

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA 2% AQUOSA COM E SEM A ASSOCIAÇÃO COM OZÔNIO CONTRA CEPAS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS. ESTUDO IN VITRO.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF AQUEOUS CHLORHEXIDINE DIGLUCONATE 2% WITH AND WITHOUT ASSOCIATION WITH OZONE AGAINST STRAINS OF ENTEROCOCCUS FAECALIS. IN VITRO STUDY.

Patrícia Silva Oliveira – patty2011.gbi@hotmail.com – graduanda Odontologia da Universidade de Brasília Brasília - DF

Luander Medrado Santiago - luander.ms@gmail.com - Cirurgião Dentista - Clínica Privada Brasília - DF

Sérgio Bruzadelli Macedo - bruzadel@uol.com.br - Professor Adjunto do Departamento de Odontologia da Universidade de Brasília, Brasília - DF

Laudimar Alves de Oliveira - laudimar@unb.br – Professor Associado II do Departamento de Odontologia da Universidade de Brasília, Brasília - DF

Correspondente

Patrícia Silva Oliveira, Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB, Brasília (DF), (38)998604856, patty2011.gbi@hotmail.com

Declaração de conflito de interesse:
nada a declarar.

Transferência de direitos autorais:
Todos os autores concordam com o fornecimento de todos os direitos autorais a Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde.

RESUMO

Objetivo: A presente pesquisa tem como objetivo analisar o uso do digluconato de clorexidina 2% isoladamente e em associação ao ozônio como substância auxiliar na irrigação do sistema de canais de dentes bovinos, contra cepas de *Enterococcus faecalis*. **Métodos:** Foram utilizadas 47 raízes de incisivos bovinos, contaminadas com cepas de *Enterococcus faecalis* e divididas em 6 grupos, irrigadas com substâncias distintas, sendo elas: digluconato de clorexidina 2% em associação com gás ozônio, clorexidina 2% mono ozonizada, digluconato de clorexidina

2% bi ozonizada, água bidestilada ozonizada, digluconato de clorexidina 2% (controle positivo) e soro fisiológico (controle negativo). Após 48 horas de irrigação, a carga microbiana remanescente foi analisada em espectrofotômetro de massa e os resultados tratados estatisticamente. **Resultados:** A água ozonizada se aproximou do controle negativo. O digluconato de clorexidina 2% mono e bi ozonizado apresentaram resultados próximos entre si e ambos evidenciaram potencial antimicrobiano inferior à clorexidina 2% isoladamente. A clorexidina 2% associada ao gás ozônio expressou resultado similar ao controle positivo. **Conclusões:** No presente estudo,

o potencial antimicrobiano da água ozonizada mostrou-se baixo ou nulo. A clorexidina 2% mono e bi ozonizada evidenciou resultados inferiores à irrigação usando apenas a clorexidina, assim deduz-se que o ozônio contribuiu negativamente na solução. Por fim, a irrigação com clorexidina associada ao gás ozônio apresentou efeito similar ao controle positivo, revelando que não houve sinergismo antibacteriano das soluções associadas.

Palavras-chave: Clorexidina, Ozônio, Irrigantes do Canal Radicular, *Enterococcus faecalis*, Espectrofotometria.

ABSTRACT

Objective: This research aims to analyze the use of 2% chlorhexidine digluconate isolated and in association with ozone as an auxiliary substance in the irrigation of the root canal system of bovine teeth, against *Enterococcus faecalis* strains. **Methods:** Forty-seven roots of bovine incisors were used, contaminated with *Enterococcus faecalis* strains and divided into 6 groups, irrigated with different substances, namely: 2% chlorhexidine digluconate in association with ozone

gas, 2% mono-ozonized chlorhexidine, chlorhexidine digluconate 2% bi-ozonized solution, ozonated bidistilled water, 2% chlorhexidine digluconate (positive control) and saline solution (negative control). After 48 hours of canal irrigation, the remaining microbial load was analyzed in a mass spectrophotometer. **Results:** The ozonized water approached the negative control. Chlorhexidine digluconate 2% mono and bi-ozonized showed results close to each other, and both showed lower antimicrobial potential than chlorhexidine 2% alone. Chlorhexidine associated with ozone gas showed results like the positive control. **Conclusion:** In the present study, the antimicrobial potential of ozonized water was low or null. Chlorhexidine 2% mono and bi-ozonated had inferior results to irrigation using only chlorhexidine, so it can be deduced that ozone contributed negatively to the solution. Finally, irrigation with chlorhexidine 2% associated with ozone gas had a similar effect to the positive control, revealing that there was no antibacterial synergism of the associated solutions.

Keywords: Chlorhexidine, Ozone, Root Canal Irrigants, *Enterococcus faecalis*, Spectrophotometry.

ENVIADO: 05/23

ACEITO: 06/23

REVISADO: 07/23

INTRODUÇÃO

Airrigaçãodecanaiséumaetapaessencial na terapia endodôntica, cuja ação química, dada pela substância auxiliar, e mecânica, por meio de sua agitação no ambiente, permite a limpeza e desinfecção desse sistema^{6,14,19}. As substâncias irrigadoras devem possuir potencial antimicrobiano, entretanto, a maioria delas não é seletiva, evidenciando certo grau de toxicidade tecidual^{6,29}.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é considerado a solução de eleição devido às suas propriedades, como potente ação

antimicrobiana, dissolução de material orgânico e baixo custo. Porém, quando em contato com os tecidos periapicais, pele e mucosa o NaOCl impõe significativo potencial irritativo^{3,6,19,29}. Assim, faz-se necessário o estudo de outras substâncias com efetiva ação antimicrobiana, mas que oportunizem maior tolerância tecidual⁴.

Embora o hipoclorito de sódio figure como substância principal para irrigação do sistema de canais na terapia endodôntica, verifica-se em diversos casos, seu elevado potencial de irritabilidade tecidual^{6,19,29}. Com isso, em diversos casos o risco de extravasamento

da substância para os tecidos periapicais contraindica sua escolha³. Esse perfil requer a busca por substâncias alternativas que reduzam seu potencial de irritação tecidual ao tempo que mantenham sua capacidade de redução da carga microbiana existente^{3,25}.

O digluconato de clorexidina geralmente é usado no sistema de canais quando o paciente é reconhecidamente alérgico ao NaOCl ou quando o procedimento tem grande possibilidade de extravasamento apical. Essa substância associa sua atividade antibacteriana de amplo espectro com baixa irritabilidade aos tecidos e possui substantividade - efeito antimicrobiano residual³. Entretanto, a clorexidina não promove a dissolução dos tecidos orgânicos^{6,19,29}. Visando ampliar seu perfil antimicrobiano, verifica-se na literatura a associação na limpeza de canais com ozônio.

Devido às suas características biológicas, o ozônio pode elevar o efeito antibacteriano nos sítios de infecção, além de não ser tóxico para os tecidos em sua apresentação aquosa e gasosa²⁵. A ação combinada de clorexidina 2% e 24 segundos de ozônio podem ser vantajosas, tendo em vista que elas atuam de modo distinto, o que provocaria sinergismo no potencial antimicrobiano¹⁷.

Várias substâncias têm sido propostas no contexto de reduzir o perfil de irritação tecidual ao tempo que mantêm a capacidade de diminuição da carga microbiana existente, com destaque para o digluconato de clorexidina, nas suas formas gel e aquosa, ambas com concentração de 2%^{3,27}. Outra substância que vem apresentando destaque é o ozônio²⁵. Tanto nas suas formas aquosa e oleosa quanto na apresentação gasosa, o ozônio vem oferecendo capacidade antimicrobiana de interesse para a endodontia²⁷.

Assim, o objetivo da presente pesquisa reside em analisar o uso do digluconato de clorexidina 2% isoladamente e em associação ao ozônio como substância auxiliar na irrigação do sistema de canais de dentes bovinos, contra cepas de *Enterococcus faecalis*.

MÉTODOS

Este estudo foi realizado no laboratório de endodontia, biomateriais e microbiologia oral do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde/UnB. Os

dentes bovinos utilizados foram obtidos de frigoríficos cujo abate se deu em decorrência de atendimento para indústria alimentícia, não guardando relação direta com a presente pesquisa, portanto, sem implicação ética.

Preparação dos dentes bovinos

Foram extraídos dentes de mandíbulas bovinas obtidas de animais originados de abatedouro com finalidade de consumo - inciso 6.1.10, da Resolução Normativa CONCEA N. 30 de 02 de fevereiro de 2016, PROC. SEI 23106.142110/2022-89, doc. 9950550. Foram excluídos dentes que apresentaram fraturas ou aspectos de anormalidades e, por fim, selecionados 47 incisivos bovinos. Esses dentes foram mergulhados em uma solução com hipoclorito de sódio 2% por cerca de 1 hora e lavados em água corrente por um período de 24 horas. Com auxílio de curetas Gracey, foram removidos restos de tecidos moles nas superfícies das raízes (Figura 1).



Figura 1- Incisivos bovinos.

Em seguida, os dentes foram seccionados transversalmente na junção amelocementária e nos ápices para regularização. Os canais foram instrumentados, em toda sua extensão, com limas tipo K até #40 (Sybronendo®) e broca largo #5 (Dentisply Sirona®), o ápice foi selado com ionômero de vidro restaurador (MaxxionR® - FGM) e no longo eixo externo da raiz foi passado esmalte (Incolor - Colorama®). As raízes foram lavadas em água corrente por um período de 24 horas. Posteriormente, as raízes foram esterilizadas e colocadas em eppendorfs de 2 ml estéreis (Figura 2).



Figura 2- Raízes seccionadas e instrumentadas.

Contaminação com *Enterococcus faecalis*

As raízes foram contaminadas com cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 por 21 dias. As amostras de *E. faecalis* foram cultivadas em placas de Petri em meio ágar - BHI e coletadas através da alça para microbiologia 10 µl estéril e inoculadas em meio de cultura Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth® - Kasvi) líquido e misturadas no agitador magnético (Pyro-Magnetic® - Lab-Line) para homogeneização do conteúdo e posteriormente introduzidas no interior dos canais radiculares.

Após a aplicação do inóculo, os canais foram preenchidos a cada 3 dias com meio BHI líquido estéril para possibilitar a nutrição das cepas bacterianas e colocadas por 21 dias em

estufa de crescimento a 37°C com umidade 100% (Figura 3).



Figura 3- Raiz em eppendorf, contaminadas com *E. faecalis*.

Transcorrido o período de contaminação foram selecionadas 4 raízes aleatórias para confirmação do nível de distribuição microbiana, por meio de coleta de amostras com cones de papel estéreis e inserção em tubos de ensaio com caldo BHI. Em seguida, após 24 horas, foi confirmada a contaminação por *E. faecalis* através da realização de esfregaços de lâminas, coradas com método de Gram e analisadas em microscopia óptica (Figura 4).

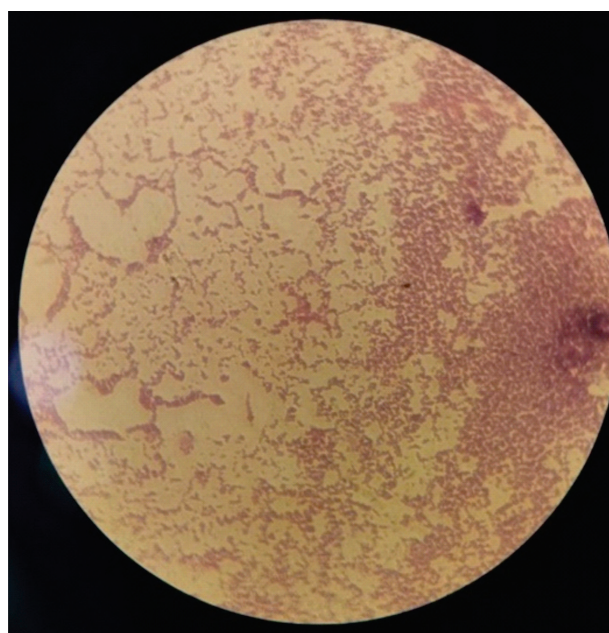


Figura 4- Microscopia de varredura de Bactéria Gram + compatível com *E. Faecalis*. Coloração de Gram. Aumento 40 vezes.

Descontaminação das raízes com soluções auxiliares

Após isso, as amostras foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos experimentais e 2 grupos controle. No grupo 1, 9 canais foram irrigados com 10 ml de digluconato de clorexidina aquosa 2% em associação com 20 segundos de gás ozônio (C+O); grupo 2, 9 canais foram irrigados com 10 ml de digluconato de clorexidina aquosa 2% mono ozonizada (COM); grupo 3, 9 canais foram irrigados com 10 ml de digluconato de clorexidina aquosa 2% bi ozonizada (COB); no grupo 4, 9 canais foram irrigados com 10 ml de água bidestilada ozonizada (AO), no grupo 5, 9 canais foram irrigados com 10 ml de digluconato de clorexidina aquosa 2% (controle positivo - CP). No grupo 6, 2 canais foram irrigados com 10 ml de soro fisiológico (controle negativo - CN). O processo de irrigação foi feito no modo convencional com auxílio de uma seringa estéril sem agitação mecânica e foi realizado em 5 etapas, aplicando 2 mL de substância irrigadora a cada 5 minutos, totalizando 25 minutos de irrigação, mimetizando a atividade clínica (Figura 5).



Figura 5- Identificação dos 6 grupos distintos.

Foi utilizada solução aquosa de digluconato de clorexidina 2% (Rioex® - Rioquímica), a ozonização da clorexidina foi realizada em um gerador de ozônio (MedplusV® - Philozon), sendo o mesmo para fabricação do gás. A clorexidina foi ozonizada à uma concentração de 20 µg/mL, devido à grande quantidade de espuma resultante do processo. Foi considerada como mono ozonizada a clorexidina contida no primeiro frasco, onde recebia o gás ozônio diretamente. Parte dessa clorexidina do primeiro frasco se tornou espuma e foi extravasada a outro

recipiente estéril, voltando ao meio líquido posteriormente, denominada bi ozonizada. A aplicação do gás ocorreu à concentração mais elevada de 60 µg/mL. Foi utilizado também para irrigação água bidestilada (água para injeção - Fresenius® Kabi) ozonizada a uma concentração de 60 µg/mL e soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9% - Fresenius® Kabi).

Após irrigação, todas as amostras foram colocadas em eppendorfs estéreis novos, tiveram seus canais preenchidos com caldo BHI e foram colocados para crescimento em estufa a 37 graus com umidade de 100%. Transcorrido o período de cultura, 72 horas, foram feitas análises do nível de contaminação residual dos canais por meio de inserção de cones de papel estéreis em cada canal e colocadas em tubos de ensaio com 3mL de caldo BHI para verificação do nível de turvação, adotando-se como padrão a escala nefelométrica de McFarland (Tabela 1 e 2, Figura 6).

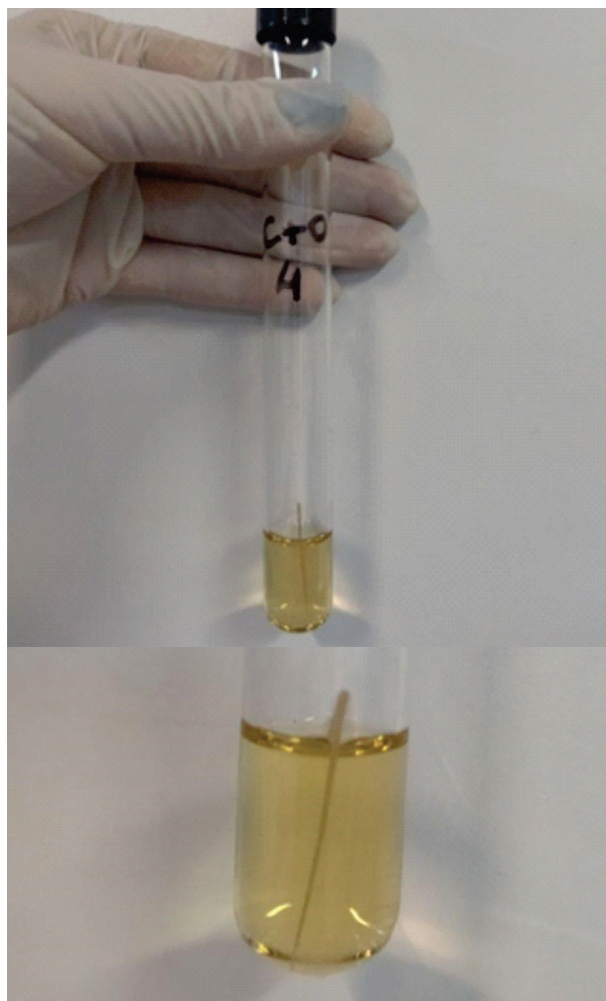


Figura 6- Tubo contendo 3mL de caldo BHI e cone de papel que foi imergido nas raízes após a irrigação.

Tabela 1 - Padrão de absorvância * - culturas representativas das faixas nefelométricas de *Mc Farland*¹

	Grau de opalescência seguindo padrão de <i>Mc Farland</i>			
	Zero	1 – 3	4 – 6	7 - 10
Absorvância Nm	Até 0.050	0.150 a 0.450	0.500 a 0.900	Acima de 0.950

¹ Avaliação feita por espectrofotômetro de massa FEMTO 600 - Tecnal Laboratórios - calibragem com água destilada - em comprimento de onda 500 λ - absorvância zero. Adaptado de Oliveira, LA. Avaliação das propriedades físicas, químicas e antimicrobianas do hipoclorito de sódio, 1% e 5%, da clorexidina 2%, aquosa e gel, e do HCT20, substâncias auxiliares na terapia do sistema de canais. 2003. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Tabela 2 - Escala nefelométrica de *McFarland* para análise de quantidade de microrganismos em meio líquido ¹

Tubo	BaCl ₂ a 1%	H ₂ (SO ₄) a 1%	Quantidade de microrganismos*
Zero	0	0	Zero
1	0,1 mL	9,9 mL	300.000
2	0,2 mL	9,8 mL	600.000
3	0,3 mL	9,7 mL	900.000
4	0,4 mL	9,6 mL	1.200.000
5	0,5 mL	9,5 mL	1.500.000
6	0,6 mL	9,4 mL	1.800.000
7	0,7 mL	9,3 mL	2.100.000
8	0,8 mL	9,2 mL	2.400.000
9	0,9 mL	9,1 mL	2.700.000
10	1,0 mL	9,0 mL	3.000.000

¹ * Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura. Adaptado de Oliveira, LA. Avaliação das propriedades físicas, químicas e antimicrobianas do hipoclorito de sódio, 1% e 5%, da clorexidina 2%, aquosa e gel, e do HCT20, substâncias auxiliares na terapia do sistema de canais. 2003. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Toda substância absorve, transmite ou reflete luz em determinada amplitude de comprimento de onda. Tendo isso em vista, os resultados foram analisados com a utilização do espectrofotômetro (UV-M51® - BEL Photonics), que mensura o quanto determinada substância absorve e transmite luz. Esses parâmetros são obtidos a partir do grau de absorbância e transmitância de luz que passa através da amostra.

Dessa forma, com o objetivo de quantificar, inferiu-se que quanto maior o valor de absorbância da amostra, maior será a

concentração desta substância, que para este estudo significa que maior será a quantidade de bactérias, acompanhando os parâmetros da escala de McFarland. E assim, menor capacidade antimicrobiana da substância irrigadora⁹.

O material contido nos tubos de ensaios foi colocado em cubetas de vidro e levado ao espectrofotômetro configurado com comprimento de onda de 600nm. A leitura foi realizada de modo que cada amostra de cada grupo fosse posicionada no mesmo compartimento do espectrofotômetro (Figura 7).



Figura 7- À direita o espectrofotômetro (UV-M51® - BEL Photonics) e à esquerda cubetas de vidro contendo amostras diferentes a serem analisadas.

Após análise, as amostras foram estratificadas e relacionadas com o respectivo grupo para observação de desempenho no controle da carga microbiana existente, comparado aos controles.

RESULTADOS

Os resultados obtidos no espectrofotômetro foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis, por meio do software estatístico Jamovi®, pois foram analisadas 6 amostras

independentes e 2 delas tiveram distribuição anormal no teste de Shapiro-Wilk.

Em nenhuma das substâncias irrigadoras analisadas foi observada capacidade antimicrobiana que conseguisse eliminar todas as cepas bacterianas dos canais. O teste de Kruskal-Wallis, apontou valor de $p < 0,001$, revelando uma diferença estatisticamente significativa entre as substâncias irrigadoras. Para comparar as amostras entre si foi utilizado o método Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 - Teste de *Kruskal-Wallis* ¹

	χ^2	df	p
Absorbância	37.5	5	< .001

¹ Realizado pelo software *Jamovi*®.

Tabela 4 - Método Dwass-Steel-Critchlow-Fligner¹

		W	p
COM	COB	-2.12	0.663
COM	AO	5.06	0.005
COM	C+O	-3.93	0.060
COM	CP	-3.93	0.060
COM	CN	3.00	0.276
COB	AO	5.06	0.005
COB	C+O	-5.06	0.005
COB	CP	-5.06	0.005
COB	CN	3.00	0.276
AO	C+O	-5.06	0.005
AO	CP	-5.06	0.005
AO	CN	-3.00	0.276
C+O	CP	1.31	0.940
C+O	CN	3.00	0.276
CP	CN	3.00	0.276

¹ Comparação dos graus de absorvência das amostras entre si.

A água ozonizada e o controle negativo não tiveram diferença estatística significativa entre si. Porém, a água ozonizada apresentou diferença significativa quando comparada às outras amostras, tendo uma eficácia inferior. Já o controle negativo não apresentou diferença significativa. Porém, isso pode ser atribuído pelo número de amostras reduzido comparado aos demais grupos.

A clorexidina 2% mono ozonizada e bi ozonizada não mostrou diferença significativa

entre si, porém se mostraram menos eficazes quando comparados ao controle positivo e a clorexidina 2% associado ao gás ozônio. A clorexidina 2% associada ao gás ozônio não apresentou diferença estatística quando comparada ao controle positivo, sendo os grupos com melhor desempenho antimicrobiano. Para melhor compreensão, foi estruturado um gráfico comparativo, a partir das medianas obtidas em cada grupo (Figura 8).

Substâncias irrigadoras X Grau de absorvência

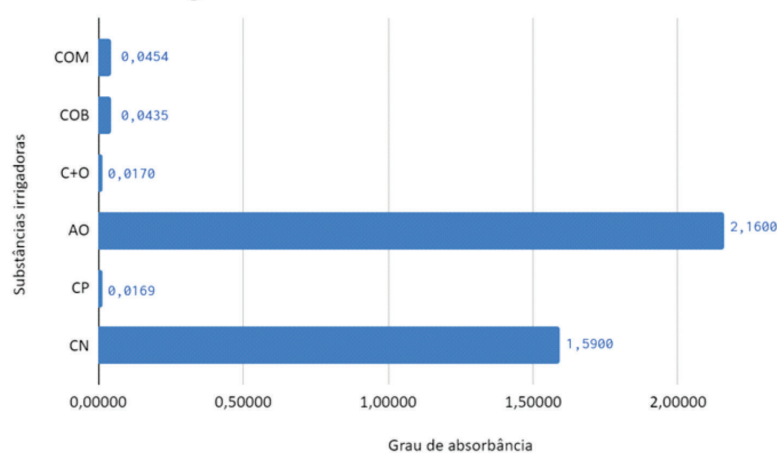


Figura 8- Gráfico comparativo entre as medianas das amostras. Sendo COM - clorexidina mono ozonizada, COB - clorexidina bi ozonizada, AO - água ozonizada, CI - clorexidina pura, C + O - clorexidina + gás ozônio, CP - controle positivo (clorexidina 2%) e CN - controle negativo (soro). E o grau de absorvência medido em nm.

A água ozonizada teve índice de absorbância que se aproximou do controle negativo, indicando a ineficácia antimicrobiana da solução irrigadora. A clorexidina 2% mono ozonizada e bi ozonizada tiveram grau de absorbância próximos, indicando que a diferença na técnica não teve grande relevância na prática. Além disso, a clorexidina 2% mono ozonizada e bi ozonizada tiveram grau de absorbância maior o digluconato de clorexidina 2% puro (controle positivo), o que demonstra que a ozonização da clorexidina teve um impacto negativo sobre o ponto de vista de ação antimicrobiana. Por fim, a irrigação de clorexidina 2% seguida de aplicação do gás ozônio demonstrou grau de absorbância muito próximo do controle positivo, o que se deduz que o gás ozônio não contribuiu com o efeito antimicrobiano da clorexidina.

DISCUSSÃO

Esse trabalho buscou apontar por meio de um resultado qualitativo qual a associação do digluconato de clorexidina 2% com gás ozônio apresentou comportamento antimicrobiano superior ao digluconato de clorexidina 2% puro quando aplicados como substâncias auxiliares no sistema de canais. Para tanto, foram utilizados modelos que se aproximaram da realidade clínica com a contaminação do sistema de canais, em dentes bovinos, obtidos diretamente de frigoríficos de animais abatidos para indústria alimentícia^{18,28}. Dessa maneira, não houve implicação ética no desenvolvimento do presente trabalho. O modelo experimental apresentado foi considerado satisfatório devido à similaridade na estrutura de canais de dentes bovinos evidenciada em dentes humanos⁸.

Para a contaminação dos canais foram selecionadas cepas de *E. faecalis* como microrganismo de referência para a presente análise. Essas bactérias são frequentemente evidenciadas nas infecções endodônticas e apresentam significativo perfil de resistência à ação química^{20,28}.

Dessa forma, esse trabalho buscou traçar uma estratégia de utilização de substâncias auxiliares no sistema de canais para tratamento clínico mais eficaz contra canais contaminados que necessitem de

substâncias com potencial antimicrobiano satisfatório para cada caso e que gerem menos danos teciduais.

Para verificar o nível de turvação das amostras foi adotado como padrão a reconhecida escala nefelométrica de McFarland, que analisa a quantidade de microrganismos em meio líquido. Nas amostras do controle negativo e água ozonizada as medianas da absorbância obtidas foram de 1,59 nm e 2,16 nm, respectivamente. Dessa forma, o grau de opalescência seguindo o padrão de McFarland é entre 7-10, o que corresponde a uma quantidade entre 2.100.000 e 3.000.000 unidades formadoras de colônias (UFCs) por ml de meio de cultura. Assim, identificou-se que essas substâncias irrigadoras não foram efetivas na redução significativa das cepas de *E. faecalis*.

As amostras de clorexidina 2% mono e bi ozonizada, clorexidina 2% associada ao gás ozônio e o controle positivo apresentaram medianas da absorbância de 0,054 nm, 0,043 nm, 0,017 e 0,016, respectivamente. Assim, o grau de opalescência seguindo o padrão de McFarland é de zero, o que se considera que por ml da substância pode ter até 300.000 UFCs. Isso sugere que essas substâncias foram capazes de reduzir a carga antimicrobiana, entretanto, a clorexidina 2% mono e bi ozonizada não mostraram reduções estatisticamente significantes. Além disso, em consonância com Estrela et al. 2007¹⁰, nenhuma destas substâncias irrigadoras foi suficiente para inativar o *E. faecalis*. Isso reforça a necessidade e grande influência da instrumentação mecânica na limpeza do sistema de canais^{2,5}.

O uso clínico do ozônio na odontologia pode ser por meio da solução aquosa, gás e óleo²². Sua ação antimicrobiana se dá pelo elevado potencial antioxidante, supõe-se que o ozônio se dissocia rapidamente em água e libera uma forma reativa de oxigênio que ataca as glicoproteínas, glicolipídeos, grupos sulfidríla de algumas enzimas e outros aminoácidos presentes nas paredes celulares e membranas citoplasmáticas de bactérias e fungos, e com este processo a célula se desintegra^{1,7,21,25}. Assim, o ozônio demonstra ser um eficaz antimicrobiano que age de modo rápido, sem gerar subprodutos tóxicos e sem induzir resistência aos medicamentos^{7,21,24}.

Além disso, o ozônio apresentou maior tolerância tecidual quando comparado aos antissépticos comumente usados na odontologia^{12,15}.

Entretanto, a molécula ozônio (O₃) rapidamente se transforma em oxigênio puro (O₂) e por isso, é um gás bastante instável. Estima-se uma meia-vida de quarenta minutos a 20°C para esse gás e quando vinculado a veículos aquosos essa conversão é acelerada. Dessa forma, entende-se que o ozônio não deve ser armazenado e seu uso deve ser imediato^{11,26}.

Alguns estudos mostram que o método de irrigação influencia significativamente no efeito antimicrobiano do ozônio. No estudo de Hubbezoglu et al. (2014)¹¹ a irrigação do ozônio aquoso utilizando a técnica manual não alcançou a desinfecção total do canal. Já nas amostras que utilizaram a irrigação com o aparelho de ultrassom mostraram eliminação completa de *E. faecalis* nos canais radiculares. Resultados parecidos foram obtidos no estudo de Nagayoshi et al. (2004)¹⁶. Por fim, o estudo de Lynch (2018)¹⁵ afirmou que o ozônio funciona melhor quando há menos detritos orgânicos residuais no canal, assim recomenda-se usar água ozonizada ou gás ozônio ao final do processo de limpeza e modelagem do canal.

No presente estudo, a água ozonizada foi irrigada da forma convencional - manual, por meio de uma seringa. Os resultados não mostraram eficácia na eliminação de *E. faecalis* do canal radicular. Estes resultados diferem dos estudos citados acima e isso possivelmente pode ser atribuído a diferenças metodológicas, como forma de irrigação, tempo de exposição e concentração do ozônio. Dessa forma, esses fatores não poderão permitir uma comparação fidedigna. Em consonância com este estudo, o trabalho de Estrela et al. (2007)¹⁰ demonstrou que a irrigação com água ozonizada não foi suficiente para inativar *E. faecalis*.

No estudo de Santiago (2019)²³, observou-se que raízes bovinas, contaminadas com *E. faecalis*, irrigadas com hipoclorito de sódio à 5%, hipoclorito de sódio à 2,5% e clorexidina à 2% apresentaram potencial antimicrobiano semelhantes e eficazes e que estes diferiram dos resultados obtidos com as amostras irrigadas com água ozonizada

(concentração de 60 µg/mL), que apresentou resultados próximos à água destilada (controle negativo). Além disso, a referida pesquisa analisou as amostras 48 e 72 horas após a irrigação, cujo resultado se assemelhou ao presente trabalho, retratando que a irrigação com água ozonizada não parece haver efeito antimicrobiano residual. Ademais, foi analisado também o efeito da água ozonizada em consonância com ultrassom e Easy Clean® na limpeza de canais, que revelou não haver diferença estatística entre as amostras.

A aplicação do gás ozônio para desinfecção de canais radiculares ainda é controversa na literatura. Segundo Huth et al. (2009)¹³, sua aplicação gasosa em alta concentração foi eficaz contra os microrganismos *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. micros* e *P. aeruginosa* contidas no biofilme. Já no estudo de Noites et al. (2007)¹⁷ a aplicação de gás ozônio não foi capaz de inativar o *E. faecalis*. Apenas a aplicação mais duradoura, de 180 segundos, apresentou redução das colônias de bactéria. Entretanto, quando 24 segundos de gás ozônio foi aplicado imediatamente após a irrigação com clorexidina 2%, pareceu apresentar sinergismo no efeito antimicrobiano e eliminou completamente o *E. faecalis*.

No presente estudo houve a irrigação com clorexidina 2%, seguido da aplicação de 20 segundos do gás ozônio à uma concentração de 60 µg/mL. O resultado obtido neste grupo foi muito próximo do grupo controle (clorexidina 2%), sendo estatisticamente irrelevante a diferença entre eles. Assim, constata-se que a aplicação do ozônio não potencializou o efeito antimicrobiano.

Além disso, foi estabelecido um protocolo de ozonização da clorexidina 2%, nunca descrito, no intuito de analisar se o ozônio seria capaz de incrementar seu efeito antimicrobiano nessa concentração. O gás foi produzido pelo gerador de ozônio, programado em concentração de 20 µg/mL. Ele foi borbulhado em cerca de 600 ml de digluconato de clorexidina 2% (clorexidina mono ozonizada), o líquido formou uma espuma que foi extravasada a outro recipiente estéril (clorexidina bi ozonizada), voltando ao estado líquido posteriormente. Em seguida, foi realizada a irrigação dos canais, em um grupo foi irrigado com o líquido do primeiro

recipiente e em outro grupo foi irrigado com a substância do segundo recipiente. Sob essas condições, as amostras de clorexidina 2% mono e bi ozonizadas não apresentaram diferenças significativas entre seus resultados. Houve redução nas colônias de *E. faecalis*, entretanto não foi significativa e o resultado foi inferior ao controle positivo (clorexidina 2%).

Dessa forma, são necessárias maiores análises para entender o comportamento molecular dessa associação que levou à redução do efeito antimicrobiano do digluconato de clorexidina 2%.

Por fim, são necessários mais estudos na área, com ampliação de amostras, a fim de estabelecer concentrações ideais e associações de compostos que produzam melhor eficácia na desinfecção completa do sistema de canais radiculares. Em consonância, é necessário analisar sua aplicabilidade em situações clínicas.

CONCLUSÃO

No presente estudo, o potencial antimicrobiano da água ozonizada mostrou-se baixo ou nulo. As amostras de clorexidina 2% mono e bi ozonizada tiveram resultados inferiores comparadas à irrigação com clorexidina 2% pura, assim deduz-se que o ozônio contribuiu negativamente na solução. Por fim, a irrigação com clorexidina 2% associada ao gás ozônio apresentou efeito similar à clorexidina 2% pura (controle positivo), revelando que não houve sinergismo antibacteriano das soluções associadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à equipe do Laboratório de Endodontia e Biomateriais do Departamento de Odontologia da UnB e à equipe do projeto de Ozonioterapia da Clínica de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília Ebserh/UnB.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry*. 2008;36(2):104–116.

2. Baugh D, Wallace J. The role of apical instrumentation in root canal treatment: a review of the literature. *Journal of endodontics*. 2005;31(5):333-340.

3. Bonan RF, Batista AUD, Hussne RP. Comparação do uso do hipoclorito de sódio e da clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 2011; 15(2): 237-244.

4. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology*. 1985;1(5):170-175.

5. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *European Journal of Oral Sciences*. 1981;89(4):321-328.

6. Câmara AC, Albuquerque MM, Aguiar CM. Soluções irrigadoras utilizadas para o preparo biomecânico de canais radiculares. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2010;10(1):127-133.

7. Crespo GD. Os efeitos da ozonioterapia na desinfecção dos canais radiculares comparado e associado a outros métodos de desinfecção: uma revisão de literatura. Serra (ES): Rede de ensino Doctum; 2021.

8. da Cruz Campos MI, Campos CN, Vitral RWF. O Uso de dentes bovinos como substitutos odontológicos de dentes humanos em pesquisas: uma revisão da literatura. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2008;8(1):127-132.

9. Espectrofotometria: Análise da concentração de soluções. São José do Pinhais: Kasvi; acesso em 16/03/2023. Disponível em: <https://kasvi.com.br/espectrofotometria-analise-concentracao-solucoes/>.

10. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *International Endodontic Journal*. 2007;40:85-93.
11. Hubbezoğlu I, Zan R, Tunc T, Sumer Z. Antibacterial efficacy of aqueous ozone in root canals infected by *Enterococcus faecalis*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014;7(7).
12. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *European journal of oral sciences*. 2006;114(5):435-440.
13. Huth, K. C., Quirling, M., Maier, S., Kamereck, K., Alkhayer, M., Paschos, E., et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *International Endodontic Journal*. 2009;42(1):3-13.
14. Lopes H, Siqueira JF Jr. "Irrigação dos canais radiculares". In: Lopes HP, Siqueira JFJ, editores. *Endodontia: biologia e técnica*. 5ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan Ltda; 2020. p. 468-496.
15. Lynch, E. Evidence-based efficacy of ozone for root canal irrigation. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 2008;20(5):287-293.
16. Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T., Terashita, M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of endodontics*. 2004;30(11):778-781.
17. Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Carvalho MF, Gonçalves A, Pina-Vaz I. Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. *BioMed research international*. 2014;2014.
18. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in South Korean population. *Journal of endodontics*. 2004;30(7):504-508.
19. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Lopes HP. Medicação intracanal. In: Lopes HP, Siqueira JFJ, editores. *Endodontia: biologia e técnica*. 5ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan Ltda; 2020. p. 497-520.
20. Rôças IN, Siqueira JF Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus Faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics*. 2004;30(5):315-320.
21. Rojas-Valencia MN. Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 2011;1:263-271.
22. Saini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 2011;2(2):151.
23. Santiago LM. Avaliação do potencial antimicrobiano da água ozonizada, digluconato de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 2, 5%, na terapia endodôntica de incisivos bovinos contaminados com *Enterococcus faecalis*: um estudo in vitro. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2019.
24. Sen S, Sen S. Ozone therapy a new vista in dentistry: Integrated review. *Medical Gas Research*. 2020;10(4):189-192.
25. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. *International endodontic journal*. 2020;53(3):317-332.
26. Silva, Y. D. C., da Silva, A. G. S., Martins, G. B., Sanches, A. C. B., de Lima Dantas, J. B., & Fortuna, T. Ozônio como agente antimicrobiano na odontologia: revisão de literatura. *Revista Da Faculdade De Odontologia Da Universidade Federal Da Bahia*. 2021;51(3):97-107.
27. Siqueira Jr JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *Journal of*

endodontics. 1996;22(12):674-676.

28. Siqueira JF Jr., Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology. 2004;97(1):85-94.

29. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. Ph changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. Journal of endodontics. 1981; 7(1):17-21.