os halos de inibição formados foram medidos e comparados a padrões pré-estabelecidos para a determinação de susceptibilidade ou resistência dos microrganismos aos produtos testes. O experimento foi realizado em triplicata.

4.5 PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA O TESTE DE CONTATO DIRETO

Os protocolos foram adaptados de Mattos (2017) em conjunto às diretrizes do Comitê de Padronização de Laboratórios Clínicos (CLSI).

Foram utilizados 28 (vinte e oito) pré-molares inferiores humanos, unirradiculares e com um único conduto, comprovado com radiografias no sentido méso-distal das raízes (Figuras 3 – 5, pág. 58), cedidos pelo Biobanco de Dentes Humanos da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS Resolução CONSEPE 100/2009 de 23 de agosto de 2009). Todo o experimento foi realizado em triplicata, perfazendo um total de 84 dentes. Os elementos extraídos tiveram suas superfícies externas limpas e foram conservados em solução aquosa de timol a 0,1% a 9°C, para evitar a proliferação bacteriana e fúngica, até a realização do experimento. Antes da manipulação, os espécimes foram esterilizados em autoclave por 121°C por 15 minutos, seguido de incubação a 37^o C por 07 (sete) dias em soro fisiológico.

Figuras 3 – 5 - Presença de canal único de pré-molares inferiores humanos.



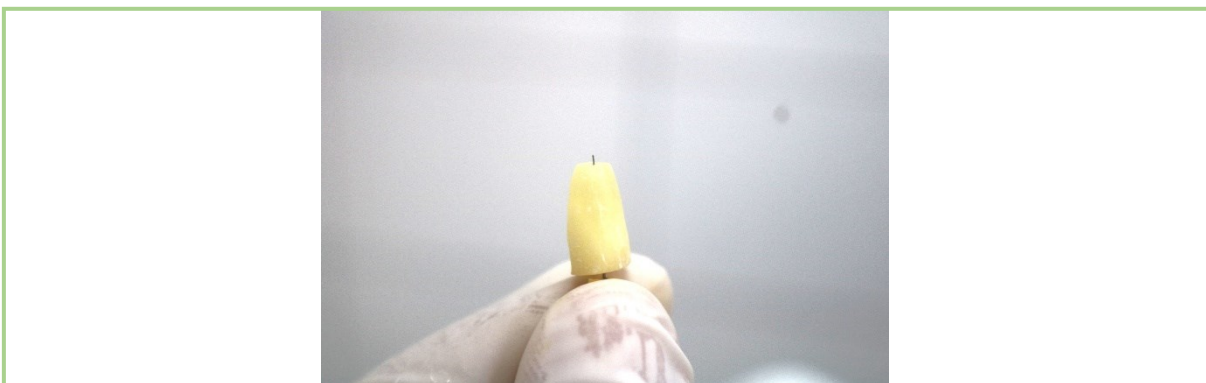
Os dentes tiveram suas coroas cortadas junto a união cimento-esmalte com disco Carburundum (Dentorium Products Co. Inc., Nova York – Nova York, EUA), acoplado em um madril em um micromotor de baixa rotação (KaVo, Curitiba – Paraná, Brasil) sob refrigeração de água (Figuras 6 e 7, pág. 59), para a padronização dos espécimes em 14 mm de comprimento.

Figuras 6 e 7 - Remoção das coroas dos dentes com disco específico.



Cada canal radicular foi explorado por uma lima K-files (Dentsply-Maillefer®, Ballaigues, Suíça), de aço inoxidável número 10, em toda a sua extensão até que a ponta da lima fosse detectada no forame apical (Figura 8, pág. 59). A partir deste comprimento, o instrumento foi recuado um milímetro para determinação do comprimento de trabalho. A técnica coroa ápice foi usada para a instrumentação químico-mecânica, auxiliada por brocas Gates-Gliden número 1, 2 e 3 (Dentsply Sinora, Charlotte, Carolina do Norte, EUA), e estabelecido matriz apical de diâmetro aproximado do instrumento número 45. Para a irrigação dos canais, utilizamos 3 mL de hipoclorito de sódio a 2,5% entre cada instrumento introduzido nos canais. Ao finalizar a instrumentação, 3 mL de EDTA a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica, Ibiporã – Paraná, Brasil) foram inseridos em cada canal por 3 minutos para a remoção da camada residual, novamente com 3 mL de hipoclorito de sódio a 2,5% e finalizando com 3 mL de Tergensol (Inodon, Ponta Grossa - Paraná, Brasil) para a lavagem final.

Figura 8 - Instrumento no forame apical.



Os ápices radiculares foram vedados com resina fotopolimerizável (Fill Magic – Coltene, Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, Brasil), em seguida as raízes receberam impermeabilização externa com duas camadas de esmalte de unha (Risqué, São Paulo – São Paulo, Brasil), em toda sua extensão radicular, exceto a porção coronária, respeitando o tempo de 30 minutos entre as aplicações (Figura 9, pág. 60). Ao final, as amostras foram novamente autoclavadas a 121°C por 15 minutos e imersas em um recipiente estéril com soro fisiológico por sete dias para hidratação.

Figura 9 - Impermeabilização com esmalte na superfície externa das raízes.



4.6 INCLUSÃO DOS DENTES EM PLACAS DE POLIESTIRENO

As amostras foram transferidas, com auxílio de uma pinça, para placas de Petri esterilizadas contendo papel filtro para a secagem. Os espécimes foram distribuídos, de forma aleatória, em quatro placas de poliestireno para cultura de células de 24 poços, com 7 espécimes em cada placa, dispostos de modo alternado e intercalado (Figura 10, pág. 61). A porção apical (aproximadamente 5 mm) de cada espécime foi fixada com resina acrílica quimicamente ativada (Jet – Clássico, Campo Limpo Paulista – São Paulo, Brasil). Em seguida as placas foram esterilizadas em óxido de etileno para a eliminação de contaminação pela manipulação dos dentes e da placa (Figura 11, pág. 61).

Figura 10 – Placa modelo para cultura celular com os dentes fixados em resina acrílica.

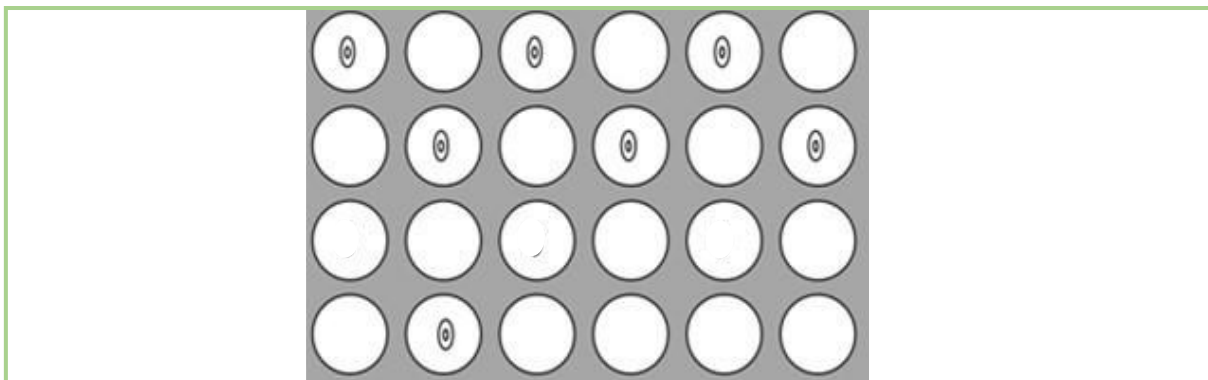


Figura 11 - Inclusão dos dentes nas placas de poliestireno.



4.7 DIVISÃO EM GRUPOS PARA O TESTE DE CONTATO DIRETO

Cada uma das placas com sete dentes cada foi contaminada com um dos seguintes micro-organismos:

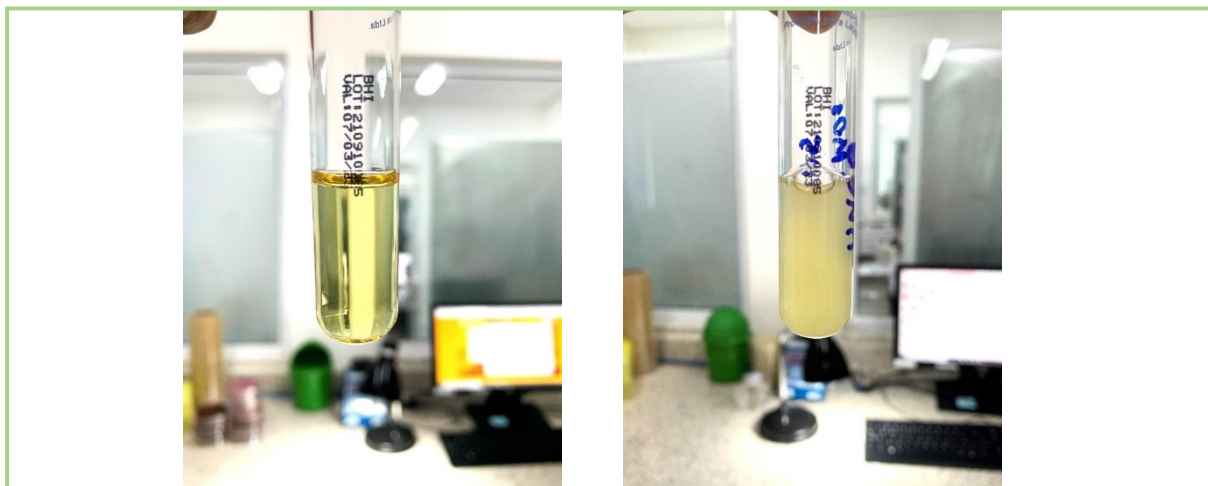
1. Grupo 1 – *Candida albicans*;
2. Grupo 2 – *Staphylococcus aureus*;
3. Grupo 3 – *Enterococcus faecalis* e
4. Grupo 4 – *Pseudomonas aeruginosa*.

4.8 REPARO DO INÓCULO

As sementeiras foram realizadas em 4 tubos de ensaio contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion, Laborclin, Pinhais - Paraná, Brasil) com cepas teste, colhidos em alça bacteriológica estéril e incubados por 24 horas em estufa biológica a 37°C.

Após a incubação e comprovação da turvação do caldo, uma alíquota da suspensão microbiana foi diluída em caldo BHI até obter turbidez (Figuras 12 e 13, pág. 62).

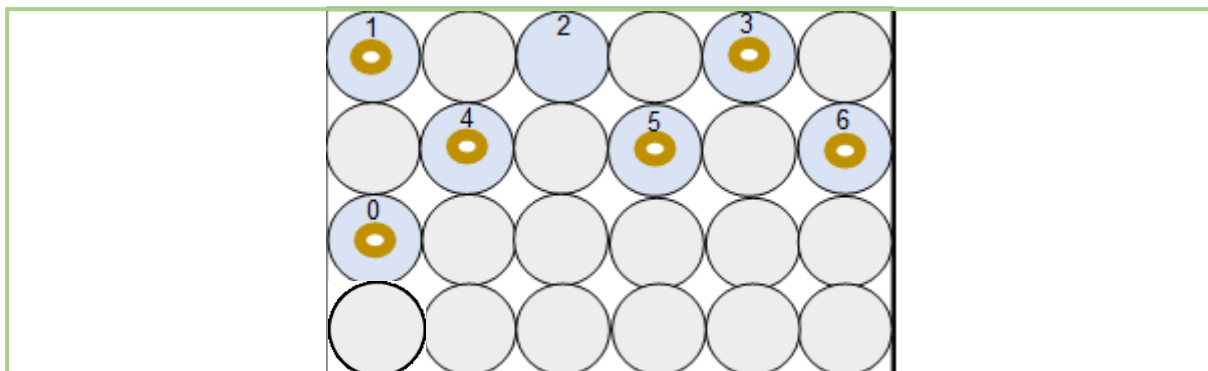
Figuras 12 e 13 – Turvação em caldo a 0,5 da escala McFarland antes e após inoculação do meio de cultura.



4.9 CONTAMINAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Os procedimentos a seguir foram realizados em cabine de segurança bacteriológica. Com o auxílio de uma micropipeta, foram injetados 10 μ L do meio de cultura BHI contendo a preparação com os micro-organismos, dentro do sistema de canais radiculares de seis dentes. Um dos dentes não recebeu micro-organismos sendo caracterizado como controle negativo. Um instrumento endodôntico estéril número 35 foi introduzido para a eliminação de possíveis bolhas de ar dentro do canal e uma pequena bola de algodão estéril, embebida com o meio de cultura, foi colocada na entrada de cada amostra. Os poços dos dentes foram preenchidos com solução salina estéril até um milímetro aquém da borda de cada dente. Os dentes 0 (zero) foram preenchidos apenas com meio de cultura. Nos poços vazios, depositou-se 200 μ L de água destilada estéril para assegurar a umidade da placa (Figura 14, pág. 63). Em seguida, as tampas das placas foram vedadas e os conjuntos armazenados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Figura 14 - Esquema ilustrativo das placas com os dentes enumerados.



4.10 CONFIRMAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO

Após 24 horas, em um dente escolhido aleatoriamente de cada placa, foi inserido, com pinça estéril, uma ponta de papel absorvente estéril (Dentsply Sinora, Charlotte, Carolina do Norte, EUA) número 35 por um minuto, removido e colocado em tubos de ensaio contendo um mL de caldo BHI para a comprovação da contaminação dos dentes, por turvação do meio. Em seguida 10 µL do meio de cultura foi dispensado em cada dente para manter a viabilidade microbiana e a umidade, novamente vedados com *pallets* de algodão estéreis e incubados a 37°C por 24 horas.

4.11 TESTE DE CONTATO DIRETO EM DENTES *EX-VIVO*

Após o período de 48 horas de crescimento bacteriano e formação de biofilme bacteriano, na cabine de segurança biológica, os dentes das placas tiveram as *pallets* de algodão removidas, irrigados com um mL de solução salina estéril por meio de seringa de insulina, secos com pontas de papel absorvente estéril e receberam, com micropipetas, 10 µL dos medicamentos testados:

Dente 1 – Solução de cloreto de sódio à 0,9% estéril;

Dente 2 – Óleo de girassol ozonizado;

Dente 3 – Azeite de oliva ozonizado;

Dente 4 – Hidróxido de cálcio à 50%;

Dente 5 – Hipoclorito de sódio à 2,5% e

Dente 6 – Água ozonizada à 8 µL/mL.

O controle negativo descrito como Dente 0 não recebeu medicamentos teste. Em seguida, todos os dentes receberam novos *pallets* de algodão estéreis embebidas com o meio BHI, nos poços dos dentes foram recolocados solução salina, enquanto nos poços vazios apenas água destilada. As placas foram então tampadas e os conjuntos retornaram para a estufa bacteriológica por 24 horas.

4.12 COLETA DAS AMOSTRAS E ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Decorridos 24 horas, os *pallets* de algodão foram removidos, um mL de solução salina lavou cada um dos condutos e um cone de papel absorvente nº 45 foi introduzido por um minuto para a secagem e remoção dos medicamentos. Em seguida, 20 µL de BHI foi colocado nos canais para a lavagem final. Uma lima endodôntica nº 35 estéril foi passada levemente para auxiliar o desprendimento de possíveis medicamentos e micro-organismos presos nas paredes internas dos condutos radiculares. Logo a seguir, 10 µL desse caldo foi colhido e semeado por estriamento em placas tripartite de ágar sangue, para as bactérias e ágar Sabouraud para as cepas de *Candida*. Passados cinco minutos para o ágar absorver o caldo dispensado, as placas foram levadas para a estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após a incubação, foi feita a avaliação do crescimento de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada um dos dentes.

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados obtidos foram inseridos no software EXCEL (Microsoft Office 2010 Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA) para a realização das análises iniciais. Os valores foram então repassados para o programa estatístico SPSS 21 (IBM, New York, EUA) para realização das análises estatísticas. A distribuição Gaussiana foi caracterizada pelo teste Shapiro-Wilk e análise de achatamento e simetria da distribuição. Para comparação entre medicamentos, foram realizados testes de Mann-Whitney. O nível de significância de 0,05 para os testes realizados.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) EM POÇOS

Os testes de difusão dos medicamentos em poços nas placas de ágar foram realizados inicialmente apenas com os óleos *in natura* e óleos ozonizados. Após o período de 24 horas de incubação das placas, os halos de inibição de crescimento foram medidos e fotografados, e são expostos nas figuras 15, 16, 17 e 18.

Figura 15, 16, 17 e 18 - Teste de difusão em placa após 24 horas dos óleos *in natura* e óleos ozonizados.

Figura 15: *Candida albicans*.

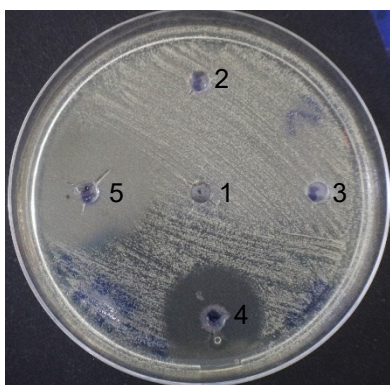


Figura 16: *Staphylococcus aureus*.

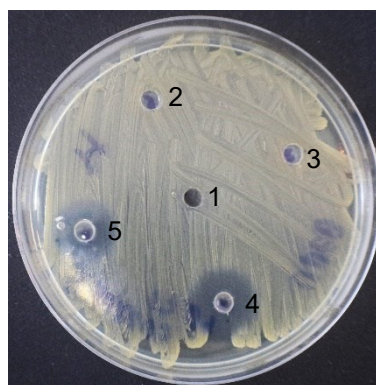
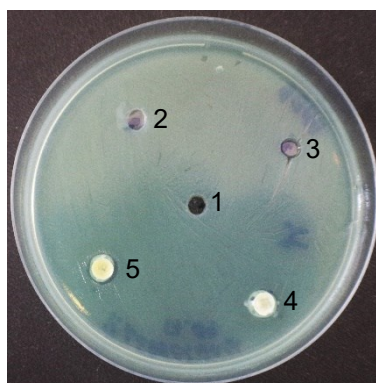


Figura 17: *Enterococcus faecalis*.



Figura 18: *Pseudomonas aeruginosa*.



1 – Solução Salina de cloreto de sódio a 0,9%, 2 – Óleo de girassol *in natura*, 3 – Azeite de oliva *in natura*, 4 – Óleo de girassol ozonizado, 5 – Azeite de oliva ozonizado.

Após a comprovação da inexistência de atividade antimicrobiana inerente aos óleos, realizou-se o teste de sensibilidade dos medicamentos experimentais contra os micro-organismos em poços nas placas de ágar Mueller-Hinton e Sabouraud. Os resultados são apresentados nas Figuras 19, 20, 21 e 22 e na Tabela 1.

Figuras 19, 20, 21 e 22 - Teste de sensibilidade a medicamentos em poços de placas de ágar MH e Sabouraud.

Figura 20: *Candida albicans*.

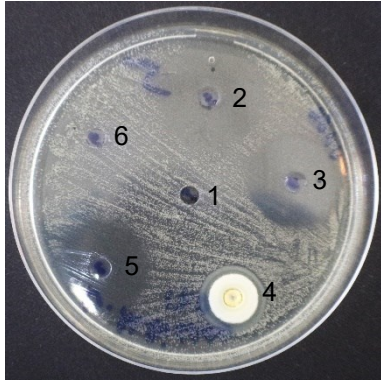


Figura 21: *Staphylococcus aureus*.

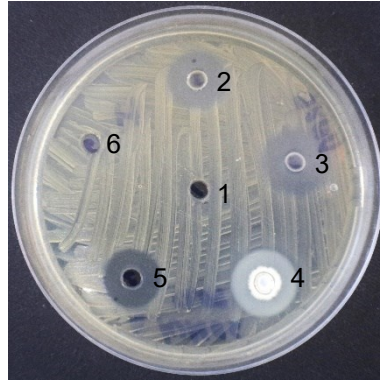


Figura 22: *Enterococcus faecalis*.

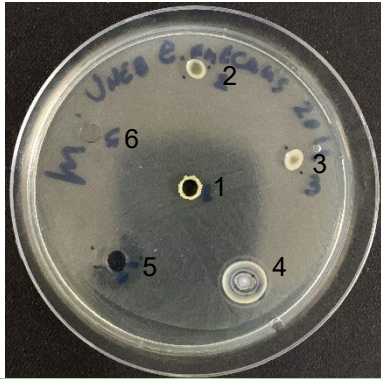
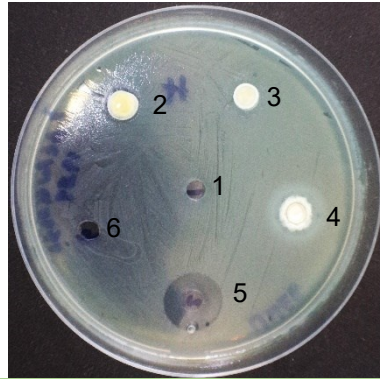


Figura 23: *Pseudomonas aeruginosa*.



1 – Salina estéril; 2 – Óleo de girassol ozonizado; 3 – Azeite de oliva ozonizado; 4 – hidróxido de cálcio a 50%; 5 – hipoclorito de sódio a 2,5%; 6 – Água ozonizada a 8 µg/ml.

Tabela 1 – Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos, valor da mediana e intervalo interquartis, valor da assimetria e curtose dos halos de inibição dos medicamentos testados.

Micro-organismo	Medicamento	Q 25	Mediana	Q 75	Assimetria	Kurtosis
<i>Candida albicans</i>	SAL	0,00	0,00	0,00	-	-
	OG	0,00	0,00	0,00	-	-
	AZ	0,00	0,00	0,00	-	-
	OGO	19,00	20,00	22,00	0,000	-2,299
	AZO	20,00	21,00	23,00	-0,075	-1,550
	HC	8,00	12,00	15,00	-0,778	-1,680
	HS	31,00	38,00	40,00	-0,857	-1,752
	AGO	0,00	0,00	0,00	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-
	SAL	0,00	0,00	0,00	-	-
	OG	0,00	0,00	0,00	-	-
	AZ	0,00	0,00	0,00	-	-
	OGO	9,00	12,00	14,00	-0,585	-1,550
	AZO	12,00	14,00	15,00	-0,418	-0,859
	HC	8,00	10,00	12,00	-0,362	-2,103
	HS	10,00	15,00	16,00	-0,716	-1,481
<i>Enterococcus faecalis</i>	AGO	0,00	0,00	0,00	-	-
	-	-	-	-	-	-
	SAL	0,00	0,00	0,00	-	-
	OG	0,00	0,00	0,00	-	-
	AZ	0,00	0,00	0,00	-	-
	OGO	8,00	10,00	11,00	0,000	-0,300
	AZO	8,00	10,00	11,00	0,383	-1,481
	HC	8,00	10,00	11,00	-0,668	-0,446
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HS	12,00	13,00	14,00	0,668	-0,446
	AGO	0,00	0,00	0,00	-	-
	-	-	-	-	-	-
	SAL	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	OG	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	AZ	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	OGO	10,00	13,00	17,00	0,354	-1,721
	AZO	8,00	12,00	19,00	0,723	-1,841
HC	8,00	9,00	10,00	0,000	-1,875	
HS	14,00	21,00	25,00	1,371	1,447	
AGO	0,00	0,00	0,00	0,00	-	

SAL: solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril, OG: óleo de girassol *in natura*, AZ: azeite de oliva *in natura*, OGO: óleo de girassol ozonizado. AZO: azeite de oliva ozonizado, HC: hidróxido de cálcio, HS: hipoclorito de sódio, AGO: água ozonizada.

Os halos de inibição formados pelos óleos ozonizados contra a *C. albicans* exibiram valores semelhantes entre si (OGO = 20 mm e AZO = 21 mm), superiores ao diâmetro do halo formado pelo hidróxido de cálcio (13 mm, $p = 0,002$), e se mostraram inferiores a zona de inibição apresentada pelo hipoclorito de sódio (38 mm, $p = 0,002$).

Os valores dos halos de inibição dos medicamentos experimentais para o *S. aureus* mostraram-se semelhantes para o óleo de girassol e o azeite de oliva ozonizados (respectivamente 12 mm e 14 mm) e sem diferenças para o halo de inibição formado pelo hipoclorito de sódio, 15 mm ($p = 0,132$ e $p = 0,818$). O hidróxido de cálcio exibiu halo de 10 mm, estatisticamente menor que o azeite de oliva ozonizado e o hipoclorito de sódio ($p = 0,004$).

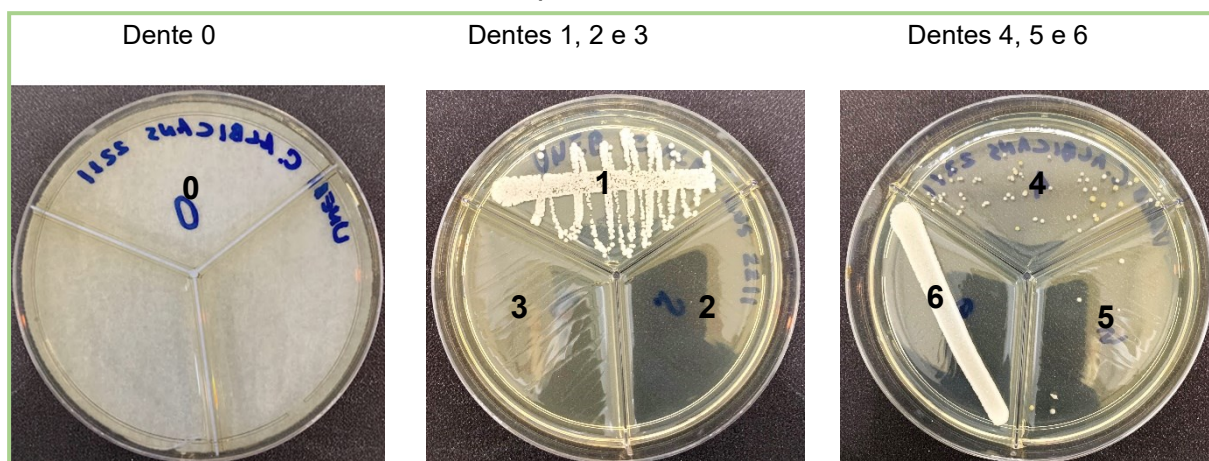
Frente a cepa de *E. faecalis*, os produtos experimentais mostraram valores de halo de inibição para os óleos ozonizados e o hidróxido de cálcio de 10 mm. O hipoclorito de sódio apresentou halo de inibição maior (13 mm) que àqueles observado para os outros medicamentos experimentais ($p = 0,004$).

Para o desafio com *P. aeruginosa*, os óleos ozonizados e o hidróxido de cálcio exibiram valores, respectivamente, 13 mm, 12 mm e 9 mm. O hipoclorito de sódio apresentou halo de inibição (21 mm). Os halos de inibição dos óleos ozonizados não apresentaram diferenças estatísticas frente ao hidróxido de cálcio ($p = 0,180$), nem frente ao hipoclorito de sódio ($p = 0,132$).

5.2 TESTE DE CONTATO DIRETO EM DENTES *EX-VIVO*

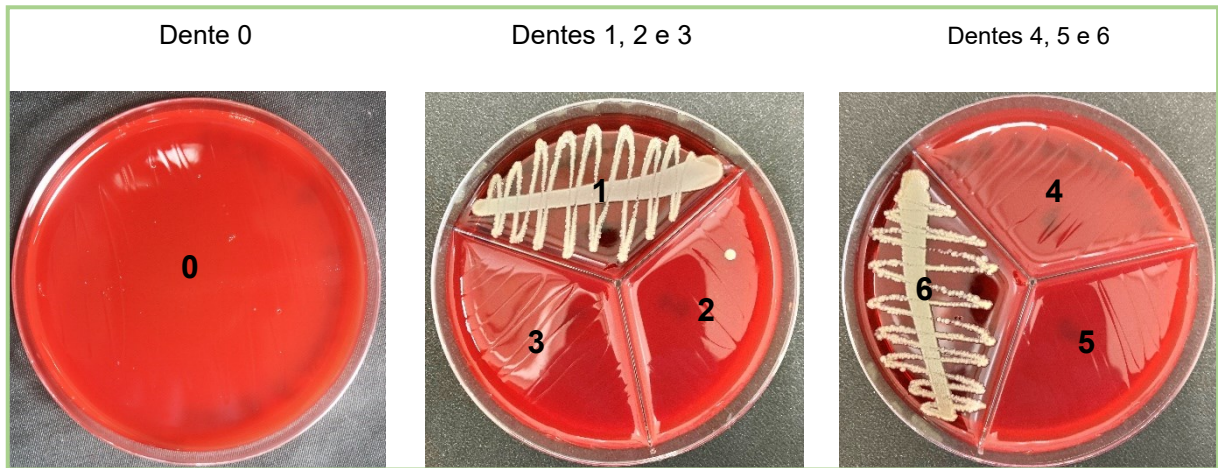
O teste de crescimento microbiano nas placas de ágar sangue e ágar Sabouraud após inoculação com 10 μ L da solução de cada dente submetidos aos medicamentos experimentais são apresentados nas Figuras 24, 25, 26 e 27 e Tabela 2.

Figura 24 – Desafio das cepas de *Candida albicans* em placas de ágar Sabouraud com os medicamentos experimentais.



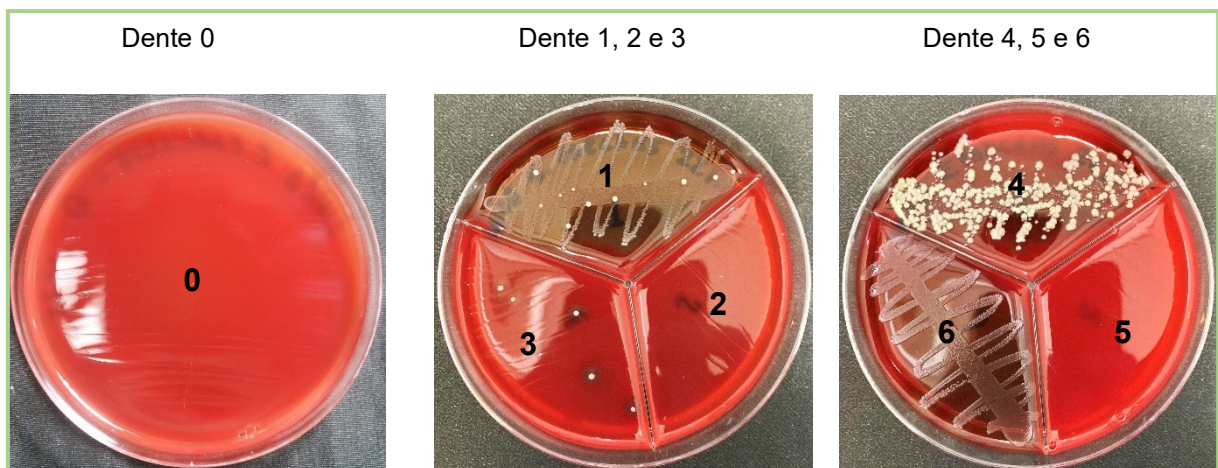
Dente 0 – Controle negativo; Dente 1 – Salina estéril (Controle positivo); Dente 2 – Óleo de girassol ozonizado; Dente 3 – Azeite de oliva ozonizado; Dente 4 – hidróxido de cálcio a 50%; Dente 5 – hipoclorito de sódio a 2,5%; Dente 6 – Água ozonizada a 8 μ g/ml.

Figura 25 - Placas de ágar sangue com cepas de *Staphylococcus aureus*, desafiadas pelos medicamentos experimentais.



Dente 0 – Controle negativo; Dente 1 – Salina estéril (Controle positivo); Dente 2 – Óleo de girassol ozonizado; Dente 3 – Azeite de oliva ozonizado; Dente 4 – hidróxido de cálcio a 50%; Dente 5 – hipoclorito de sódio a 2,5%; Dente 6 – Água ozonizada a 8 µg/ml.

Figura 26 - Placas de ágar sangue com cepas de *Enterococcus faecalis*, desafiadas com os medicamentos experimentais.



Dente 0 – Controle negativo; Dente 1 – Salina estéril (Controle positivo); Dente 2 – Óleo de girassol ozonizado; Dente 3 – Azeite de oliva ozonizado; Dente 4 – hidróxido de cálcio a 50%; Dente 5 – hipoclorito de sódio a 2,5%; Dente 6 – Água ozonizada a 8 µg/ml.

Figura 27 - Placas de ágar sangue com cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, desafiadas com os medicamentos experimentais.



Dente 0 – Controle negativo; Dente 1 – Salina estéril (Controle positivo); Dente 2 – Óleo de girassol ozonizado; Dente 3 – Azeite de oliva ozonizado; Dente 4 – hidróxido de cálcio a 50%; Dente 5 – hipoclorito de sódio a 2,5%; Dente 6 – Água ozonizada a 8 µg/ml.

Tabela 2 - Percentual de eliminação das cepas testadas com os medicamentos experimentais em contato direto.

Micro-organismo	SAL	OGO	AZO	HC	HS	AGO
<i>C. albicans</i>	0,0%	99,8%	99,9%	96,6%	99,4%	0,0%
<i>S. aureus</i>	0,0%	99,8%	99,9%	98,5%	100%	0,0%
<i>E. faecalis</i>	0,0%	100%	99,8%	99,9%	100%	0,0%
<i>P. aeruginosa</i>	0,0%	99,3%	99,6%	98,9%	99,8%	0,0%

SAL – Salina estéril; OGO – Óleo de girassol ozonizado; AZO – Azeite de oliva ozonizado; HC – hidróxido de cálcio a 50%; HS – hipoclorito de sódio a 2,5%; AGO – Água ozonizada a 8 µg/ml.

Os resultados do experimento em contato direto mostraram altos valores de eliminação de micro-organismos (Tabela 2). Para a cepa de *C. albicans*, redução de 99,8% frente ao óleo de girassol ozonizado, 99,9% para o azeite de oliva ozonizado, 96,6% para o hidróxido de cálcio a 50% e 99,4% para o hipoclorito de sódio a 2,5%. As cepas de *S. aureus* foram eliminadas em 99,8% com o uso do óleo de girassol ozonizado, 98,9% com o azeite de oliva ozonizado, 98,5% com o hidróxido de cálcio a 50%, 100% com o hipoclorito de sódio a 2,5%. O isolado de *E. faecalis* redução de 99,8% e 99,9% para o azeite de oliva ozonizado e o hidróxido de cálcio a 50%, respectivamente e eliminação completa (100%) para o óleo de girassol ozonizado e o hipoclorito de sódio a 2,5%. A *P. aeruginosa* apresentou sensibilidade de 99,3% e 99,6% para os óleos ozonizados, 98,9% para o hidróxido de cálcio a 50% e 99,8% para o hipoclorito de sódio a 2,5%.

6 DISCUSSÃO

As infecções endodônticas são decorrentes da colonização do sistema de canais radiculares por diferentes tipos de microrganismos, causando segundo Tibúrcio-Machado e colaboradores em 2021, a periodontite apical, que é a resposta inflamatória relacionada a patógenos e suas toxinas que ocupam o sistema de canais radiculares. Naquela meta-análise, esses autores reportaram que 52% da população mundial adulta tem pelo menos um dente com periodontite apical. A persistência da infecção bacteriana após o preparo do canal radicular, compromete o sucesso da terapia endodôntica, podendo duplicar o índice de insucesso do tratamento endodôntico e dificultar o reparo do tecido periapical, conforme atestaram Santos-Junior e colaboradores em 2019.

Apesar de todo aprimoramento do preparo biomecânico dos condutos radiculares com instrumentos de níquel-titânio, ultrassom e laserterapia, associados a soluções irrigantes, Prada e colaboradores (2019b) relataram que 35 a 53% das paredes do canal radicular permanecem sem serem tocadas pelas limas. Em tais locais intocados no interior do sistema de canais radiculares ou ainda no biofilme apical, Holland e colaboradores (2017) afirmaram que micro-organismos podem sobreviver e se proliferar. Tais bactérias residuais ou persistentes influenciam o resultado do tratamento endodôntico por suportarem longos períodos de privação de nutrientes e se adaptarem às novas condições ecológicas do canal radicular obturado, e se obtiverem nova rota de nutrição, voltam a se multiplicar, atingem número crítico e liberam fatores de virulência que, expressos no ambiente apical, modifica-o e sustenta a inflamação nos tecidos perirradiculares, como asseguraram Siqueira Jr e colaboradores em 2018.

Embora a instrumentação dos canais radiculares possa ser considerada de maior importância na prática clínica, sendo responsável pela redução de até 94% da carga microbiana presente nos canais radiculares infectados, Martinho e colaboradores em 2017 declararam que o uso de medicamento intracanal tem demonstrado otimizar a desinfecção do canal radicular, contribuindo para a redução do conteúdo microbiano, chegando a 99,98% de eliminação de bactérias em canais infectados. Nosso experimento utilizou o hipoclorito de sódio, que em termos de eficiência antimicrobiana imediata continua sendo o irrigante padrão-ouro, de acordo

com Prada e colaboradores em 2019, e o hidróxido de cálcio, que é o medicamento intracanal mais amplamente difundido conforme Katebi e colaboradores em 2022. Todavia, os efeitos colaterais do hipoclorito de sódio como a citotoxicidade, o risco de extrusão para os tecidos periapicais causando inflamação, equimose, hematoma e até necrose e parestesia (Yadav *et al.*, 2017), e o aumento da susceptibilidade à fratura e a resistência microbiana ao hidróxido de cálcio (Dutta, Maria, 2020 e Katebi *et al.*, 2022) têm levado a comunidade científica a buscar produtos alternativos.

Nesse contexto, o ozônio desponta como medicamento intracanal, auxiliando na desinfecção dos canais radiculares. O ozônio é um forte agente oxidante, com ampla ação em biofilmes bacterianos com concentrações mínimas de 0,1 ppm, atuando como agente antimicrobiano contra bactérias, fungos e vírus conforme relataram Savitri e colaboradores em 2018, podendo ser um agente antimicrobiano opcional em Odontologia, devido a menor chance para o desenvolvimento de resistência microbiana, excelente biocompatibilidade e baixo custo.

As cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* foram selecionados pela frequência no sítio cavidade oral, resistência inerente e para Dedhia e colaboradores em 2018, são comumente encontrados em canais radiculares infectados. Esses autores afirmaram que a permanência destes micro-organismos no canal radicular pode levar a falhas no tratamento, conduzindo ao insucesso da terapia endodôntica.

O *Enterococcus faecalis* é de longe o micro-organismo mais estudado quando se trata de insucesso do tratamento em Endodontia, para Rôças; Siqueira em 2018, ao avaliarem a frequência e os níveis de patogenicidade de 40 espécies bacterianas orais em abscessos apicais agudos e dentes com periodontite apical assintomática, encontraram *E. faecalis* em 77% dos casos, todavia esse micro-organismo não se mostrou o mais prevalente nas infecções endodônticas estudadas. Prada e colaboradores em 2019a identificaram *P. aeruginosa* e *E. faecalis* em dentes com infecções primárias ou com insucesso no tratamento endodôntico, mas ressaltaram que esses táxons não são os principais envolvidos nas infecções endodônticas.

Mecanismos de resistência, defesa e frequência daqueles endopatógenos estão no foco das publicações, além do impacto nas condutas endodônticas mais complexas. Investigando três protocolos de tratamento diferentes, incluindo um

microambiente oligotrófico alcalino, semelhante à terapia endodôntica, Jiang e colaboradores em 2015 relataram que o *E. faecalis* tem a capacidade de entrar em um estado latente, mas não cultivável, incapaz de divisão celular, mas viável. Devido a essa propriedade, Deng e colaboradores em 2023 declararam que o *E. faecalis*, pode manter a viabilidade nos canais radiculares após invadir profundamente os túbulos dentinários e escapar da fagocitose das células do hospedeiro. Acrescentaram que o *E. faecalis* apresenta fatores de virulência, como o ácido lipotecóico (LTA), o fator ativador de citolisina (cy1A), a galatinase (ge1E), a proteína de superfície extracelular (esp), a substância de agregação (asa), a substância de adesão ao colágeno (ace), o fator regulador B de *E. faecalis* (fsrB) e o antígeno A de endocardite (efaA) que estão envolvidos na adesão bacteriana, formação de biofilme, resistência à fagocitose, à morte celular e ao dano tecidual. Adicionalmente, Wei e colaboradores em 2021 afirmaram que o *E. faecalis* carrega genes de resistência intrínseca e devido à sua maleabilidade gênica, em condições de estresse, é capaz de adquirir genes de resistência a antibióticos, incluindo clindamicina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e vancomicina, como mencionaram Barbosa-Ribeiro e colaboradores em 2016.

A *Candida albicans* entra neste estudo pela frequência de isolamento nos sistemas de canais radiculares infectados, de acordo com Yasini e colaboradores em 2022, estando presente em 21% das infecções endodônticas primárias. A secreção extracelular de substância polimérica pela *C. albicans*, segundo Elshinawi e colaboradores em 2018, modifica o microambiente em um canal radicular, facilitando a adesão e colonização por outros patógenos como *E. faecalis*, estimulando a produção de superóxidos, seguida de formação de hifas e produção de biofilme complexo como resultado final. A presença dessas adesinas específicas ou receptores existentes na parede celular de hifas de *C. albicans* podem auxiliar a adesão de outros micro-organismos, como o *S. aureus*, conforme declararam Du e colaboradores em 2022. Esses autores demonstraram que a co-cultura de *C. albicans* e *E. faecalis* produz um biofilme mais espesso e denso em comparação com o biofilme monoespécie, maior tolerância a estresses, alcalinidade, força de cisalhamento mecânico e ação fungicida/bactericida como a do hipoclorito de sódio (NaClO), ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), digluconato de clorexidina (CHX), terapia

fotodinâmica antimicrobiana e medicamentos endodônticos com quitosana, nanopartículas de prata e azeite ozonizado.

O teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) de acordo com Yadav e colaboradores em 2017, é um método padronizado, reprodutível, simples de realizar e barato. O TSA por disco difusão mimetiza o contato do agente antimicrobiano com os micro-organismos possui reprodutibilidade, além da quantificação relativa *in vitro* refletir o perfil de sensibilidade *in vivo*, conforme apresentado por Pietrocola e colaboradores em 2018.

Os halos de inibição dos óleos ozonizados sobre a *C. albicans* (OZO 20 mm e AZO 21 mm) foram levemente superiores àqueles encontrados por Monzillo e colaboradores em 2020 no estudo que avaliou o perfil antifúngico do gel a base de azeite de oliva ozonizado, com índice de peróxido de 20 meq/kg, contra quatro espécies de leveduras, com médias de 15 a 19 mm, sugerindo que os óleos ozonizados utilizados nesse experimento têm elevada atividade antifúngica. O diâmetro do halo de inibição de crescimento do hipoclorito de sódio para *C. albicans* (37 mm), mostrou-se comparável àquele encontrado por Yadav e colaboradores em 2017, que ao avaliarem soluções em gel de hipoclorito de sódio a 3%, observaram zona de inibição de 35 mm de diâmetro, resultado superior ao postulado por Dedhia e colaboradores em 2018, que utilizaram NaOCl a 5% e encontraram halos de inibição de 15,4 mm, e por Savitri e colaboradores em 2018, que utilizaram NaOCl à 5,25%, obtiveram halos de 9,70 mm.

Para o *Staphylococcus aureus*, o diâmetro dos halos de inibição de crescimento formados pelo óleo de girassol e azeite de oliva ozonizados e hipoclorito de sódio exibiram valores semelhantes e sem diferenças estatísticas, respectivamente, 12 mm, 14 mm e 14 mm; e mostraram-se maiores que o halo formado pelo hidróxido de cálcio (10 mm). Song e colaboradores em 2017 determinaram que o diâmetro da zona de inibição de um óleo ozonizado a 2.000 a 2.200 mmol-equiv/Kg, contra cepas de *S. aureus* susceptíveis e resistentes a meticilina, deveria ser maior que 7 mm, para ser considerado efetivo. Neste estudo o halo de inibição do hidróxido de cálcio em cepas de *S. aureus* apresentaram valores inferiores à pesquisa de Meto e colaboradores em 2019. Esse estudo apresentou halos de 13 mm para uma mistura de hidróxido de cálcio/cobre. Diferiram também

daqueles encontrados por El Sayed e colaboradores em 2020 que determinaram em 14 mm o halo de inibição para uma pasta a base de hidróxido de cálcio e de 30 mm para uma solução mista de hipoclorito de sódio a 0,5 - 2%. Savitri e colaboradores em 2018 demonstraram valores inferiores para o hipoclorito de sódio (9,5 mm), mesmo com concentração superior àquela utilizada em nosso estudo. No entanto, Dedhia e colaboradores em 2018, que avaliaram NaOCl a 5%, obtiveram halo de inibição de 21,8 mm, superior aos nossos dados.

O valor do diâmetro do halo de inibição encontrado para o hipoclorito de sódio frente a cepa de *Enterococcus faecalis* mostrou-se maior que àqueles para os óleos ozonizados e o hidróxido de cálcio; e entre estes não foram observadas diferenças. Esses dados divergiram do estudo de Raof e colaboradores em 2019, que utilizando hidróxido de cálcio a 60%, não observaram halo de inibição contra *E. faecalis*. El Sayed e colaboradores em 2020 observaram halo de 18 mm para uma mistura híbrida de hidróxido de cálcio e sulfato de bário à 50%. Os resultados para o hipoclorito de sódio estão de acordo com os reportados por Savitri e colaboradores em 2018 (12,40 mm), embora estes pesquisadores tenham usado o NaOCl a 5,25%. Yadav e colaboradores em 2017 e El Sayed e colaboradores em 2020 encontraram diâmetro do halo de inibição de 34 mm, estes utilizando NaOCl a 3% e aqueles com uma solução mista de cupral e NaOCl a 0,5 - 2%.

Os halos de inibição do crescimento para *Pseudomonas aeruginosa* dos medicamentos experimentais não exibiram diferenças estatísticas entre os óleos ozonizados frente ao hidróxido de cálcio e ao hipoclorito de sódio.

Em nossos experimentos, o NaOCl a 2,5% apresentou os maiores halos de inibição para as cepas testadas, sendo, portanto, o irrigante mais eficaz como propostos Goztas, *et al.*, 2014; Chávez-Andrade, *et al.*, 2019; Shi, *et al.*, 2019 e Nunes, *et al.*, 2022.

O teste de contato direto nos dentes *ex-vivo* apresentado por Savitri e colaboradores em 2018, possibilitou a avaliação das propriedades antissépticas de um irrigante em concentrações conhecidas frente a suspensão bacteriana. A eficácia é determinada pelo crescimento bacteriano em intervalo de tempo estipulado. Os resultados do ensaio de contato direto em dentes *ex-vivo* deste experimento mostraram altos valores de eliminação microbiana, variando de 96% de redução de

C. albicans com o hidróxido de cálcio até a totalidade com o óleo de girassol ozonizado e o hipoclorito de sódio para as cepas de *E. faecalis*.

Neste estudo observamos atividade antifúngica do óleo de girassol ozonizado a 505,82 meq/kg e do azeite de oliva ozonizado a 377,6 meq/kg com eliminação quase completa de cepas de *Candida albicans* no teste de contato direto em dentes *ex-vivo*. Resultados similares seguem nos estudos de Elshinawy e colaboradores em 2018, utilizando o azeite de oliva ozonizado a 560-590 meq/kg, obteve redução de 80% para cepas de *Candida albicans*; Zakrzewski e colaboradores (2020) em desafios com azeite de oliva ozonizado em nanopartículas de hidroxiapatita na presença ou não de cobre, observando um aumento do percentual das taxas de eliminação para *C. albicans* de 99,4% para 99,9% e de 96,6% para 97,2%, respectivamente, e Berenji e colaboradores em 2014, observaram MIC entre 166,66 e 233,3 mg/mL para cepas diversas de *Candida spp.* desafiadas com óleo de girassol ozonizado e azeite de oliva ozonizado.

As taxas de eliminação de *Staphylococcus aureus* no experimento com os óleos ozonizados foram, respectivamente, de 99,8% e 99,9%, dados similares ao estudo de Silva e colaboradores em 2020, que investigaram uma mistura ozonizada de azeite de oliva e óleo de girassol (50:50), com concentrações de peróxido com variação entre 44,4 e 220,7 meq/kg e redução de 51 a 75% e de 76 a 99% do biofilme de *S. aureus* susceptíveis e resistentes a metilicina, respectivamente.

O óleo de girassol e o azeite de oliva ozonizados apresentaram eficácia de 99,8% frente cepas de *Enterococcus faecalis*. Elshinawy e colaboradores em 2018 demonstraram uma redução de 86%, enquanto Santa-Rosa e colaboradores em 2019, em desafios com óleo de girassol ozonizado, na concentração de 2.400 ppm, durante a instrumentação por 60 segundos do canal radicular, detectaram moderado crescimento de *E. faecalis* (10^1 - 10^2 UFC).

Segundo Silva e colaboradores em 2020 e Díaz e colaboradores em 2021, a atividade antimicrobiana dos óleos ozonizados é diretamente associada a disponibilidade do peróxido. Estes autores caracterizam os óleos ozonizados como efetivos, além de estarem em consonância às novas tendências e regimentos ambientais com baixa taxa de ação contra o meio ambiente e menor chance aos eventos associados a resistência bacteriana.

Neste estudo o hidróxido de cálcio reduziu em 96,6% cepas de *C. albicans*, inibição superior àquela encontrada por Maekawa e colaboradores em 2013, sendo essa de 90,64% das colônias. A eliminação das cepas bacterianas estudadas nesse período com o uso do Ca(OH)_2 mostrou-se efetiva, sendo 99,9% contra o *E. faecalis*, corroborando com Maekawa e colaboradores em 2013 com 96,81% de eliminação e com Katebi e colaboradores em 2022, com redução de 99,41% das colônias desafiadas. Nossos resultados superaram os valores encontrados por Lei e colaboradores em 2016 com apenas 51,1% de inibição e por Zancan e colaboradores em 2018, com 55,36% de redução para o *E. faecalis*. Maekawa e colaboradores em 2013 descrevem a preservação residual de *C. albicans* e *E. faecalis* pós medicamento intracanal como possível rota de resistência e hipótese para esses resultados com o hidróxido de cálcio. Esses autores sugerem que a presença de uma bomba de prótons na parede celular do *E. faecalis* está associada a acidificação do citoplasma e resistência desses micro-organismos a ambientes com pH alcalino de até 11,1. No caso das cepas de *C. albicans* a adaptação está associada a presença de hifas e capacidade de invadir mais profundamente os canalículos dentinários. A presença do hidróxido de cálcio, pode ainda auxiliar no aumento da aderência desses micro-organismos no sistema de canais radiculares como sugerem Zancan e colaboradores em 2018.

O hipoclorito de sódio demonstrou excelente atividade antimicrobiana, com redução expressiva de todos os micro-organismos estudados, dados similares aos encontrados em alguns estudos (Yadav, *et al.*, 2017; Savitri, *et al.*, 2018; Yanling, *et al.*, 2018; Sarda, *et al.*, 2019; Ruksakiet, *et al.*, 2020). Em concentrações de 0,5 a 6% é considerado o irrigante padrão-ouro em Endodontia, de acordo com Sarda e colaboradores em 2019. Frough-Reihani e colaboradores em 2016 não observaram diferença entre as concentrações de 2,5 e 5%, recomendando, portanto, o uso à 2,5%. Nossos resultados com NaOCl à 2,5% direcionados contra *C. albicans* e *E. faecalis* obtiveram respectivamente 99,4% e 100% de eliminação das colônias, dados similares encontrados no ensaio de Pinheiro e colaboradores em 2018 com NaOCl à 2,5% em canais radiculares com curvaturas severas contaminados com um biofilme misto de *E. faecalis*, *S. mutans* e *C. albicans*. Alshanta e colaboradores em 2019 detectaram redução de 78,7% e 98,3% contra cepas de baixa e de alta formação de biofilme de *C. albicans* com NaOCl a 3% por 5 minutos. Boch e colaboradores em

2016 caracterizaram a inibição do crescimento bacteriano das cepas de *E. faecalis* em 99,98%, com NaOCl à 3% por 60 segundos. Em 2019, Sarda e colaboradores utilizaram 3 ml de NaOCl à 3% por 10 minutos frente a essas cepas, com redução de 73% no crescimento das colônias, assim como Parolia e colaboradores em 2021 ao utilizarem 5 ml de NaOCl à 6% por 10 minutos com 79,7% de inibição, dados similares aos encontrados neste estudo.

Os dados obtidos para o TSA e TCD para a água ozonizada a 8 µg/mL, neste estudo, são similares ao resultado da pesquisa de Borges e colaboradores em 2017, com o crescimento das cepas de *S. aureus* e *C. albicans* frente ao desafio com solução salina ozonizada (8 µg/ml). Savitri e colaboradores em 2018 observaram o crescimento das cepas de *E. faecalis* desafiadas com água de ozônio a 4 µg/ml por 30 minutos. A perda do potencial antimicrobiano pode ser hipotetizada pela desozonização da água após 300s. Todavia, nossas observações diferem do estudo de Hubbezoglu e colaboradores em 2014 com ozônio aquoso em diferentes concentrações durante a instrumentação de condutos radiculares contaminados, em que foram capazes de reduzir em 62% das UFC de *E. faecalis* com a água ozonizada a 8 µg/ml; Nogales, Ferreira, Lago-Marques em 2014 e Nogales e colaboradores em 2016, caracterizaram a ação de água ozonizada a 8 µg/ml, na instrumentação de canais radiculares, contra cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis* e com inibição do crescimento bacteriano; Pinheiro e colaboradores em 2018 em outro ensaio, observaram redução de 98,02% do biofilme misto de *E. faecalis*, *S. mutans* e *C. albicans*, após a instrumentação de canais radiculares ex-vivo com água ozonizada a 8 µg/mL. Por fim, Nunes e colaboradores em 2022 que verificaram a ação da água ozonizada (8 µg/mL) em dentes infectados com *E. faecalis* usando a ativação sônica, tendo como resultado a redução do crescimento em 50,82% das colônias, após a instrumentação dos condutos.

O uso do ozônio como modulador metabólico com atuação nos estímulos imunológicos está em franca expansão na literatura. Rotas inovadoras e adjuvantes terapêuticos são pilares adicionais de prospecção. Nossos resultados demonstraram significativa atividade antimicrobiana para os óleos ozonizados contra os microorganismos estudados. O número de moléculas formadas durante a ozonólise dos ácidos graxos insaturados dos óleos vegetais, principalmente os peróxidos, e posterior liberação de oxigênio singleto, que oxida os ácidos graxos poli-insaturados da parede

bacteriana e o protoplasma bacteriano, nos leva a hipotetizar que o mecanismo de ação dos óleos ozonizados seja inespecífico e não seletivo, concordando com Grandi e colaboradores em 2022.

As nossas evidências nos levam a sugerir a utilização da ozonioterapia em Endodontia como coadjuvante do preparo químico-mecânico com o hipoclorito de sódio e também em pacientes que apresentarem alguma incompatibilidade por problemas alérgicos ao NaOCl ou o Ca(OH)_2 , com praticamente a mesma eficácia e segurança destes.

Estudos mais aprofundados para investigar e elucidar a ação antimicrobiana de tais produtos da ozonização de óleos vegetais e suas atividades, frente a biofilmes multiespécies, com estreito compasso a realidade clínica, metodologias ativas com análises de DNA/RNA, ensaios de citotoxicidade e efeitos adversos são necessários para complementar nosso estudo e vislumbrar a utilização de óleos ozonizados em Endodontia.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível confirmar o papel bactericida e fungicida tanto do hipoclorito de sódio a 2,5%, quanto do hidróxido de cálcio a 50%, sendo esses balizadores para a caracterização do óleo de girassol e o azeite de oliva ozonizados como estruturas promissoras para o entendimento de novas rotas metabólicas e condutas adicionais em Endodontia.

Diante da metodologia utilizada neste estudo pode-se concluir que o óleo de girassol e o azeite de oliva ozonizados apresentam excelente atividade anti-fúngica contra *Candida albicans*, demonstrada pela presença expressiva de halos de inibição e eliminação de unidades formadoras de colônias (99,8% e 99,9%, respectivamente). Mostraram-se também capazes de eliminar mais de 99% das bactérias estudadas, na mesma proporção que o hipoclorito de sódio e o hidróxido de cálcio, comprovando assim sua eficácia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. B. *et al.* Prevalence, virulence and antifungal activity of *C. albicans* isolated from infected root canals. **BMC Oral Health**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020.
- ABUHAIMED, T. S.; ABOU NEEL, E. A. Sodium Hypochlorite Irrigation and Its Effect on Bond Strength to Dentin. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- AHANGARI, Z. *et al.* Investigating the Antibacterial Effect of Passive Ultrasonic Irrigation, Photodynamic Therapy and Their Combination on Root Canal Disinfection. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2021.
- AJETI, N. *et al.* The effect of gaseous ozone in infected root canal. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 389–396, 2018.
- AL-SEBAEI, M. O.; HALABI, O. A.; EL-HAKIM, I. E. Sodium hypochlorite accident resulting in life-threatening airway obstruction during root canal treatment: A case report. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 7, n. mar, p. 41–44, 2015.
- ALSHANTA, O. A. *et al.* *Candida albicans* biofilm heterogeneity and tolerance of clinical isolates: Implications for secondary endodontic infections. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 204, 2019.
- ANDERSON, A. C. *et al.* Comprehensive Analysis of Secondary Dental Root Canal Infections: A Combination of Culture and Culture-Independent Approaches Reveals New Insights. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49576, 2012.
- ANZOLIN, A.; DA SILVEIRA-KAROSS, N.; BERTOL, C. Ozonated oil in wound healing: What has already been proven? **Medical Gas Research**, v. 10, n. 1, p. 54–59, 2020.
- BARBOSA-RIBEIRO, M. *et al.* Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. **Journal of endodontics**, v. 42, n. 7, p. 1022–1028, 1 jul. 2016.
- BEHRENTS, K. T.; SPEER, M. L.; NOUJEIM, M. Sodium hypochlorite accident with evaluation by cone beam computed tomography. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 5, p. 492–498, 2012.
- BERENJI, F. *et al.* Comparing the effect of ozonized olive oil with clotrimazole on three *Candida* species *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*. **E3 J Microbiol Res**, v. 2, n. 1, p. 9-13, 2014.
- BLATTES, G. B. F. *et al.* Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 34–39, 2017.
- BOCH, T. *et al.* Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm—an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 7, p. 1733–1739, 2016.
- BORGES, G. Á. *et al.* In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 3, p. 364-370, 2017.

BOSCH-ARANDA, M. L. *et al.* Complications following an accidental sodium hypochlorite extrusion: A report of two cases. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 4, n. 3, p. 194–198, 2012.

BRASIL. **L14648**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2023-2026/2023/lei/L14648.htm>. Acesso em: 11 ago. 2023.

BRASIL. **Práticas Integrativas e Complementares (PICS)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/p/pics>>. Acesso em: 11 ago. 2023.

BRASIL. **Conselho Federal de Odontologia regulamento sobre o exercício pelo Cirurgião-Dentista da prática de Ozonioterapia capítulo I da Ozonioterapia aplicada a Odontologia**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://website.cfo.org.br/wp-content/uploads/2016/01/resolucao-cfo-166-2015.pdf>>. Acesso em: 11. ago. 2023.

BUENO, C. R. E. *et al.* Tissue reaction to Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) extracts associated with microorganisms: an in vivo study. **Brazilian Oral Research**, v. 32, p. 1–9, 24 maio 2018.

CHAVES, S. C. L. *et al.* Política Nacional de Saúde Bucal: fatores associados à integralidade do cuidado. **Revista de Saúde Pública**, p. 1005–1013, 2010.

CHÁVEZ-ANDRADE, G. M. *et al.* Antimicrobial and biofilm anti-adhesion activities of silver nanoparticles and farnesol against endodontic microorganisms for possible application in root canal treatment. **Archives of Oral Biology**, v. 107, n. July, p. 104481, 2019.

COAGUILA-LLERENA, H. *et al.* Physicochemical properties, cytotoxicity and penetration into dentinal tubules of sodium hypochlorite with and without surfactants. **Restorative dentistry & endodontics**, v. 45, n. 4, 2020.

COSAN, G. *et al.* Evaluation of Antibacterial and Antifungal Effects of Calcium Hydroxide Mixed with Two Different Essential Oils. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 1–15, 2022.

DEDHIA, J. *et al.* Efficacy of *Andrographis paniculata* compared to *Azadirachta indica*, *Curcuma longa*, and sodium hypochlorite when used as root canal irrigants against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*: An in vitro antimicrobial study. **Journal of Conservative Dentistry: JCD**, v. 21, n. 6, p. 642, 2018.

DENG, Z. *et al.* Role of *Enterococcus faecalis* in refractory apical periodontitis: from pathogenicity to host cell response. **Journal of Oral Microbiology**, v. 15, n. 1, 1 mar. 2023.

DÍAZ, M. F. *et al.* Assessment of the physicochemical quality indicators and microbiological effects of Brazilian ozonized vegetable oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 1, p. 216–224, 2021.

DI MAURO, R. et al. The biochemical and pharmacological properties of ozone: the smell of protection in acute and chronic diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 634, 2019.

DIOGO, P. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against endodontic *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* mono and mixed biofilms in the presence of photosensitizers: A comparative study with classical endodontic irrigants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–11, 2017.

DIOGUARDI, M. et al. Inspection of the microbiota in endodontic lesions. **Dentistry Journal**, v. 7, n. 2, p. 1–15, 2019.

DU, Q. et al. Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 3 nov. 2022.

DUNCAN, H. F. et al. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 7, p. 949–973, 2019.

DUTTA, S. D.; MARIA, R. D. Homeopathic consideration for resistant endodontic bacteria *Enterococcus faecalis*: An in vitro comparative disc diffusion study. **Journal of Conservative Dentistry : JCD**, v. 23, n. 5, p. 528, 1 set. 2020.

EL SAYED, M. et al. Antibacterial Activity of Sodium Hypochlorite Gel versus Different Types of Root Canal Medicaments Using Agar Diffusion Test: An In Vitro Comparative Study. **International Journal of Dentistry**, v. 2020, p. 1–11, 28 nov. 2020.

ELSHINAWY, M. I. et al. Synergistic Effect of Newly Introduced Root Canal Medicaments; Ozonated Olive Oil and Chitosan Nanoparticles, Against Persistent Endodontic Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. July, 2018.

ENDO, M. S. et al. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. **European Journal of Dentistry**, v. 7, n. 3, p. 302–309, 2013.

ERDEM HEPSENOGLU, Y.; EYUBOGLU, T. F.; ÖZCAN, M. Postoperative Pain Intensity after Single- versus Two-visit Nonsurgical Endodontic Retreatment: A Randomized Clinical Trial. **Journal of endodontics**, v. 44, n. 9, p. 1339–1346, 1 set. 2018.

ESTRELA, C. et al. Surface tension of calcium hydroxide associated with different substances. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, p. 152-156, 2005.

ESTRELA, Carlos et al. Mechanism of action of Bioactive Endodontic Materials. **Brazilian Dental Journal**, v. 34, p. 1-11, 2023.

FRANCISCATTO, G. J. et al. Association between pulp and periapical conditions and dental emergency visits involving pain relief: epidemiological profile and risk indicators in private practice in Australia. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 7, p. 887–894, 2020.

FRANCISCO, P. A. et al. Proteomic profile of root canal contents in teeth with post-treatment endodontic disease. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 4, p.

451–460, 2018.

FROUGH-REYHANI, M. *et al.* Antimicrobial efficacy of different concentration of sodium hypochlorite on the biofilm of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 8, n. 5, p. e480, 2016.

GONZÁLEZ-LUNA, P. I. *et al.* Bactericide Effect of Silver Nanoparticles as a Final Irrigation Agent in Endodontics on *Enterococcus faecalis*: An Ex Vivo Study. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.

GOZTAS, Z. *et al.* Antimicrobial effect of ozonated water, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in primary molar root canals. **European journal of dentistry**, v. 8, n. 04, p. 469-474, 2014.

GRANDI, G. *et al.* In vitro antimicrobial activity of ozonated oil in liposome eyedrop against multidrug-resistant bacteria. **Open Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1057-1063, 2022.

GUIVARC'H, M. *et al.* Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review. **Journal of endodontics**, v. 43, n. 1, p. 16–24, 1 jan. 2017.

HENDI, S. S. *et al.* Antibacterial Effects of a 940 nm Diode Laser With/ Without Silver Nanoparticles Against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 12, n. 1, 2021.

HOLLAND, R. *et al.* Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 25, n. 5, p. 465–476, 1 set. 2017.

HUBBEZOGLU, I. *et al.* Antibacterial Efficacy of Aqueous Ozone in Root Canals Infected by *Enterococcus faecalis*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 11411, 2014.

INAL, M. *et al.* The effects of ozone therapy and coenzyme Q 10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. **Irish journal of medical science**, v. 180, p. 703-707, 2011.

JIANG, Y. T. *et al.* Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 14790–14801, 2015.

KATEBI, K. *et al.* The comparison of calcium hydroxide, curcumin, and Aloe vera antibacterial effects on 6-week-old *Enterococcus faecalis* biofilm as an intracanal medicament: An in vitro study. **Dental Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 14, 2022.

KIST, S. *et al.* Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 4, p. 995–1005, 2017.

KUMAR, A. *et al.* Current interpretations and scientific rationale of the ozone usage in dentistry: A systematic review of literature. **European Journal of General Dentistry**, v. 3, n. 03, p. 175-180, 2014.

KUMAR, D. *et al.* Association of specific microorganisms with endodontic signs and symptoms. A comparative study. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 9, n. 8, p. 3965, 2020.

KUMAR, K. *et al.* Assessment of Coronal Leakage with Two Intracanal Medicaments After Exposure to Human Saliva—An In Vitro Study. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 11, n. 5, p. 406–411, 2018.

KUMARI, K. S. *et al.* Taxonomic Assignment-Based Genome Reconstruction from Apical Periodontal Metagenomes to Identify Antibiotic Resistance and Virulence Factors. **Life**, v. 13, n. 1, p. 194, 9 jan. 2023.

LEI, L. *et al.* Exopolysaccharide dispelled by calcium hydroxide with volatile vehicles related to bactericidal effect for root canal medication. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 5, p. 487–495, 2016.

LIN, X. *et al.* An in vitro study on the effects of serum proteins on *Enterococcus faecalis* adhesion to three types of root sealers and gutta-percha. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, 7 dez. 2021.

LOUZADA, L. M. *et al.* Clinical Investigation of Microbial Profile and Levels of Endotoxins and Lipoteichoic Acid at Different Phases of the Endodontic Treatment in Teeth with Vital Pulp and Associated Periodontal Disease. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 6, p. 736–747, 1 jun. 2020.

LUBOJANSKI, A. *et al.* Application of selected nanomaterials and ozone in modern clinical dentistry. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 1–30, 2021.

MAEKAWA, L. E. *et al.* In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 2, p. 106–111, 2011.

MAEKAWA, L. E. *et al.* Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v. 21, n. 1, p. 25–31, 2013.

MANOIL, Daniel; AL-MANEI, Khaled; BELIBASAKIS, Georgios N. A systematic review of the root canal microbiota associated with apical periodontitis: lessons from next-generation sequencing. **PROTEOMICS—Clinical Applications**, v. 14, n. 3, p. 1900060, 2020.

MARTINHO, F. C. *et al.* Clinical comparison of the effectiveness of 7- and 14-day intracanal medications in root canal disinfection and inflammatory cytokines. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 1, p. 523–530, 6 jun. 2017.

MATTOS, M. M. R. S. **Uma nova abordagem para o tratamento de infecções endodônticas persistentes com o uso do extrato de aroeira bruto a 50% frente a uma cepa de enterococcus faecalis ATCC 29212.** Instituto de Ciências da Saúde, 20 jul. 2017.

MERGONI, G. *et al.* Prevalence of Candida Species in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 11, p. 1616-1625.e9, 2018.

METO, A. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm efficacy of a copper/calcium hydroxide-based endodontic paste against Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans. **Dental Materials Journal**, v. 38, n. 4, p. 591-603, 2019.

MONZILLO, V. *et al.* Ozonized Gel Against Four Candida Species: A Pilot Study and Clinical Perspectives. **Materials**, v. 13, n. 7, p. 1731, 8 abr. 2020.

NAIK, S. V. *et al.* Suppl-1, M7: Ozone-A Biological Therapy in Dentistry-Reality or Myth?????. **The open dentistry journal**, v. 10, p. 196, 2016.

NIRWANA, I. *et al.* Antibacterial activity of fig leaf (Ficus carica Linn.) extract against Enterococcus faecalis and its cytotoxicity effects on fibroblast cells. **Veterinary World**, v. 11, n. 3, p. 342–347, 20 mar. 2018.

NOGALES, C. G. Parâmetros da ação antimicrobiana e da citotoxicidade do ozônio para aplicação na Endodontia [dissertação]. **São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, 2011

NOGALES, C. G.; FERREIRA, M.; LAGE-MARQUES, J. L. Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Enterococcus faecalis—in vitro study. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 4, n. 1, p. 9-15, 2014.

NOGALES, C. G. *et al.* Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: Microbiological – Ex vivo study and cytotoxicity analyses. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 6, p. 607–613, 2016.

NUNES, I. A. M. *et al.* Antimicrobial action of ozonated water and photodynamic therapy with sonic activation in root canals infected with Enterococcus faecalis. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 14, n. 6, p. 486–491, 2022.

ORDINOLA-ZAPATA, R. *et al.* Taxonomic abundance in primary and secondary root canal infections. **International Endodontic Journal**, v. 56, n. 2, p. 278–288, 22 nov. 2022.

ÖZDEMİR, O. *et al.* The frequency of sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment: an observational clinical study. **Australian Dental Journal**, p. 1–8, 2022.

PAROLIA, A. *et al.* Effect of propolis nanoparticles against enterococcus faecalis biofilm in the root canal. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 1–17, 2021.

PEREIRA, R. S. *et al.* Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. **Anaerobe**, v. 48, p. 12–18, 2017.

PEROTTI, S.; BIN, P.; CECCHI, R. Hypochlorite accident during endodontic therapy with nerve damage – A case report. **Acta Biomedica**, v. 89, n. 1, p. 104–108, 2018.

PIETROCOLA, G. *et al.* Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 10, n. 11, p. e1103, 2018.

PINHEIRO, S. L. *et al.* Antimicrobial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, and ozonated water as irrigants in mesiobuccal root canals with severe curvature of mandibular molars. **European Journal of Dentistry**, v. 12, n. 01, p. 094-099, 2018.

PRADA, I. *et al.* Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 24, n. 3, p. e364–e372, 2019a.

PRADA, I. *et al.* Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 11, n. 2, p. e185–e193, 2019b.

RADZIMIERSKA-KAŻMIERCZAK, M. *et al.* Olive Oil with Ozone-Modified Properties and Its Application. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3074, 21 maio 2021.

RAOOF, M. *et al.* Antimicrobial activity of methanolic extracts of *Myrtus communis* L. and *Eucalyptus galbie* and their combination with calcium hydroxide powder against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dentistry**, v. 20, n. 3, p. 195, 2019.

RATH, P. P. *et al.* The effect of root canal irrigants on dentin: a focused review. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 45, n. 3, 2020.

RAVINANTHANAN, M. *et al.* Cytotoxicity Evaluation of Combination Irrigant Regimens with MTAD on Two Different Cell Lines. **Contemporary clinical dentistry**, v. 9, n. 2, p. 255–259, 2018.

REIS, A. *et al.* Nova tendência da medicação intracanal para atuação sobre *enterococcus faecalis*: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BLSCR**, v. 24, n. 1, p. 11-5–121, 2018.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2018.

RUKSAKIET, K. *et al.* Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and sodium hypochlorite in root canal disinfection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of endodontics**, v. 46, n. 8, p. 1032-1041. e7, 2020.

SARDA, R. A. *et al.* Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, diode laser, and sodium hypochlorite and their combinations on endodontic pathogens. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 265–272, dez. 2019.

SANTA-ROSA, C. C. *et al.* Estudo piloto da análise comparativa da atividade antimicrobiana da PDT e agentes irrigantes em canais radiculares inoculados com *Enterococcus faecalis* “in vitro”. **Arquivos em Odontologia**, v. 55, 2019.

SANTOS-JUNIOR, A. O. *et al.* Success or failure of endodontic treatments: A retrospective study. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 22, n. 2, p. 129, 2019.

SAVITRI, D. *et al.* Efficacy of Ozonated Water, 2% Chlorhexidine and 5.25% Sodium Hypochlorite on Five Microorganisms of Endodontic Infection: In Vitro: Study. **Advances in Human Biology**, v. 8, n. 1, p. 19-23, 2018.

SEDIGH-SHAMS, M. *et al.* Antimicrobial efficacy and cytocompatibility of calcium hypochlorite solution as a root canal irrigant: An in Vitro investigation. **Iranian Endodontic Journal**, v. 11, n. 3, p. 169–174, 2016.

SEN, S.; SEN, S. Ozone therapy a new vista in dentistry: integrated review. **Medical gas research**, v. 10, n. 4, p. 189, 2020.

SHEKHAR, S. *et al.* To evaluate and compare the effect of 17% EDTA, 10% citric acid, 7% maleic acid on the dentinal tubule penetration depth of bio ceramic root canal sealer using confocal laser scanning microscopy: an in vitro study. **F1000Research**, v. 11, p. 1561, 22 dez. 2022.

SHI, Y. *et al.* Evaluation of sodium hypochlorite irrigant, bingpeng irrigant, and fufang bingpeng irrigant as endodontic irrigants during passive ultrasonic irrigation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. MAY, 2019.

SILVA, V. *et al.* High efficacy of ozonated oils on the removal of biofilms produced by methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) from infected diabetic foot ulcers. **Molecules**, v. 25, n. 16, 1 ago. 2020.

SIQUEIRA, J. F. *et al.* Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis. **PloS one**, v. 11, n. 9, p. e0162887, 2016.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 1, p. 85–94, 1 jan. 2004.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F. *et al.* Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. **Brazilian Oral Research**, v. 32, p. 1–19, 18 out. 2018.

SMITH, Noel L. *et al.* Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical gas research**, v. 7, n. 3, p. 212, 2017.

SONG, M. *et al.* The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 2, p. 2449-2455, 2018.

SUH, Y. *et al.* Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. **Medical gas research**, v. 9, n. 3, p. 163–167, 1 set. 2019.

SY, K. *et al.* How adding chlorhexidine or metallic nanoparticles affects the antimicrobial performance of calcium hydroxide paste as an intracanal medication: An in vitro study. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, 2021.

TABASSUM, S.; KHAN, F. R. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. **European Journal of Dentistry**, v. 10, n. 1, p. 144–147, 2016.

TAHIR, A. *et al.* Influence of Sapindus mukorossi extract in comparison to 17% EDTA as final root canal irrigant on the sealer penetration and microleakage of dentinal tubules. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 7, 2023.

TIBÚRCIO-MACHADO, C. S. *et al.* The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 5, p. 712–735, 22 jan. 2021.

TIWARI, S. *et al.* Dental applications of ozone therapy: A review of literature. **The Saudi Journal for Dental Research**, v. 8, n. 1–2, p. 105–111, 1 jan. 2017.

TONINI, R. *et al.* Irrigating Solutions and Activation Methods Used in Clinical Endodontics: A Systematic Review. **Frontiers in Oral Health**, v. 3, n. January, 2022.

VAJRABHAYA, L. *et al.* Hypochlorite solution for root canal irrigation that lacks a chlorinated odor. **European Journal of Dentistry**, v. 11, n. 2, p. 221, 2017.

VALVERDE, M. E. *et al.* Antibacterial efficacy of several intracanal medicaments for endodontic therapy. **Dental Materials Journal**, v. 36, n. 3, p. 319–324, 2017.

VASAVADA, K.; KAPOOR, S. Evaluation of ozonized calcium hydroxide as an effective intracanal medicament during root canal procedures: An in vitro observational study. **Medical Gas Research**, v. 10, n. 3, p. 122–124, 1 set. 2020.

VERMA, D.; GARG, P. K.; DUBEY, A. K. Insights into the human oral microbiome. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 4, p. 525–540, 2018.

VIEIRA, R. G. L. *et al.* In vitro studies of the antibacterial activity of *Copaifera* spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2018.

WEI, L. *et al.* Phosphate transport system mediates the resistance of *Enterococcus faecalis* to multidrug. **Microbiological Research**, v. 249, p. 126772, ago. 2021.

WENZLER, J. S. *et al.* Impact of adjunctive laser irradiation on the bacterial load of dental root canals: A randomized controlled clinical trial. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1–9, 2021.

YADAV, P. *et al.* Evaluation of antimicrobial and antifungal efficacy of chitosan as endodontic irrigant against *Enterococcus Faecalis* and *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 3, p. e361–e367, 2017.

YANLING, C. *et al.* Efficacy of relacin combined with sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 26, p. e20160608, 2018.

YASINI, Zahra *et al.* Ex vivo efficacy of sonodynamic antimicrobial chemotherapy for inhibition of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 40, p. 103113, 2022.

YIN, I. X. *et al.* The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 2555–2562, abr. 2020.

YOO, Y. J. *et al.* *Candida albicans* virulence factors and pathogenicity for endodontic infections. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1300, 1 set. 2020.

YOUSSEF SHAHI, H. *et al.* Anti-bacterial properties of calcium hydroxide in combination with silver, copper, zinc oxide or magnesium oxide. **European Journal of Translational Myology**, v. 28, n. 3, 10 jul. 2018.

ZAKRZEWSKI, W. *et al.* The influence of ozonated olive oil-loaded and copper-doped nanohydroxyapatites on planktonic forms of microorganisms. **Nanomaterials**, v. 10, n. 10, p. 1997, 2020.

ZANCAN, R. F. *et al.* Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. **Microscopy research and technique**, v. 82, n. 5, p. 494-500, 2019.