



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

RAFAEL DA SILVA GOULART

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE COM
OZÔNIO NOS CANAIS RADICULARES**

RIBEIRÃO PRETO
2025

RAFAEL DA SILVA GOULART

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE COM
OZÔNIO NOS CANAIS RADICULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. André Pitondo da Silva.

Ribeirão Preto
2025

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da
Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Goulart, Rafael da Silva, 1991.

G694a Avaliação da terapia antimicrobiana adjuvante com ozônio nos canais
radiculares

- - Ribeirão Preto. 75 f.: il. 2025color.

Orientador: Prof. Dr. André Pitondo da Silva

Tese (Doutorado) – Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Odontologia,
área de concentração: Endodontia. Ribeirão Preto, 2025.

1.Endodontia. 2.Ozonioterapia. 3. Biofilme bacteriano. 4. Solução irrigante.
5.Descontaminação.

CDD 617.6

RAFAEL DA SILVA GOULART

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE COM
OZÔNIO NOS CANAIS RADICULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração Endodontia. Orientador: Prof. Dr. André Pitondo da Silva.

Área de concentração: Endodontia.

Data da defesa: 23 de abril de 2025.

Resultado: Aprovado.

BANCA EXAMINADORA



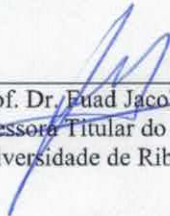
Prof. Dr. André Pitondo da Silva
Professor Assistente Doutor do Curso de Odontologia
Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp) - Presidente



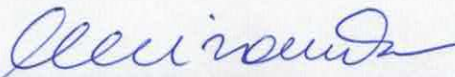
Prof. Dr. Carlos Estrela
Professor Titular da Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Goiás (UFG)



Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
Professora Associada da Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)



Prof. Dr. Euad Jacob Abi Rached Junior
Professor Titular do Curso de Odontologia
Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp)



Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda
Professor Assistente Doutor do Curso de Odontologia
Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp)

RIBEIRÃO PRETO

2025

DEDICATÓRIA

A Deus, agradeço profundamente pela força que me deu nos momentos de fraqueza, pela sabedoria que ilumina minhas escolhas nos cruzamentos da vida, e pela coragem que me impulsionou a questionar as realidades estabelecidas e a sempre sonhar com um mundo novo de oportunidades.

A minha família, minha eterna âncora, sou imensamente grato pelas palavras de incentivo, pelo amor incondicional e pela paciência que constantemente demonstraram. Pelo carinho e dedicação que sempre me ofereceram, fazendo-se presentes em cada passo da minha jornada. Obrigado por acreditarem em mim, por sempre desejarem meu sucesso e por serem, de fato, uma parte essencial da minha formação, tanto profissional quanto pessoal.

Aos meus amigos, minha gratidão vai além das palavras. Obrigado por me ouvirem nos momentos de dúvida, por me aconselharem com amor e por estarem ao meu lado incondicionalmente. Pela compreensão e pelo carinho que me acompanharam por toda a caminhada, senti o que é ter a verdadeira amizade ao alcance. Sem cada um de vocês, meus sonhos seriam apenas sonhos, impossíveis de alcançar. Meu amor por todos vocês é eterno!

Sem o apoio, o afeto e a presença de todos vocês, meus sonhos não teriam encontrado um caminho para florescer. Obrigado por fazerem parte de cada conquista e tornarem tudo mais especial.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa do seu magnífico reitor **Prof. Dr. Sebastião Sérgio da Silveira**.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Prof^a. Dr^a. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, obrigada pelo empenho, dedicação, atenção, carinho e ajuda durante todos estes anos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. André Pitondo da Silva**, exemplo de seriedade e competência, expresso minha profunda gratidão pela orientação, dedicação, inspiração e disponibilidade. Sua paciência e carinho ao longo de todos estes anos foram fundamentais para minha trajetória, tornando este caminho mais enriquecedor e significativo.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. André Pitondo da Silva, Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, Prof., Prof. Dr. Milton Faria Junior, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior, Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni, Profa. Dra. Izabela Cristina Mauricio Moris, Profa. Dra. Larissa M. S. C. Raucci, Prof., Prof. Dr. Walter Raucci Neto e a Profa. Dra. Yara T. Corrêa Silva Sousa**, pela dedicação, atenção, pelos conhecimentos repassados e colaboração na minha formação.

Aos meus companheiros e amigos de doutorado em Odontologia, **Victoria Gabriela Louzada, Adrielle Fracaroli, Baltazar, José Doval Neto, Marlon Celso Ozelin, Felipe Letieri, Isabela Massaro Ribeiro Juzzo**, pelo convívio que, sem dúvidas, marcou nossas vidas e por tornarem este caminho mais enriquecedor e prazeroso.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Brufato Ferraz**, minha profunda gratidão por todo o conhecimento compartilhado e pelo apoio incondicional nos momentos de dificuldade, sempre estando presente e disposto a me auxiliar no que fosse necessário. Tenho uma enorme consideração por você, tanto pelo profissional inspirador que é quanto pela pessoa incrível que sempre esteve ao meu lado.

Ao **Prof. Dr. Edson Alfredo**, minha gratidão pelos ensinamentos compartilhados, pela dedicação em esclarecer dúvidas e pelo tempo disponibilizado ao longo da minha trajetória. Agradeço também pela amizade construída desde os tempos de graduação até o presente momento, em que seguimos como colegas de profissão.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda**, uma pessoa incrível e com um enorme coração, que tornou meus dias mais leves e divertidos. Sua presença sempre alegre, acompanhada de um sorriso no rosto e de um vasto conhecimento a compartilhar, fez toda a diferença nesta caminhada.

Aos **Professores Dr. Luiz Pascoal Vansan e Dr. José Antonio Saadi Salomão**, meu sincero agradecimento por compartilharem suas experiências e conhecimentos, além das valiosas conversas que ajudaram a aliviar a ansiedade e os receios diante dos desafios futuros.

Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto, por todos os bons momentos em que estivemos juntos, pela atenção e carinho que tiveram por mim durante esses anos de convívio, desde a graduação.

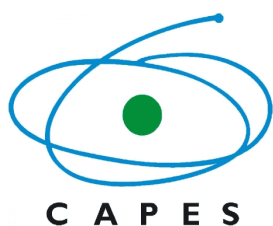
Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), em especial ao **Prof. Dr. André Pitondo da Silva**.

Ao técnico **José Augusto Maulin**, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo, pelo auxílio técnico na coleta das fotomicrografias das análises feito empregando a microscopia eletrônica de varredura.

Às funcionárias do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) pelo auxílio nos laboratórios.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP)**, pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

Todo mundo quer uma vida feliz sem dificuldades ou sofrimento. Criamos muitos dos problemas que enfrentamos. Ninguém intencionalmente cria problemas, mas nós tendemos a ser escravos para poderosas emoções como a raiva, o ódio e o apego que baseiam-se em projeções erradas sobre as pessoas e coisas. Temos de encontrar maneiras de reduzir essas emoções eliminando a ignorância que os sustenta e aplicar forças opostas. (Dalai Lama)



Este estudo foi realizado no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LABAC) da Universidade de Ribeirão Preto, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Processo 88887.493929/2020–00) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo Nº 2013/22581-5).

RESUMO

GOULART, R.S. **AVALIAÇÃO DA TERAPIA ANTIMICROBIANA ADJUVANTE COM OZÔNIO NOS CANAIS RADICULARES.** Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração Endodontia). Universidade de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Ribeirão Preto, 2025.

Durante o tratamento endodôntico, a eficiente desinfecção dos canais radiculares e túbulos dentinários ocorre pela ação mecânica dos instrumentos e pela ação química das soluções irrigantes, que devem apresentar alto poder antimicrobiano. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do ozônio em diferentes formulações de solução irrigante frente a biofilmes de *Enterococcus faecalis* NTCT 775, formados no sistema de canais radiculares (SCR) de dentes bovinos. A pesquisa foi realizada em 271 raízes de dentes bovinos, previamente preparadas com o sistema rotatório Protaper (F2, F3, F4, F5) e irrigadas com NaOCl 2,5% entre cada instrumento, seguido de EDTA 17% por 5 min. Concluída a instrumentação, as raízes foram esterilizadas e fixadas em tubos Eppendorf com resina acrílica incolor. Os espécimes foram distribuídos em 20 grupos, além de uma amostra para verificação do protocolo de esterilização. Esses grupos (n=10) foram destinados à análise de UFC para soluções com ou sem ozônio gasoso e água ozonizada em água ultrapura, análise qualitativa por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (n=4) e MEV para resistência de união (n=2): PBS; NaOCl 2,5%; Clorexidina 2%; ozônio gasoso (15, 30, 60 µg/mL); Água ozonizada 15 µg/mL; óleo de semente de girassol ozonizado (330, 660 mmolEq/Kg); ozônio gasoso (15, 30, 60 µg/mL) + NaOCl 2,5%; ozônio gasoso (15, 30, 60 µg/mL) + Clorexidina 2%; e, para *push-out*, NaOCl 2,5%, Clorexidina 2%, remoção de óleo ozonizado com NaOCl 2,5% e remoção de óleo ozonizado com NaOCl 2,5% + Passive Ultrasonic Irrigation (PUI). Para a formação do biofilme, os condutos foram inoculados com *E. faecalis* (escala 1 de McFarland) por 21 dias, substituindo-se diariamente o inóculo para manter bactérias viáveis. Após esse período, realizou-se a desinfecção com as soluções de acordo com cada grupo, seguida pela coleta de dados e análise estatística. Os resultados indicaram que o óleo ozonizado 660 µg/mL teve ação antimicrobiana semelhante ao NaOCl 2,5%, enquanto a Clorexidina 2% ativada por ozônio gasoso 60 µg/mL obteve a maior taxa de descontaminação. Na análise de MEV, grupos com NaOCl 2,5% apresentaram algumas colônias e erosão dentinária; aqueles com óleo ozonizado exibiram resíduo oleoso e poucas colônias aderidas; já a clorexidina 2% associada ao ozônio gasoso (60 µg/mL) mostrou ausência de microrganismos e túbulos não obstruídos. Nos testes de *push-out*, a remoção de óleo somente com NaOCl 2,5% apresentou os menores valores, enquanto NaOCl 2,5% + PUI teve melhor desempenho, mas ainda inferior aos grupos de NaOCl 2,5% e clorexidina 2%. Concluiu-se que o óleo ozonizado possui eficácia estatisticamente psimilar ao NaOCl 2,5%, a ativação de clorexidina 2% pelo ozônio gasoso promove ação sinérgica, aumentando o poder de descontaminação do SCR e a remoção do óleo ozonizado com NaOCl 2,5% + PUI aumenta a resistência de união do cimento.

Palavras-chave: Endodontia. Ozonioterapia. Biofilme bacteriano. Solução Irrigante. Descontaminação.

ABSTRACT

GOULART, R.S. **EVALUATION OF ADJUNCTIVE ANTIMICROBIAL THERAPY WITH OZONE IN ROOT CANALS.** Thesis (Ph.D. in Dentistry, area of concentration: Endodontics). University of Ribeirão Preto, Postgraduate Program in Dentistry. Ribeirão Preto, 2025.

During endodontic treatment, effective disinfection of the root canals and dentinal tubules is achieved through the mechanical action of instruments and the chemical activity of irrigating solutions, which must exhibit strong antimicrobial properties. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of ozone in various irrigant formulations against *Enterococcus faecalis* NTCT 775 biofilms formed within the root canal system (RCS) of bovine teeth. The study was conducted using 271 bovine tooth roots, previously prepared with the Protaper rotary system (F2, F3, F4, F5) and irrigated with 2.5% NaOCl between each instrument, followed by 17% EDTA for 5 minutes. Upon completion of instrumentation, the roots were sterilized and fixed in Eppendorf tubes using clear acrylic resin. The specimens were allocated into 20 groups, in addition to a control sample for verifying the sterilization protocol. These groups (n=10) were designated for CFU analysis of solutions with or without gaseous ozone and ozonated water in ultrapure water, qualitative analysis using scanning electron microscopy (SEM) (n=4), and SEM for bond strength testing (n=2): PBS; 2.5% NaOCl; 2% chlorhexidine; gaseous ozone (15, 30, 60 µg/mL); ozonated water 15 µg/mL; ozonated sunflower seed oil (330, 660 mmolEq/Kg); gaseous ozone (15, 30, 60 µg/mL) + 2.5% NaOCl; gaseous ozone (15, 30, 60 µg/mL) + 2% chlorhexidine; and for push-out testing: 2.5% NaOCl, 2% chlorhexidine, removal of ozonated oil with 2.5% NaOCl, and removal of ozonated oil with 2.5% NaOCl + Passive Ultrasonic Irrigation (PUI). For biofilm formation, the canals were inoculated with *E. faecalis* (McFarland scale 1) for 21 days, with daily replacement of the inoculum to maintain viable bacteria. After this period, disinfection was performed using the respective group solutions, followed by data collection and statistical analysis. Results showed that ozonated oil at 660 µg/mL exhibited antimicrobial activity similar to 2.5% NaOCl, while 2% chlorhexidine activated by 60 µg/mL gaseous ozone demonstrated the highest decontamination rate. SEM analysis revealed that groups treated with 2.5% NaOCl presented some microbial colonies and dentin erosion; those treated with ozonated oil exhibited residual oily layers and few adherent colonies; 2% chlorhexidine associated with 60 µg/mL gaseous ozone showed absence of microorganisms and unobstructed dentinal tubules. In push-out tests, removal of ozonated oil with 2.5% NaOCl resulted in the lowest bond strength values, whereas the combination of 2.5% NaOCl + PUI performed better, though still inferior to the 2.5% NaOCl and 2% chlorhexidine groups. It was concluded that ozonated oil is statistically as effective as 2.5% NaOCl; activation of 2% chlorhexidine with gaseous ozone enhances its decontamination efficacy through a synergistic effect; and the removal of ozonated oil using 2.5% NaOCl + PUI improves the bond strength of the sealer.

Keywords: Endodontics; Ozone Therapy; Bacterial Biofilm; Irrigating Solution; Decontamination.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.3 HIPÓTESE NULA	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. ÉTICA EM PESQUISA	23
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
3.3 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	25
3.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES	26
3.5 LINHAGEM BACTERIANA	29
3.6 INOCULAÇÃO DOS ESPÉCIMES	30
3.7 PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO DO CONDUTO RADICULAR	32
3.7.1 Aplicação do Ozônio Gasoso	33
3.7.3 Aplicação das Soluções Líquidas	34
3.7.4 Aplicação das soluções oleosas	35
3.8 PROTOCOLO DE COLETA DO BIOFILME	36
3.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	36
3.10 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	39
3.11 ANÁLISE DA RESISTENCIA DE UNIÃO	41
3.11.1 Protocolos de irrigação	42
3.11.2 Protocolo de Obtenção	42
3.11.3 Análise de <i>Push-out</i>	43
3.11.4 Microscopia eletrônica de varredura para análise da interface de união	46
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4 RESULTADOS	49
4.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS EM BIOFILMES BACTERIANOS	49
4.1.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias	49
4.1.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	51
4.3 TESTE DE PUSH-OUT	55
4.3.1 Ensaio do Tipo de Falha Ocorrida	56
4.3.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Nos tratamentos e retratamentos endodônticos, a eficaz descontaminação dos canais radiculares e dos túbulos dentinários é realizada pela ação física dos instrumentos, ação química e ativação das soluções irrigantes. Outro fator importante é o preenchimento tridimensional do canal radicular, com ausência de espaços vazios, de modo a visar a eliminação de microrganismos, incluindo bactérias potencialmente infecciosas, do sistema de canais radiculares (SCR) (Wu *et al.*, 2006; Ari *et al.*, 2010; Afkhami *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2024).

O SCR possui variações como istmos, canais acessórios e ramificações que podem, facilmente, abrigar colônias de bactérias (De Deus, 1975; Perez *et al.*, 1993; Berkiten *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2024). A redução da carga bacteriana garante uma melhor regeneração do tecido periapical, a qual é alcançada por meio da combinação do preparo e da desinfecção do canal radicular, enquanto o isolamento da baixa concentração de bactérias sobreviventes é obtido através de uma obturação adequada (Siqueira; Roças, 2008). O preparo e a desinfecção do canal radicular, envolvem a ampliação e modelagem dos canais, além da eliminação de bactérias e subprodutos, inclusive de áreas inacessíveis e não instrumentadas. O segundo passo, relativo ao isolamento das bactérias remanescentes, é fundamental para reduzir o risco de periodontite apical persistente (Cordeiro *et al.*, 2002; Ricucci *et al.*, 2003; Tonini *et al.*, 2022).

Para se alcançar esse objetivo, três passos devem ser realizados para a remoção eficaz dos microrganismos presentes no SCR, que são: instrumentação mecânica, uso de soluções irrigantes e ativação da solução irrigante (Ricucci *et al.*, 2009). A instrumentação mecânica é realizada com a utilização de limas manuais, rotatórias ou reciprocantes com o objetivo principal de proporcionar espaço para a utilização de soluções irrigantes, visto que 35 à 53% do canal radicular permanece intocado pela instrumentação, apresentando biofilme, formação da camada de *smear* em regiões de difícil acesso (Torabinejad *et al.*, 2002; Shabravan *et al.*, 2007; Hammad *et al.*, 2008). Tanto os microrganismos apresentados em biofilme como a camada de *smear* permanecem no SCR, reduzindo a aderência de material obturador e comprometendo os resultados em longo prazo (Fabricius *et al.*, 2006; Violich *et al.*, 2010).

Na microbiota oral, existem aproximadamente 700 espécies de micro-organismos (Dewhirst *et al.*, 2010; Krishnan *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Dentre estas espécies, encontra-se *Enterococcus faecalis*, um dos principais patógenos nosocomiais, que apresenta potencial para causar diversas infecções em humanos (Jett *et al.*, 1994; Richards *et al.*, 2000; Pöntinen *et al.*, 2021). Embora *E. faecalis* represente apenas uma pequena proporção da microbiota oral, essa espécie está associada a lesões periapicais persistentes (Zhang *et al.*, 2021; Elashiry *et al.*, 2023). Além disso, *E. faecalis* está entre as principais espécies bacterianas associadas a infecções secundárias do SCR, destacando-se por sua elevada capacidade de sobrevivência em condições adversas, como ambientes com baixos níveis de nutrientes e pH ácido, além de sua resistência aos tratamentos endodônticos convencionais (Sedgley *et al.*, 2006; Alkaoud *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024). Em função disso, os estudos relativos à avaliação da eficácia de irrigantes e medicamentos endodônticos se concentraram na eliminação da microbiota endodôntica. Esta bactéria pode resistir ao preparo químico-mecânico do tratamento endodôntico e a diversas medicações intracanal, como o hidróxido de cálcio, que causa elevação de pH (Elashiry *et al.*, 2023), sobrevivendo nos túbulos dentinários (em até 600 µm do seu interior) (Kaufman *et al.*, 2005; Berber *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006; Kayaoglu *et al.*, 2011). Frequentemente, a forma como este microrganismo se apresenta no interior do conduto radicular é dada em biofilme maduro e denso (Duggan, Sedgley., 2007; Kishen, Haapasalo., 2010).

O biofilme é definido como uma comunidade microbiana organizada, caracterizada por células que estão ligadas a um substrato, formado por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que apresentam fenótipos alterados de crescimento (Donlan, Costerton, 2002). Os biofilmes oferecem vários benefícios aos microrganismos, incluindo a proteção contra os agentes antimicrobianos, facilitam a fixação dos microrganismos em superfícies e a troca de nutrientes, que ajuda no transporte e retenção de nutrientes dentro do biofilme (Sharma *et al.*, 2024). Foram elucidados quatro mecanismos que conferem tolerância antimicrobiana às células organizadas em biofilme. O primeiro deve-se à presença da matriz, constituída basicamente de exopolissacarídeos, a qual funciona como uma barreira natural aos agentes antimicrobianos. Enzimas extracelulares produzidas pelas bactérias, como a β -lactamases, que degradam os antibióticos beta-lactâmicos podem ficar presas e

concentradas na matriz, inibindo a ação dos antibióticos (Anderl *et al.*, 2000). O segundo mecanismo envolve o estado fisiológico dos biofilmes, formando uma barreira que protege os microrganismos de substâncias antimicrobianas (Gebreyohannes *et al.*, 2019) e anticorpos do sistema imunológico do paciente (Jensen *et al.*, 2010). Além disso, o esgotamento de nutrientes pode forçar as bactérias a uma fase de crescimento latente ou estacionário, na qual ficam protegidas da ação dos agentes antimicrobianos (Portenier *et al.*, 2005). O terceiro mecanismo refere-se à tolerância antimicrobiana que os microrganismos presentes no biofilme possuem, devido à heterogeneidade metabólica. Estudos demonstraram que o oxigênio pode ser completamente consumido pelas células da superfície do biofilme, proporcionando nichos anaeróbicos mais adequados para a comunidade bacteriana anaeróbica (Wu *et al.*, 2018). O quarto mecanismo está relacionado à comunicação química entre os microrganismos, conhecida como “quorum sensing”, que regula a expressão de genes associados à virulência, formação e manutenção do biofilme, bem como à resistência antimicrobiana, contribuindo para a adaptação e sobrevivência das bactérias dentro dessas estruturas (Rutherford, Bassler, 2012). Devido à resistência adquirida pelos microrganismos organizados sob a forma de biofilmes, torna-se necessário o uso de soluções irrigantes com ação antimicrobiana contra essas estruturas.

As soluções irrigantes possuem como principal característica a ação antimicrobiana e, normalmente, são aplicadas no interior do canal radicular, utilizando seringa e ponta de inserção de metal. O fluxo volumétrico gerado pela irrigação é o principal fator para a desorganização e remoção de biofilme e da camada de *smear* (Andreani *et al.*, 2021; Tonini *et al.*, 2022). Porém, essa ação usualmente se restringe ao canal principal e às áreas adjacentes mais amplas por conta das limitações impostas pelo espaço e pela tensão superficial do irrigante (Giardino *et al.*, 2021). Com isso, mesmo a solução irrigante com maior potencial de ação, não terá efeito adequado caso não alcance seus alvos no SCR em quantidade suficiente (Boutsioukis, Arias-Moliz., 2022).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais utilizado na endodontia devido à sua potente ação antimicrobiana, especialmente contra infecções bacterianas (Arias-Moliz *et al.*, 2009, 2014; Ruiz-Linares *et al.*, 2017), além da capacidade de dissolver tecidos necróticos (Busanello *et al.*, 2019; Tejada *et al.*, 2019)

e reduzir fatores de virulência (Hong *et al.*, 2016). Sua eficácia depende da concentração, variando entre 0,5% e 8,25% (Cullen *et al.*, 2015; Demenech *et al.*, 2021), sem consenso sobre a melhor opção. Estudos sugerem que concentrações mais elevadas podem ser vantajosas (Fedorowicz *et al.*, 2012), mas não há diferença significativa na cicatrização de periodontite apical entre diferentes concentrações (Verma *et al.*, 2019; Ulin *et al.*, 2020). O NaOCl também pode alterar as propriedades mecânicas da dentina (Pascon *et al.*, 2009), mas esse efeito não é conclusivo para aumentar o risco de fraturas (Kishen, 2006). Além disso, seu extravasamento pode causar acidentes periapicais, sem evidências de que concentrações mais altas aumentem esse risco (Boutsioukis *et al.*, 2013a; Guivarc'h *et al.*, 2017).

A eficaz irrigação depende não apenas da concentração, mas também do volume, tempo de exposição e frequência de troca da solução, pois o NaOCl é rapidamente consumido por reações químicas com biofilmes e tecidos (Macedo *et al.*, 2010; Moorer, Wesselink., 1982; Tejada *et al.*, 2019). Embora a troca frequente do irrigante seja recomendada (Macedo *et al.*, 2010), a menor concentração pode comprometer a penetração e a difusão dos íons no sistema de canais radiculares. A exposição prolongada ao NaOCl melhora a remoção do biofilme (Chau *et al.*, 2015; Petridis *et al.*, 2019a), e estudos indicam que a interação entre concentração, volume, e tempo de irrigação é essencial para sua eficácia, justificando a falta de diretrizes unificadas sobre seu uso na prática endodôntica (Haapasalo *et al.*, 2010; Gazzaneo *et al.*, 2019).

O digluconato de clorexidina (CHX) é uma bisbiguanida catiônica amplamente utilizada como irrigante final, devido à sua incapacidade de dissolver tecidos, o que restringe seu uso como irrigante primário (Naenni *et al.*, 2004; Zehnder, 2006; Haapasalo *et al.*, 2012). Embora estudos iniciais tenham indicado que o CHX poderia ser tão eficaz quanto o hipoclorito de sódio (NaOCl) no combate a bactérias (Gomes *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2004), pesquisas mais recentes demonstram que sua atividade antimicrobiana é inferior à do NaOCl, além de não ser capaz de desestruturar a matriz do biofilme (Ruiz-Linares *et al.*, 2017; Tawakoli *et al.*, 2017; Busanello *et al.*, 2019). A variabilidade dos resultados em estudos clínicos pode estar relacionada às limitações metodológicas, como a coleta de amostras com cones de papel e a falta de padronização nos protocolos de instrumentação e irrigação (Sathorn *et al.*, 2007; Ruksakiet *et al.*, 2020).

O principal argumento a favor do CHX é sua capacidade de se ligar à dentina e proporcionar um efeito antimicrobiano prolongado, reduzindo a recolonização bacteriana (Komorowski *et al.*, 2000; Rosenthal *et al.*, 2004). No entanto, essa propriedade foi investigada sob condições experimentais pouco realistas, como a imersão prolongada de dentina em CHX (Boutsioukis, Arias-Moliz., 2022). Além disso, o CHX apresenta citotoxicidade comparável ou superior à do NaOCl (Vouzara *et al.*, 2016; Scott *et al.*, 2018) e pode reagir com resíduos de NaOCl no canal radicular, formando um precipitado tóxico de coloração marrom-alaranjado e capaz de causar descoloração (Basrani *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2021). Pelo fato de as soluções irrigantes não apresentarem todas as características necessárias, é realizada a combinação de irrigantes e sua ativação para potencializar a desinfecção (Mohammadi *et al.*, 2021; Tonini *et al.*, 2022). Com isso, uma alternativa que vem sendo estudada para uso na endodontia, para descontaminação do conduto radicular com menores efeitos adversos é o ozônio.

O Ozônio é um poderoso agente oxidante (United States Environmental Protection Agency, 2023), tem extensa ação bactericida, virucida e fungicida, que o caracteriza como um potencial agente na descontaminação de canais radiculares (Srikanth *et al.*, 2013). Apresenta baixa citotoxicidade para células orais por apresentar reversão em 48h (Floare *et al.*, 2021) e muito eficiente contra bactérias resistentes a antibióticos (Rangel *et al.*, 2022). Apresentando a fórmula O_3 , o ozônio é um gás natural, caracterizado por sua forma instável e energizada de oxigênio. Ele se dissocia rapidamente em oxigênio molecular (O_2) e oxigênio atômico (O), uma forma reativa com potencial oxidativo capaz de degradar células. Possui a capacidade de degradar biomoléculas e romper paredes celulares bacterianas (Boch *et al.*, 2016). Sua eficácia é maior em pH ácido, ao contrário do NaOCl, cuja ação de decomposição reduz significativamente entre pH 7 e 11 (Dash *et al.*, 2017). As três formas fundamentais de aplicação do ozônio são: água ozonizada, óleo ozonizado e gás oxigênio/ozônio (Pratyusha *et al.*, 2017).

O ozônio pode atuar como um agente oxidante de forma direta, ao se dissolver no plasma e outros fluidos biológicos, reagindo rapidamente com ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes, proteínas ricas em cisteína e carboidratos, ou de maneira indireta, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produtos da oxidação lipídica (LOP) (Viebahn-Haensler; Fernandez., 2021; Cenci *et al.*, 2022). A

ozonioterapia desencadeia uma cascata endógena que libera substâncias bioativas em resposta ao estresse oxidativo moderado e transitório induzido pelo ozônio, conhecido como estresse oxidativo. Devido à sua solubilidade no plasma, o ozônio induz esse estresse oxidativo ao reagir com ácidos graxos poli-insaturados e água, formando ROS nos fluidos e tecidos humanos. Dentre essas espécies, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) se destaca como o principal oxidante não radicalar (Cenci *et al.*, 2022). Simultaneamente, o ozônio gera LOPs, incluindo radicais lipoperoxídicos, hidroperóxidos, malondialdeído, isoprostanos, ozonídeos, alquenos e, principalmente, 4-hidroxinonenal. Tanto ROS quanto LOPs são moléculas efetoras responsáveis pela modulação de diversos efeitos biológicos e terapêuticos da ozonioterapia (Cenci *et al.*, 2022; Scassellati *et al.*, 2020).

O ozônio gasoso é utilizado como um método de desinfecção adjuvante e tem sido sugerido para ser usado clinicamente no tratamento endodôntico, os resultados de estudos atuais sobre sua eficácia contra patógenos endodônticos têm se apresentado consistentes para sua utilização (Silva *et al.*, 2020; Shetty *et al.*, 2022; Veneri *et al.*, 2025). Porém, permanecem questões sobre a duração e a concentração adequada do ozônio gasoso que deve ser usado, visto que sua ação é intrinsecamente relacionada ao protocolo realizado (Noites *et al.*, 2014; Araujo *et al.*, 2024). O ozônio apresenta efeito antibacteriano em células de *E. faecalis* planctônicas, porém, necessita de concentrações mais elevadas para atuar em biofilmes (Tuncer *et al.*, 2023).

A água e os óleos ozonizados possuem a capacidade de capturar o ozônio e liberar ozônio e radicais livres de oxigênio (Megahed *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2019) tendo no óleo a presença de ozonídeos e peróxidos que atuam na descontaminação (Sega *et al.*, 2010). No entanto, o ozônio dissolvido em água é altamente instável em temperatura ambiente ou elevada, e sua concentração depende da temperatura e da pureza da água utilizada. Quanto menor a temperatura, maior o tempo de ação, sendo essencial seu uso imediato após a geração (Galdeano *et al.*, 2018). Em contraste, quando incorporado em uma base oleosa, sua estabilidade aumenta significativamente, permitindo sua conservação por até 2 anos em ambiente refrigerado (Brito-Júnior *et al.*, 2022). Nesse processo, o ozônio reage quimicamente com o óleo, formando moléculas longas e complexas. A ozonização em base de óleo resulta na produção de ozonídeos específicos que realizam a formação de peróxidos

que atuam na ação antimicrobiana por meio de uma poderosa oxidação (Sega *et al.*, 2010). Estudos realizados por Kishore *et al.* (2016) mostraram que o óleo ozonizado apresenta maior eficácia antibacteriana contra *E. faecalis* em comparação com o hidróxido de cálcio e uma combinação de ambos. Porém, por se tratar de uma solução viscosa, apresenta difícil remoção do canal radicular, assim como o hidróxido de cálcio, com isso deve-se potencializar a ação de remoção implementando formas de agitação no interior do canal radicular, uma das formas de agitação é à agitação passiva por meio de ultrassom (PUI) (Narimatsu *et al.*, 2021; Ragab *et al.*, 2022).

Os sistemas de ativação da irrigação são uma alternativa para melhorar a eficiência dos irrigantes (Gu *et al.*, 2009). Eles promovem a movimentação e distribuição da solução dentro do SCR, otimizando a remoção de resíduos por meio da limpeza química da superfície e erosão (Macedo *et al.*, 2013). Além disso, esses sistemas reforçam a ação antimicrobiana da preparação químico-mecânica em canais radiculares infectados (Virdee *et al.*, 2018).

Dentre esses sistemas, se destaca o PUI, que se baseia na transmissão de energia acústica através do irrigante, utilizando uma lima endodôntica ou inserto de aço inoxidável (van der Sluis *et al.*, 2007). Essa energia gerada provoca cavitação e microfluxos no irrigante, promovendo sua movimentação eficiente ao longo do sistema de canais radiculares (Verma *et al.*, 2020). As ondas acústicas criam bolhas de cavitação que, ao colapsarem, liberam energia, a qual é transmitida para as paredes do canal, removendo os detritos presentes. O efeito de remoção é potencializado pelos microfluxos, que transportam os resíduos coronariamente (Huffaker *et al.*, 2010). A eficácia do PUI é atribuída à formação de nós ao longo do inserto, que mantém a intensidade do fluxo acústico mesmo quando o instrumento entra em contato com a parede do canal (Lea *et al.*, 2009). Com isso, sugere-se que possa potencializar a remoção do óleo ozonizado do interior do canal radicular.

Com base nos desafios apresentados com relação à ação antimicrobiana no SCR durante o tratamento endodôntico e às limitações associadas aos agentes antimicrobianos tradicionais, como hipoclorito de sódio e clorexidina, destaca-se a necessidade de investigar alternativas eficazes e seguras a esses procedimentos e a esses agentes. Nesse contexto, o ozônio e sua associação com outras soluções para melhor atividade antimicrobiana emergem como uma opção promissora devido às suas propriedades antimicrobianas, capacidade oxidativa e baixa toxicidade em

células orais. Ainda são necessários estudos quanto à eficácia do ozônio no tratamento endodôntico, especialmente em biofilmes densos e maduros, visando otimizar sua aplicação em tratamentos endodônticos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em biofilmes maduros de *E. faecalis*, a atividade antimicrobiana, a remoção do biofilme e o efeito na resistência de união do cimento endodôntico após a aplicação de água ozonizada, ozônio gasoso, óleo de girassol ozonizado, hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina a 2% e da combinação de ozônio gasoso com hipoclorito de sódio a 2,5%, clorexidina a 2% e o uso complementar do PUI para remoção do óleo ozonizado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana de água ozonizada, ozônio gasoso, óleo de girassol ozonizado, em comparação ao hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina 2% em biofilmes de *E. faecalis*;
- Avaliar a associação do ozônio gasoso ao NaOCl 2,5% e clorexidina 2% em comparação a não associação, na descontaminação de biofilme de *E. faecalis*;
- Analisar a presença de biofilme ou bactérias aderidas na superfície interna do canal radicular após os diferentes protocolos de desinfecção, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Analisar a resistência de união do cimento obturador à base de resina epóxica às paredes dos canais radiculares, após os diferentes protocolos de remoção de óleo de semente de girassol ozonizado com e sem PUI, por meio de *push-out*;
- Analisar qualitativamente a interface de união do cimento obturador à base de resina epóxica às paredes dos canais radiculares após os diferentes protocolos de remoção do óleo de girassol ozonizado com e sem PUI, por meio de MEV;
- Avaliar qualitativamente a influência da remoção do óleo de semente de girassol ozonizado com e sem PUI, na penetração do material obturador nos túbulos dentinários.

2.3 HIPÓTESE NULA

A utilização de ozônio, em suas diferentes formas de aplicação (água ozonizada, ozônio gasoso e óleo de girassol ozonizado), não apresenta eficácia antimicrobiana na eliminação de biofilmes de *E. faecalis* presentes no sistema de canais radiculares. Não há diferença significativa na eficácia de descontaminação dos canais radiculares entre os diferentes agentes antimicrobianos testados (hipoclorito de sódio 2,5%, clorexidina 2%, ozônio gasoso, água ozonizada e óleo ozonizado 660 µg/mL) no combate ao biofilme maduro e denso de *E. faecalis*. Além disso, a associação de ozônio gasoso com hipoclorito de sódio 2,5% ou clorexidina 2% não resulta em um aumento significativo na descontaminação bacteriana quando comparado a sua não associação, e o método de remoção do óleo ozonizado não impacta significativamente a resistência de união do cimento endodôntico nos túbulos dentinários.

3 MATERIAL E MÉTODOS

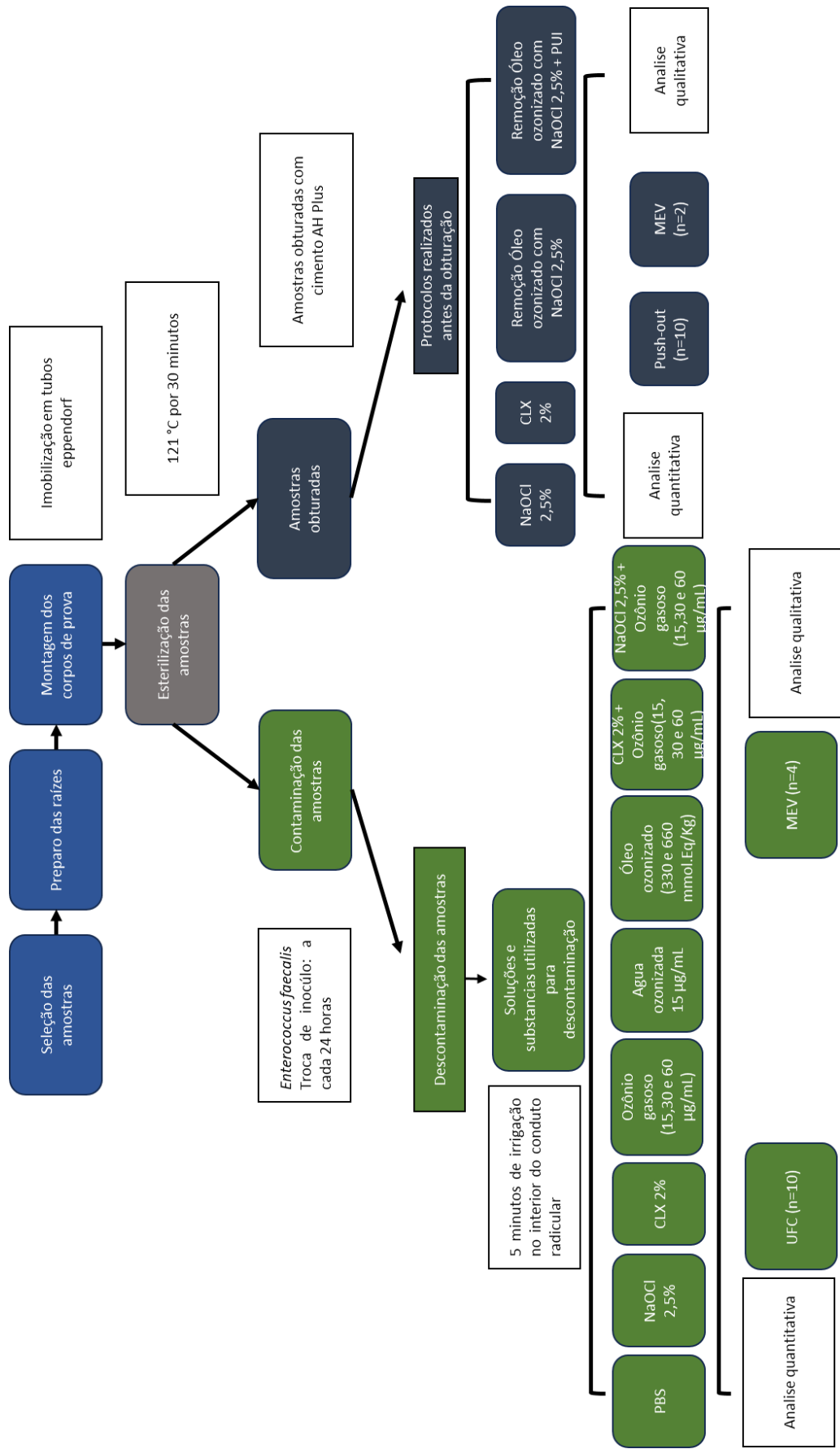
3.1. ÉTICA EM PESQUISA

Considerando que este estudo utilizou dentes bovinos, o projeto de pesquisa foi previamente avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Ribeirão Preto (CEUA-UNAERP), sendo aprovado sob o registro número 001/2017.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo, foram utilizados 271 dentes incisivos bovinos, sendo um dente utilizado como controle de esterilização, os dentes foram distribuídos em n=10 para quinze grupos para os protocolos de descontaminação, e quinze grupos de n=4 para a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Cinco grupos de n=10 para *push-out* e cinco grupos de n=2 para MEV (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma referente ao delineamento experimental detalhando as diferentes soluções irrigantes e ozônio gasoso. MEV: microscopia eletrônica de varredura. UFC: unidades formadoras de colônia.

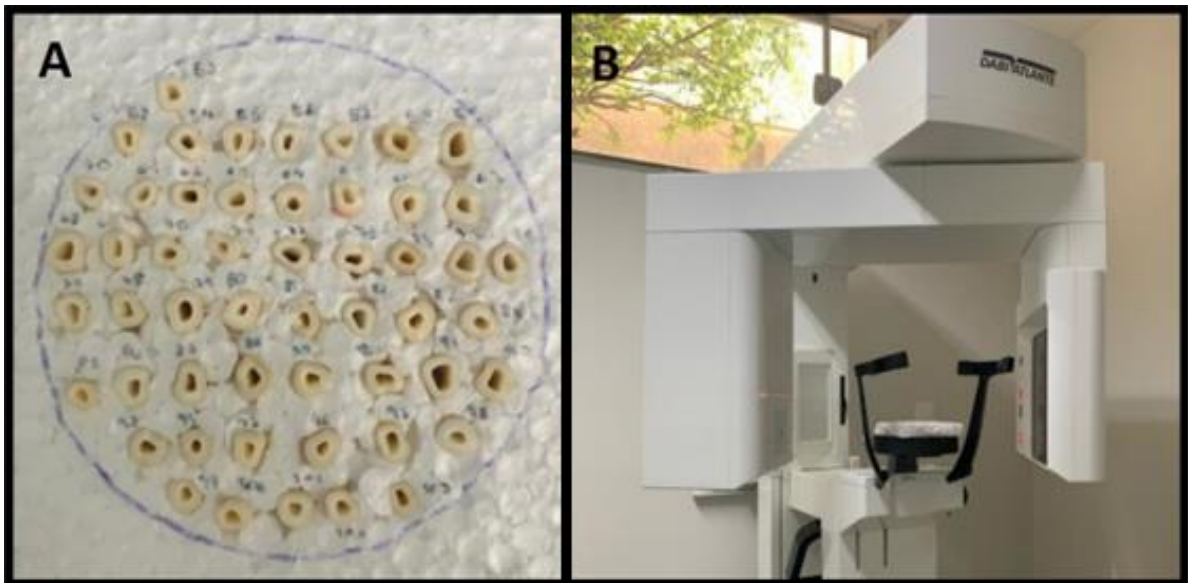


Fonte: Autor

3.3 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

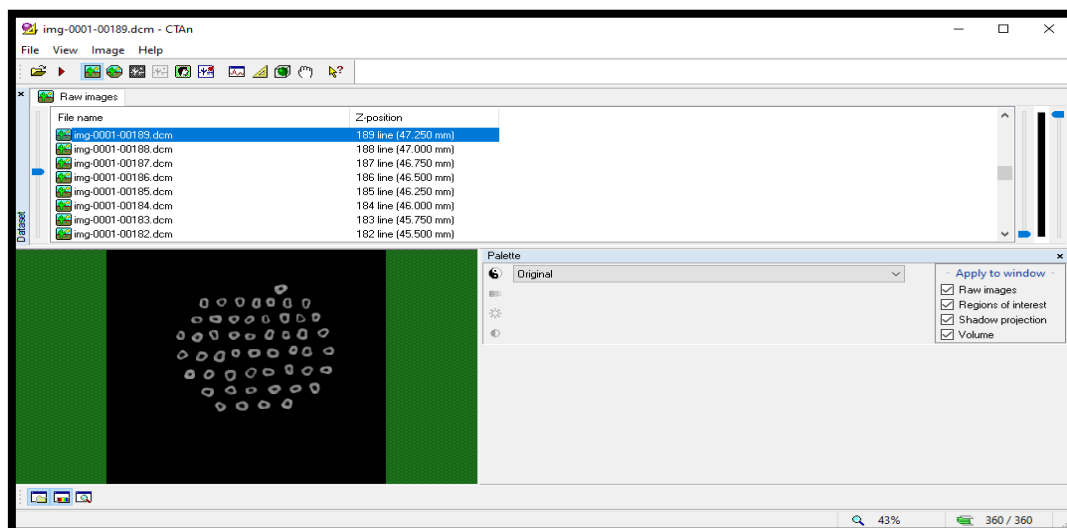
Neste estudo, foram utilizados 271 dentes incisivos bovinos, os quais foram padronizados por tomografia computadorizada (Figura 2 e 3), selecionando-se aqueles com um canal radicular, ápice radicular formado e canal circular, com volume entre 40 e 70 μL , sem curvaturas e não obturados. Os dentes foram distribuídos de forma randomizada e homogênea nos diferentes grupos, em relação aos volumes, e foram armazenados em solução de timol 0,1% até o início dos experimentos, quando os mesmos foram devidamente enxaguados em água corrente durante 24 h. Em seguida, as coroas foram removidas e as raízes padronizadas em 15 mm de comprimento.

Figura 2 - Dentes em posição para tomada tomográfica (A); Tomógrafo (Eagle Edge - Dabi Atlante) (B).



Fonte: Bressan (2023).

Figura 3 - Análise dos volumes dos canais dos dentes para organização dos grupos experimentais, com auxílio do *software* Bruker Micro-CT (CTAn).

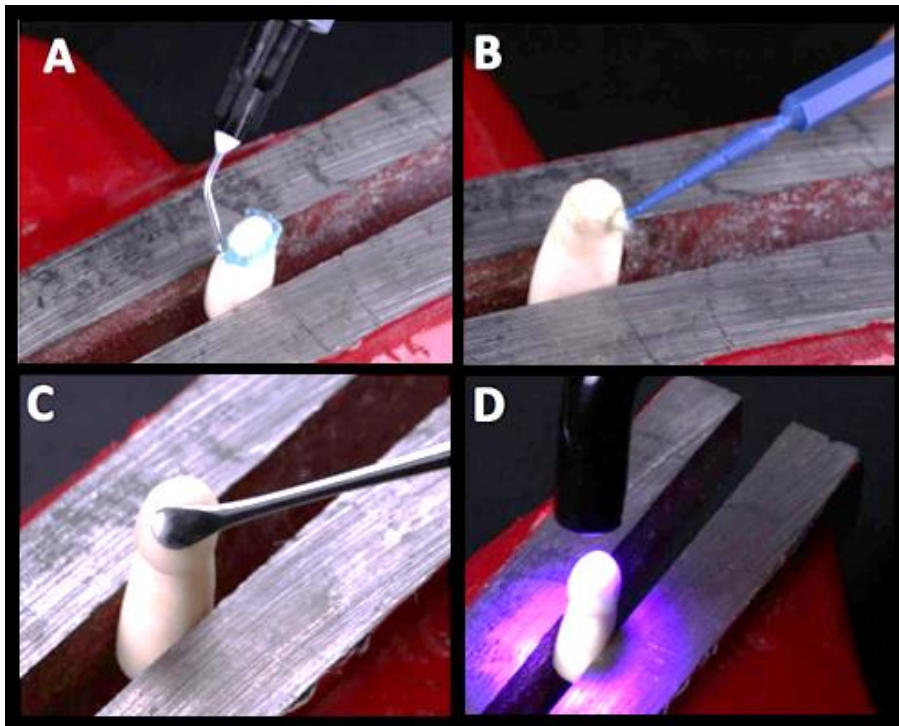


Fonte: Bressan (2023).

3.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES

O preparo das amostras foi baseado em Goulart *et al.*, (2024). O acesso ao conduto radicular foi feito após a secção da coroa e tamanho das amostras em 15 mm, foi realizada a remoção da polpa com um extirpa-polpa, e foi utilizada a lima K #15 (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suíça), até visualização do ápice com recuo de 0,5 mm. Após a definição da odontometria, os dentes foram estabilizados em morsa para instrumentação. A foramina apical foi selada, realizando o condicionamento com ácido fosfórico 1 mm acima do ápice na região externa do conduto radicular por 10 s (Figura 4A) e removido com o uso de jato de água leve pelo mesmo tempo. Após a remoção, foi realizada a secagem da região com papel absorvente e aplicado adesivo 1 mm acima do ápice, da mesma forma como foi realizado o preparo ácido. Posteriormente, foi aplicado jato de ar leve na região e o adesivo foi fotopolimerizado por 40 s (Figura 4B). Este procedimento foi repetido mais uma vez. Após a fotopolimerização do adesivo, foi utilizado a resina composta Z100 (3M, Maplewood, Minnesota, EUA) para a finalização e o selamento da foramina (Figura 4C e 4D). O protocolo foi realizado desta forma para evitar que o adesivo ou a resina entrassem no interior do conduto radicular pela foramina, o que comprometeria o estudo.

Figura 4 - Etapas relativas ao selamento do ápice. Condicionamento ácido (A); Aplicação de adesivo (B); Recobrimento com resina composta (C) e Fotopolimerização (D).



Fonte: Bressan (2023).

Após o selamento (Figura 6A), os dentes foram instrumentados utilizando motor VDW Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) e limas rotatórias Protaper SX, F3, F4 e F5 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) (Figura 5), irrigando-se sempre com 2 mL hipoclorito de sódio 2,5% entre cada instrumentação, até um volume total de solução empregada de 8 mL. Após a realização do protocolo, o conduto foi preenchido com EDTA 17% por 5 minutos para remoção de *smear layer*, e removido por meio de irrigação com solução tampão (PBS). Com os dentes já instrumentados, foi realizada uma fenda longitudinal de 2 mm de profundidade, em 2 dentes de cada grupo, para execução do procedimento clivagem em etapa posterior, para a análise dos mesmos por microscopia eletrônica de varredura (Figura 6C).

Figura 5 – Limas NiTi do sistema Protaper Universal de SX – F5

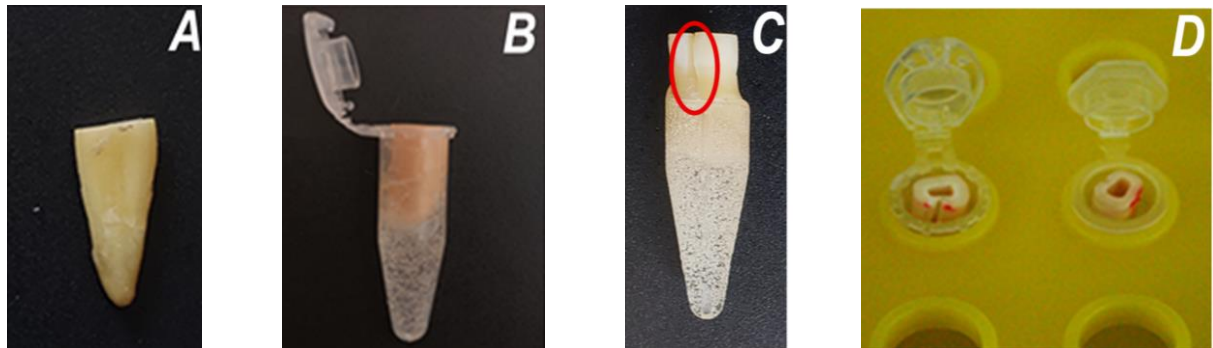


Fonte: Autor.

Foram utilizados 271 tubos de fundo cônico de 1,5 mL (Eppendorf), os quais foram preenchidos com 1 mL de resina acrílica incolor (pó/líquido) e realizada a inserção das raízes e montagem dos corpos de prova, visando à imobilização das mesmas no interior dos tubos e à obstrução dos ápices. Com a imobilização das raízes no interior, os tubos foram devidamente fechados, assegurando a eficácia do procedimento de esterilização das raízes (Figura 6B). Além disso, a imobilização dos dentes durante a execução dos experimentos, facilita a execução dos procedimentos de inoculação e de irrigação com os diferentes líquidos e gases de acordo com os protocolos estabelecidos (Figura 6D).

Na etapa seguinte, os 271 corpos de prova foram colocados em uma estante (Figura 6D), a qual foi embalada, para a execução do procedimento de esterilização em autoclave durante 30 minutos a 121 °C. Foram utilizados os testes de indicador químico com fita termossensível e o teste biológico para verificar a eficácia do procedimento de esterilização em autoclave (Goulart *et al.*, 2024).

Figura 6 – Montagem dos corpos de prova: A- Conduto radicular sem coroa e ápice radicular selado; B- Corpo de prova montado em eppendorf de 1,5 mL e resina acrílica para estabilização; C- Amostras com ranhura lateral para posterior clivagem e análise por MEV; D- Amostras posicionadas em estante para eppendorf de 1,5 mL.



Fonte: Autor

3.5 LINHAGEM BACTERIANA

No presente estudo, foi utilizada a linhagem catalogada pela *National Collection of Type Cultures* (NCTC) de *Enterococcus faecalis* NCTC 775, armazenada a -80°C em meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado com 15% de glicerol. Para reativação da linhagem, a mesma foi inoculada inicialmente em BHI líquido e incubada a 37°C por 24 h em estufa. Posteriormente, a cultura foi inoculada em placa de Petri contendo Ágar Müeller Hinton e incubada nas mesmas condições, por 24 h. Após esse intervalo de tempo, foi verificado o crescimento de colônias em cultura pura, prosseguindo-se com o preparo do inóculo bacteriano.

Para o preparo do inóculo bacteriano, colônias de cultura recente de 24 h foram coletadas utilizando um *swab*, de modo a se obter uma suspensão correspondente à escala 2 de MacFarland (equivalente a 6×10^8 unidades formadoras de colônia por mL - UFC/mL), em 2,5 mL de uma solução de tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*). Em seguida, foram acrescentados ao tubo, mais 2,5 mL de BHI, para se obter uma concentração final de cerca de 3×10^8 UFC/mL, equivalente à escala 1 de MacFarland (Figura 7). Esse procedimento foi realizado diariamente, por um período de 21 dias, para promover a renovação do inóculo bacteriano.

Figura 7 - Obtenção da escala 1 de MacFarland, utilizando do BHI. A – PBS esterilizado sem inóculo; B – Tubo padrão referente à escala 2 de MacFarland; C – Tubo contendo PBS com inóculo, turvado em escala 2 de MacFarland; D – Tubo padrão referente à escala 1 de MacFarland; E – Tubo contendo inóculo final equivalente à escala 1 de MacFarland, formado por igual volume de BHI e inóculo preparado no tubo C.



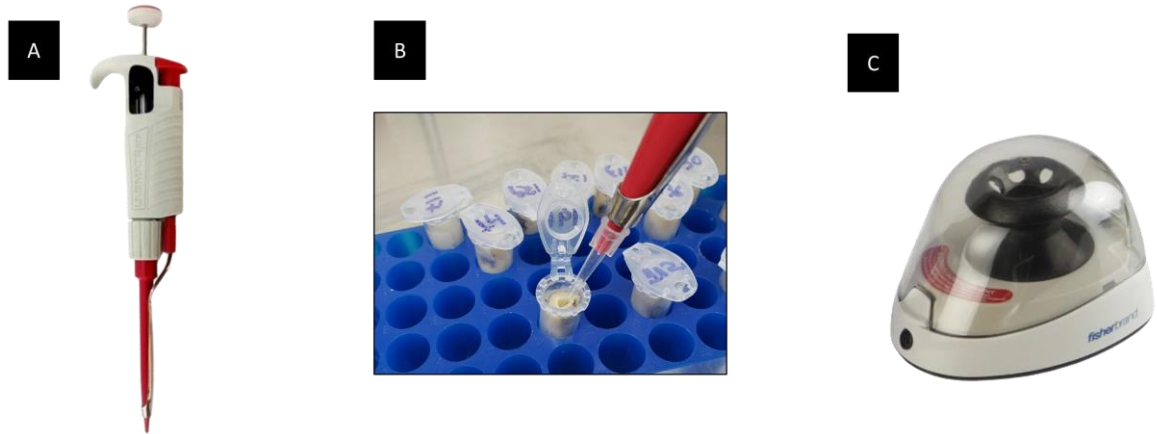
Fonte: Autor

3.6 INOCULAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Os canais radiculares de 271 dentes incisivos bovinos selecionados foram inoculados em fluxo laminar com *E. faecalis* NTCT 775 até o preenchimento completo dos respectivos condutos radiculares, volumes de 10 µL de suspensão bacteriana (concentração final de cerca de 3×10^8 UFC/mL) foram aplicadas nos canais radiculares mecanicamente utilizando-se uma micropipeta de 10 µL (Figura 8A e 8B) e realizado spin das amostras para que a solução penetrasse até o total preenchimento do espécime (Figura 8C). Os tubos foram assepticamente fechados em uma capela de fluxo laminar e, em uma estante, transferidos para a estufa, ficando incubados sob aerobiose por 24 h (Figuras 10).

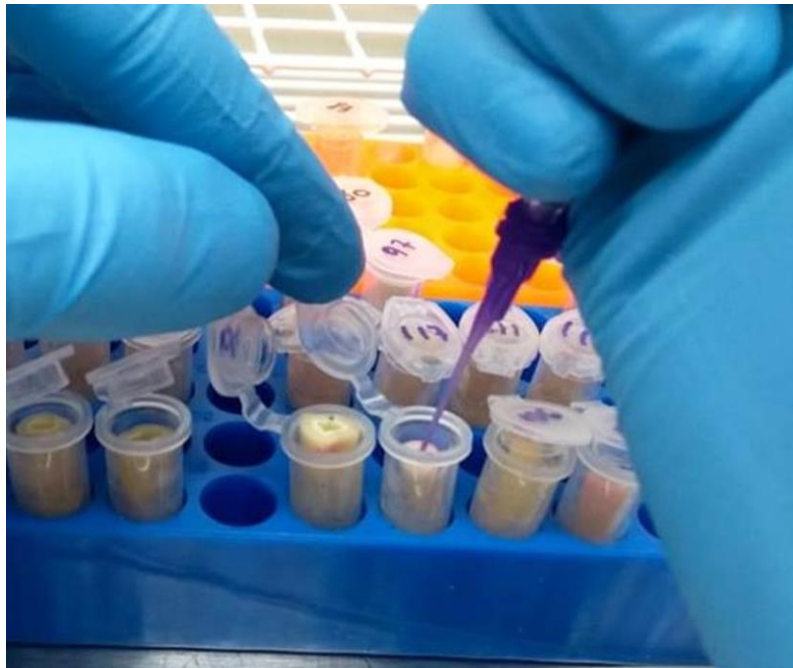
Após 24 h, o inóculo foi removido dos canais radiculares utilizando uma seringa BD de 10 mL e ponta capillary (Ultradent, São Paulo, Brasil), para remoção de células bacterianas mortas ou não aderidas à superfície (Figura 9). Em seguida, um novo inóculo recém preparado nas mesmas condições descritas anteriormente, foi inserido no conduto radicular até o completo preenchimento. Este procedimento foi realizado a cada 24 h, incubando-se as amostras nas mesmas condições descritas anteriormente, durante 21 dias para a formação dos biofilmes densos e maduros ao longo do conduto radicular.

Figura 8 – Inserção do inóculo bacteriano – (A): Pipeta de 10 μ l; (B): Inserção do inóculo; (C): Vortex para o validar o completo preenchimento do canal radicular.



Fonte: Autor

Figura 9 - Remoção do Inóculo dos espécimes, utilizando-se seringa de 10 mL e ponta capillary.



Fonte: Autor.

Figura 10 - Incubação dos corpos de prova em estufa a 37°C por 24h.



Fonte: Autor.

3.7 PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO DO CONDUTO RADICULAR

Os corpos de prova foram distribuídos em 15 grupos (Tabela 1), de forma randomizada e homogênea em relação aos volumes dos condutos radiculares para análise antimicrobiana, sendo (n=10) para UFC e (n=4) para MEV. Foi incluído no estudo um dente sem contaminação para comprovar a esterilização das amostras.

Tabela 1 – Detalhamento dos grupos experimentais respectivos números de dentes utilizados no estudo.

Grupos Experimentais	UFC (n)	MEV (n)
NaOCl 2,5%	10	4
CLX 2%	10	4
PBS	10	4
Ozônio gasoso 15 µg/mL	10	4
Ozônio gasoso 30 µg/mL	10	4
Ozônio gasoso 60 µg/mL	10	4
Ozônio gasoso 15 µg/mL + CLX 2%	10	4
Ozônio gasoso 30 µg/mL + CLX 2%	10	4
Ozônio gasoso 60 µg/mL + CLX 2%	10	4
Ozônio gasoso 15 µg/mL + NaOCl 2,5%	10	4
Ozônio gasoso 30 µg/mL + NaOCl 2,5%	10	4
Ozônio gasoso 60 µg/mL + NaOCl 2,5%	10	4
Água ozonizada 15 µg/mL	10	4
Óleo de semente de girassol ozonizado 330 mmol.Eq/kg	10	4
Óleo de semente de girassol ozonizado O3O 660 mmol.Eq/kg	10	4

Fonte: Autor

3.7.1 Aplicação do Ozônio Gasoso

A aplicação de ozônio gasoso foi realizada com o uso de seringa Luer Lock 60 mL rosqueável (Figura 11B), preenchida com volume de 25 mL de ozônio gasoso utilizando o Gerador de Ozônio OL SMART (Ozone&Life, São José dos Campos, Brasil) (Figura 11A), e uso de ponta Navitip 0.29 GA (Ultradent, Indaiatuba, São Paulo) (Figura 11C) para aplicação no interior do conduto radicular. A ponta foi colocada no canal radicular preenchido com a solução de cada grupo: PBS como veículo para ozônio gasoso, NaOCl 2,5% associado ao ozônio gasoso e clorexidina 2% associada ao ozônio gasoso. A utilização do ozônio gasoso foi por borbulhamento das soluções em fluxo contínuo médio de 5 mL/min de vazão de gás, por 5 minutos, mimetizando o protocolo de irrigação convencional. O ozônio foi aplicado nas diferentes

concentrações propostas no estudo: 15; 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$. No momento da aplicação, foi utilizado um sugador para remoção do gás do ambiente.

Figura 11 – A- Gerador de Ozônio OL SMART; B- Seringa Luer Lock 60 mL; C- Navitip 29 GA.



Fonte: Autor

3.7.3 Aplicação das Soluções Líquidas

As soluções irrigantes utilizadas foram PBS, NaOCl 2,5%, clorexidina 2% e água ozonizada. Elas foram aplicadas utilizando uma seringa de 60 mL e ponta navitip 0,29 mL, 25 mL de solução foi irrigado por 5 min no interior do conduto radicular 1 mm aquém do comprimento de trabalho. As aplicações foram realizadas em fluxo de irrigação de 5 mL/min mantendo a solução no interior do canal por 5 minutos de tempo de ação. Após o protocolo de irrigação, os grupos que utilizaram NaOCl 2,5% foram preenchidos com tiosulfato de sódio 3% para neutralização do NaOCl 2,5%, todos os grupos foram posteriormente lavados com PBS. Após o protocolo de irrigação, realizou-se a coleta das bactérias do interior do canal radicular para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de acordo com Goulart et al., (2024).

A água ozonizada foi preparada em água ultrapura em torre de ozonização (Ozone&Life, São José dos Campos) por microborbulhamento para a concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12).

Figura 12 - Torre de ozonização de água para produção da água ultrapura ozonizada



Fonte: Autor

3.7.4 Aplicação das soluções oleosas

O Óleo de semente de girassol ozonizado com 330 e 660 mmolEq/kg, foi aplicado utilizando uma seringa BD de 10 mL e ponta navitip 0,29 GA. A solução foi inserida no interior do canal radicular 1 mm aquém do comprimento de trabalho por 5 min. Por ser uma solução viscosa, o fluxo foi de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ com total de 500 μL , totalizando 5 min de ação da solução no interior do canal radicular. Após o protocolo, realizou-se a irrigação final com PBS e coleta das bactérias do interior do canal radicular para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

3.8 PROTOCOLO DE COLETA DO BIOFILME

Após os procedimentos realizados em cada grupo, foi realizada a coleta dos biofilmes, conforme protocolo descrito por Goulart *et al.* (2024). Inicialmente os canais radiculares foram lavados para remoção de células planctônicas ou desprendidas dos biofilmes, preenchendo os mesmos com PBS esterilizado o qual foi descartado logo em seguida. Para a coleta dos biofilmes, 10 amostras de cada grupo (Figura 13A), com os canais preenchidos com novo PBS esterilizado (Figura 13B), foram transferidas com o auxílio de pinça esterilizada, sendo colocadas com a embocadura radicular voltada para o fundo dos tubos cônicos de 5 mL (Eppendorf) esterilizados (Figura 13C). Foram, então, devidamente fechadas e seladas com plástico parafilme (Prolab, São Paulo, Brasil). Essas amostras foram submetidas à agitação em um Vortex por 1 min, em velocidade máxima (Figura 13D). Em seguida, os tubos de 5 mL foram dispostos em uma estante, a qual foi imersa em água em uma cuba ultrassônica (Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech, São Carlos, Brasil) (Figura 13E) por 480 s, para que o biofilme formado fosse deslocado das paredes radiculares. Com isso, foram levados à centrifugação a 700 x g por 60 s (Centrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) (Figura 13F) para a coleta dos materiais que se haviam desprendido das paredes radiculares.

Figura 13 – Sequencia do protocolo relativo à coleta dos biofilmes dos canais radiculares: Coleta de protocolo de biofilme: A - Amostra; B - Raiz retirada da amostra e preenchida com PBS; C - Raiz transferida para um Eppendorf de 5 mL com a entrada do canal voltado para baixo; D - Vortex utilizado na potência máxima por 1 min; E, Banho ultrassônico realizado por 480 s; F - Centrifugação a 700 x g por 1 min.



Fonte: Goulart *et al.*, 2024

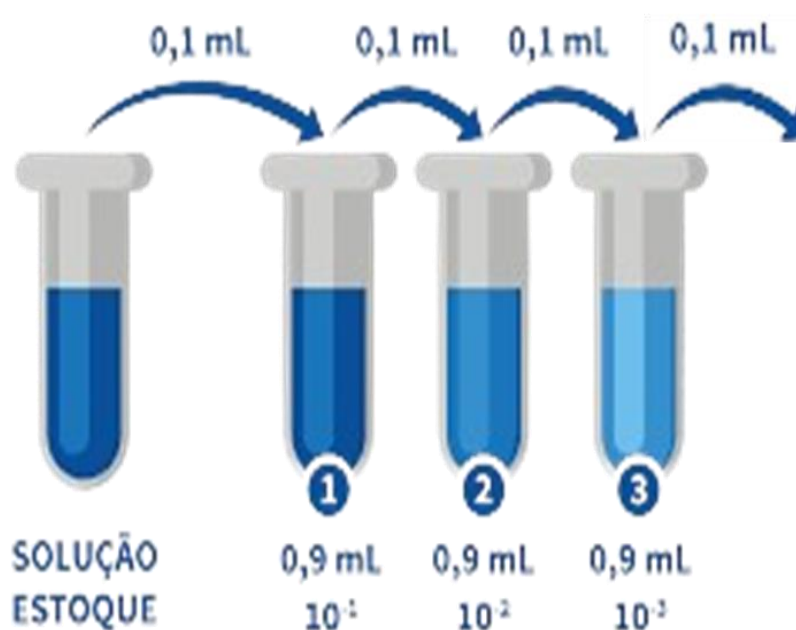
3.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os materiais coletados dos dentes de todos os grupos apresentam uma quantidade incontável de UFCs, então, para obter uma quantidade de colônias contáveis, foi realizado o processo de quatro diluições seriadas (Figura 14), com fator

10. Alíquotas de suspensões de 0,1 mL foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Ágar Müeller Hinton (Kasvi, Sao Jose dos Pinhais, Brasil), pelo método de espalhamento, com auxílio de alça de Drigalski (Figuras 15 e 16).

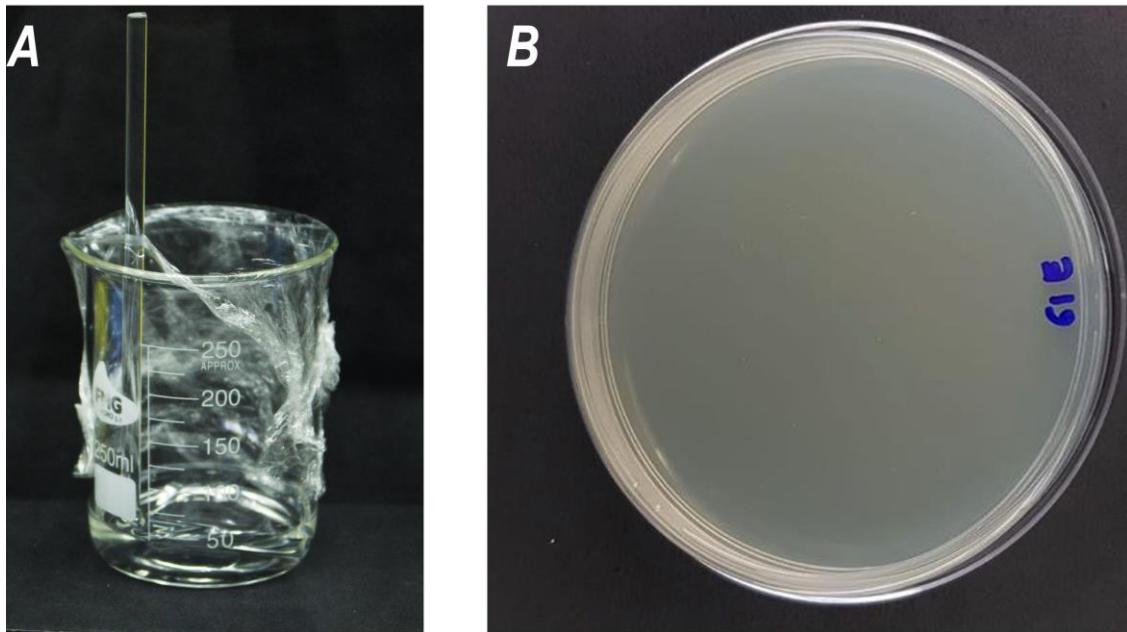
Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, sob aerobiose. Após esse período, as culturas bacterianas foram fotografadas e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada com auxílio do software ImageJ, realizando a conversão da imagem para 8 bits, seguido de threshold para delimitar os pontos, delimitação da área para contagem com circunferência e posterior contagem com os parâmetros de 0-100 pixel² (Figura 17).

Figura 14 – Esquema sobre a realização da diluição seriada.



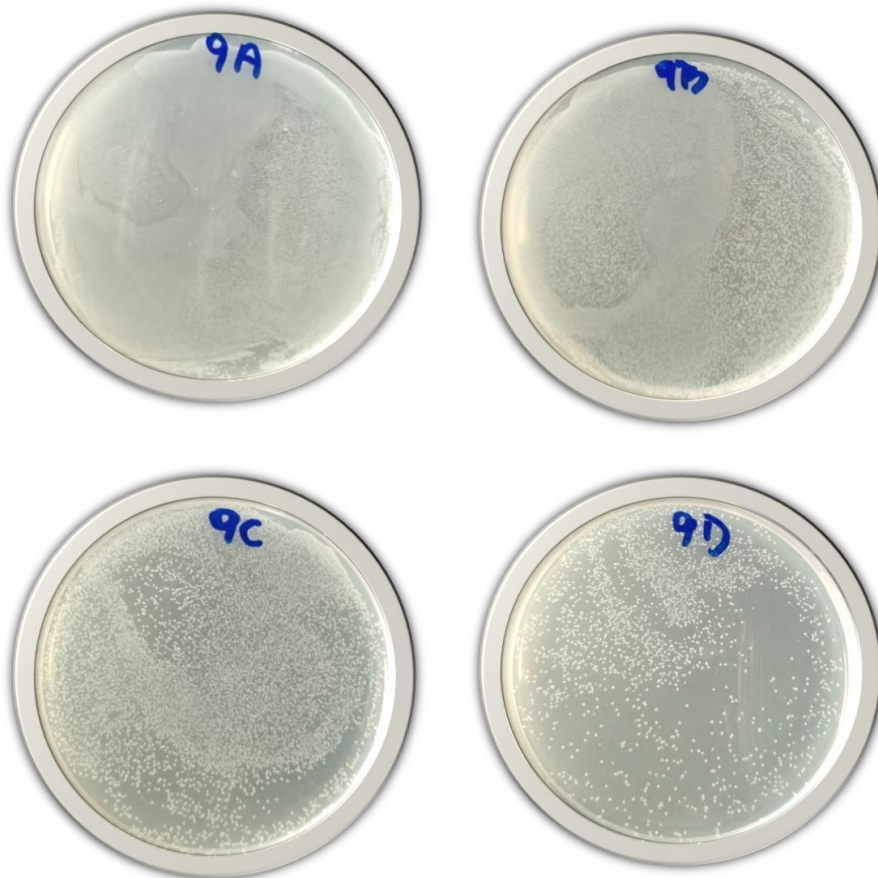
Fonte: Autor

Figura 15 - Alça Drigalski (A) e placa de Petri com meio Müller Hinton (B), utilizados no processo de inoculação dos biofilmes coletados.



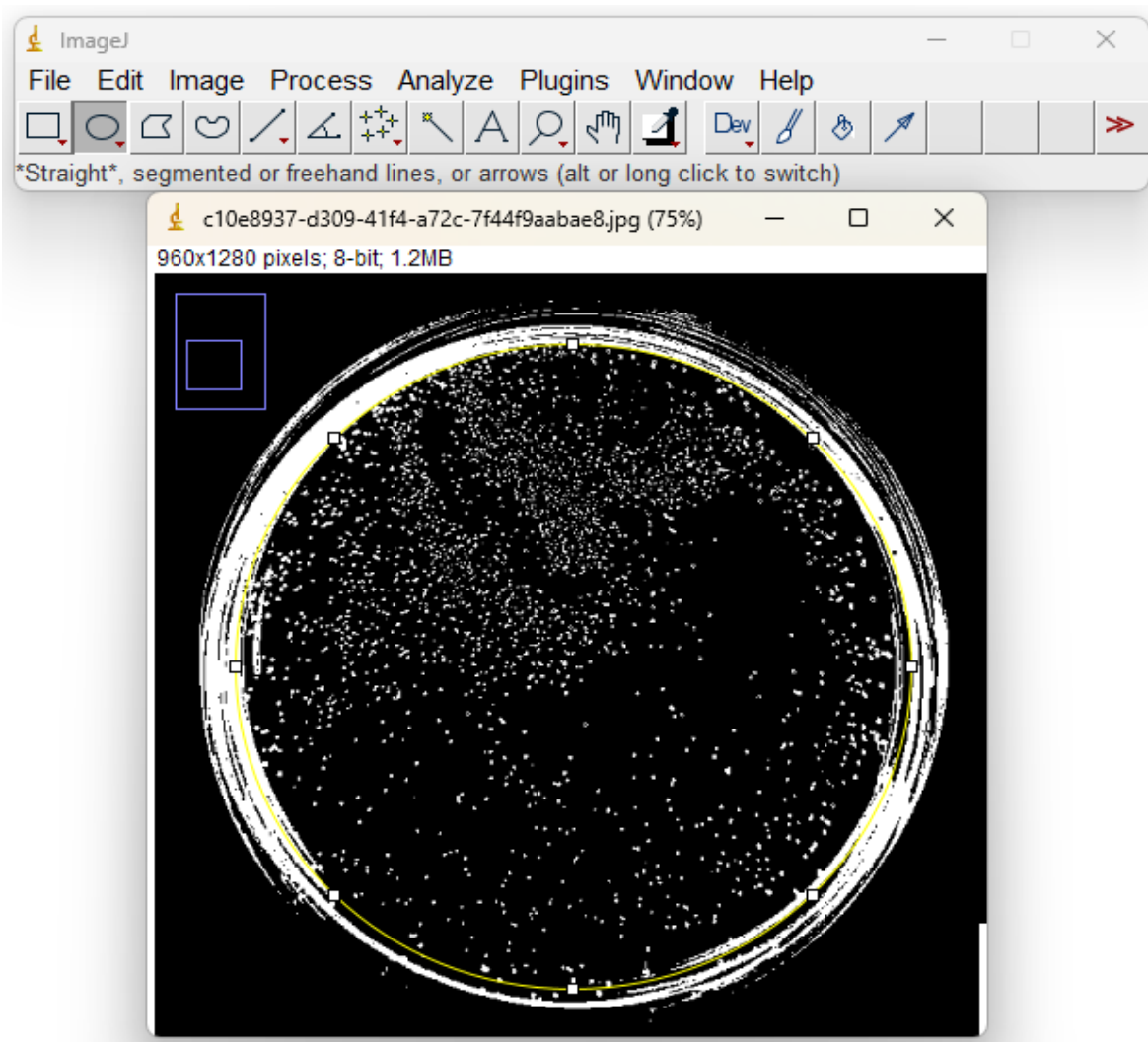
Fonte: Autor

Figura 16 - Diluição seriada em placas de Petri de A até D para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).



Fonte: Autor

Figura 17 – Imagem representativa do procedimento de contagem das unidades formadoras de colônia pelo software ImageJ.



Fonte: Autor

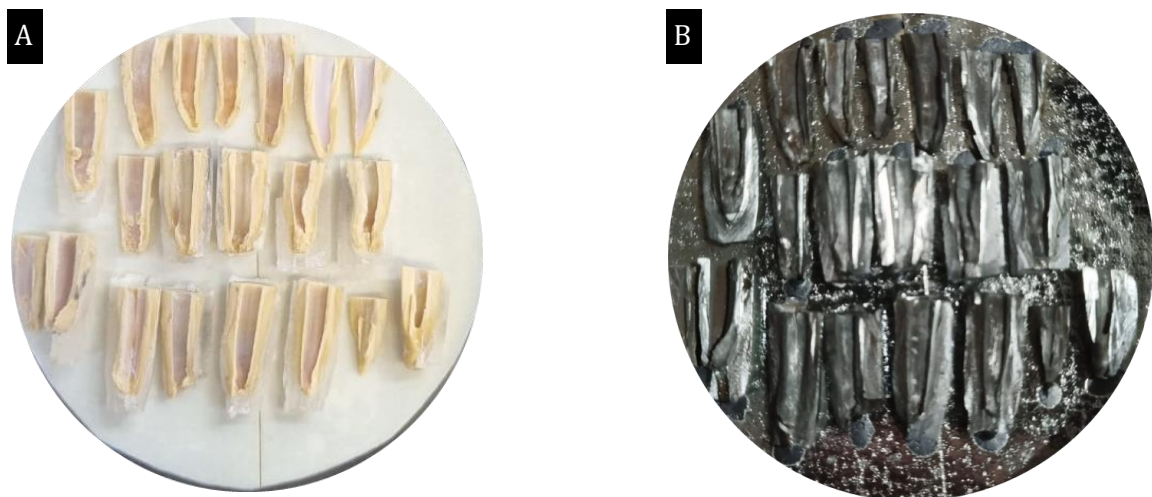
3.10 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para as análises por MEV, os espécimes foram clivados com a utilização de Hollembach 3S e transferidos para Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de glutaraldeído 2,5% por 24 horas a 4°C, após o período foram submetidos a uma bateria de soluções de etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) com concentrações ascendentes de 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, e 100% (Huang et al., 2017; Li et al., 2018) sendo mantidos por 5 minutos em cada solução, por fim as amostras foram secas em dessecador por 15 dias para posterior fixação em stub e metalização. Concluído o processo de desidratação, os corpos de prova foram fixados sobre

estruturas circulares de cobre e tamanho apropriado, denominadas “stubs”, adaptados para a quantidade de amostras, previamente identificadas de acordo com os grupos experimentais, utilizando-se fita adesiva de dupla face (Figura 18A).

Na etapa seguinte, foi feito o procedimento de metalização (Figura 18B), com a deposição de uma fina camada (cerca de 30 nm) de uma liga de ouro paládio sobre os espécimes em um equipamento de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec AG, Liechtenstein, Suíça). Nesse procedimento, foram utilizados os seguintes parâmetros: pressão de 0,01 mbar, corrente de 40 mA, distância de trabalho de 50 mm, tempo de cobertura de 110 s e espessura média de deposição de 20 a 30 nm. Concluída a etapa de preparação, os corpos de prova foram levados ao microscópio eletrônico de varredura (JSM 6610, JEOL Ltda, Tóquio, Japão), do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Figura 19). Na sequência, foram feitas as varreduras das respectivas áreas dos terços apical, médio e cervical, com aumentos de 2000 e 5000 vezes, para obtenção das fotomicrografias. As imagens foram analisadas para verificação de presença ou ausência de biofilme aderido na superfície do conduto radicular.

Figura 18 – A- Espécimes fixados em *stub*; B-Corpos de prova metalizados para posterior análise por meio de microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Autor

Figura 19 – Equipamento de microscopia eletrônica de varredura utilizado nos experimentos deste estudo.



Fonte: Central de Equipamentos e Serviços Multiusuários - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Disponível em <https://emu.fmrp.usp.br/equipamentos/categoria1/mev-jeol-jsm-6610lv/>, 21 de jan. 2025.

3.11 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE UNIÃO

O teste de *push-out* foi conduzido visando identificar as alterações na resistência de união do material obturador e dentina proporcionadas pela presença ou ausência do óleo de semente de girassol ozonizado, após os protocolos de remoção, comparando com os grupos de irrigação: NaOCl 2,5% e clorexidina 2,0%. Para a remoção do óleo de girassol ozonizado, foi utilizada irrigação com NaOCl 2,5%, e irrigação com NaOCl 2,5% ativada por ultrassom (PUI) com ponta Irrisonic E1 (Helse, Santa Rosa de Viterbo, Brasil) (Tabela 2)

Tabela 2 - Grupos para análise de *push-out*.

Grupo	Resistência de união (n)	MEV (n)
NaOCl 2,5%	10	2
Clorexidina 2%	10	2
Remoção de óleo de girassol ozonizado com NaOCl 2,5%	10	2
Remoção de óleo de girassol ozonizado com NaOCl 2,5% + PUI	10	2

Fonte: Autor.

3.11.1 Protocolos de irrigação

Os protocolos de irrigação foram realizados da seguinte forma, 2 mL de solução irrigante foram utilizadas com fluxo de 2 mL/min, e 20 s de ação sem irrigação no canal radicular, totalizando 6 mL de solução utilizado, 3 minutos de irrigação e 1 minuto de solução irrigante no interior do canal radicular sem fluxo de irrigação e EDTA 17% por 5 min. Para o grupo NaOCl 2,5% associada a PUI, a diferença foi no período sem fluxo de irrigação, no qual, durante os 20 s, foi utilizado o ultrassom na potência de 20% de acordo com o fabricante, sem tocar as paredes do canal radicular e 1 mm aquém do ápice radicular.

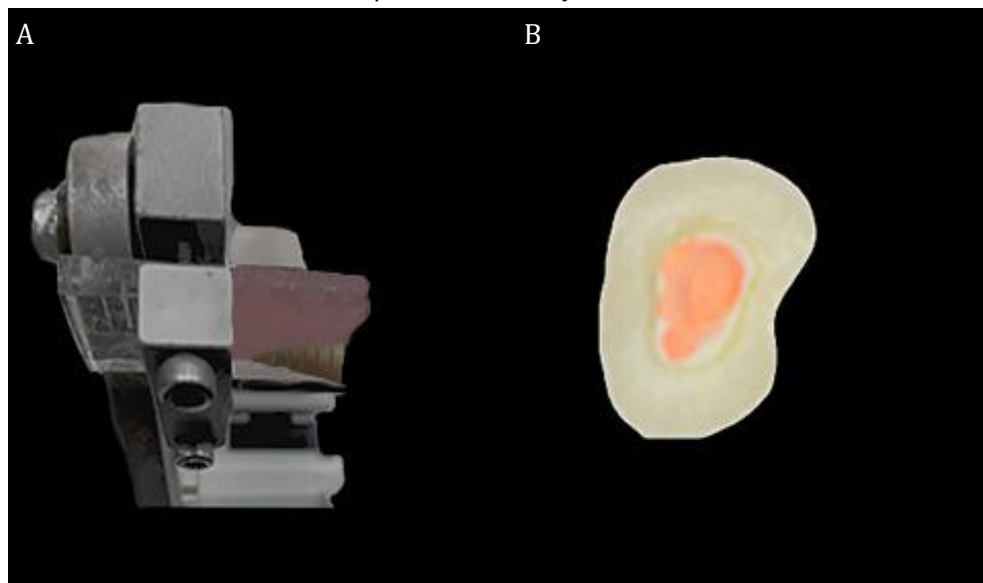
3.11.2 Protocolo de Obturação

A obturação foi realizada por meio da técnica de condensação lateral, utilizando cones principais de guta-percha F5 e cones acessórios (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça). O cimento obturador AHPlus (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi preparado conforme as orientações do fabricante e inserido no canal radicular juntamente com o cone principal de guta-percha, alcançando o comprimento de trabalho. Para garantir o preenchimento completo do canal, foi empregado um espaçador (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) para a introdução dos cones acessórios para o preenchimento do conduto. O excesso de guta-percha na entrada do canal foi removido com um instrumento Hollenback 3S (Duflex, S.S. White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil), previamente aquecido até o rubor. Após esse

processo, a compactação vertical foi realizada com o condensador de Paiva nº 2 (Duflex, S.S. White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, Brasil).

Após a obturação, os espécimes foram acondicionados em estufa a 37 °C por um período de 48 h. Posteriormente, foram fixados em placas confeccionada com resina acrílica utilizando cola quente e seccionados em uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, EUA) (Figura 20A) ajustada para operar a uma velocidade de 325 rpm, produzindo fatias de 1,0 mm de espessura (Figura 20B).

Figura 20 – A- Amostra travada em máquina de corte e já seccionada; B- Slice confeccionado.

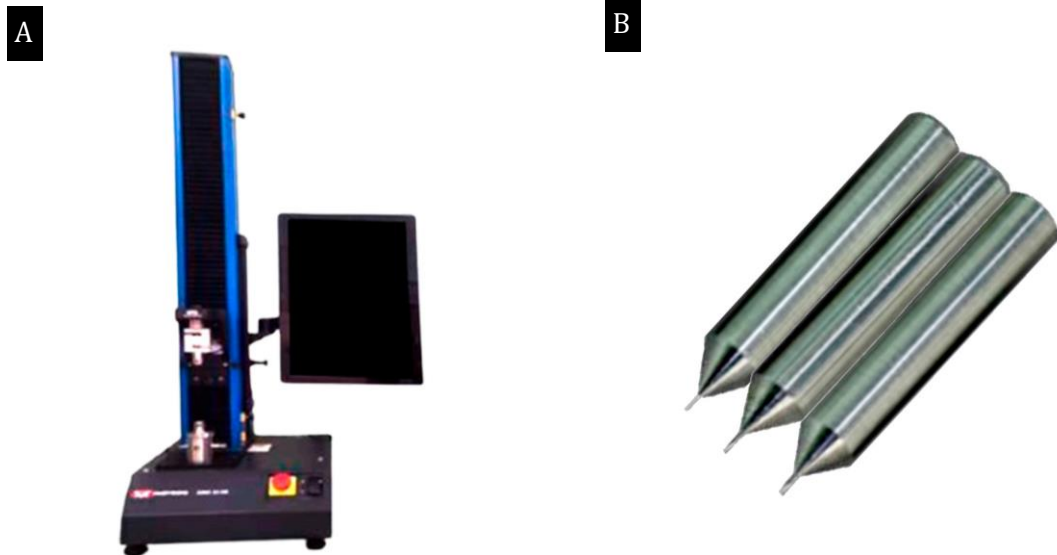


Fonte: Autor

3.11.3 Análise de *Push-out*

A primeira fatia de cada terço do canal (cervical, médio e apical) foi submetido ao teste de *push-out* em uma Máquina Universal de Ensaios Instron-EMIC 23-55 (Instron Corporation, Canton, MA, EUA) (Figura 21A), equipada com uma célula de carga e sistemas de alinhamento e fixação. Um dispositivo metálico de aço inoxidável, com haste de 2 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro, foi utilizado para posicionar os corpos de prova. A face apical foi orientada para cima e alinhada com a haste metálica (Figura 21B), que aplicava força para deslocar o cimento e os cones de gutapercha. A carga foi aplicada a uma velocidade constante de 0,5 mm/min, e os valores máximos de tensão de cisalhamento necessários para o deslocamento do material foram registrados em kN.

Figura 21 – A - Máquina Universal de Ensaios Instron-EMIC 23-55; B – Hastes metálicas com diferentes diâmetros para realizar a força em terço apical, médio e cervical.



Fonte: Autor

A força aplicada para deslocar o material (F , em quilonewtons - kN) foi convertida em tensão (σ , em megapascal - MPa), dividindo o valor da força pela área de adesão do material obturador (A , em mm^2) (Figura 22). A relação entre essas grandezas foi determinada pela equação de acordo com Horiuchi (2010):

$$\sigma = F / A$$

O cálculo da área de adesão (A) foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$A = \pi (R_m + r_m) h$$

Para a qual:

A = área de adesão do cimento (mm^2);

$\pi = 3,14$;

R_e = raio equivalente do canal, calculado como $(R_m + r_m) / 2$;

R_m = raio médio do canal coronário $((R_c + r_c) / 2)$;

r_m = raio médio do canal apical $((R_a + r_a) / 2)$;

R_c = raio maior do canal coronário;

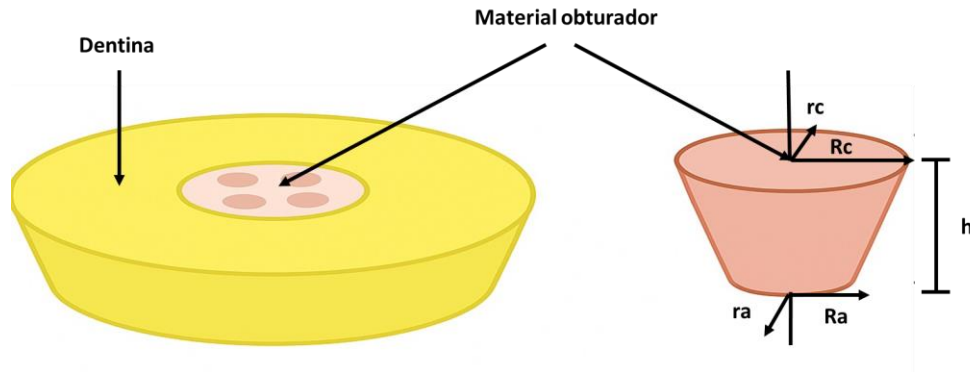
r_c = raio menor do canal coronário;

R_a = raio maior do canal apical;

r_a = raio menor do canal apical;

h = espessura do corpo de prova.

Figura 22 - Desenho esquemático do corpo-de-prova com suas grandezas



Fonte: Autor

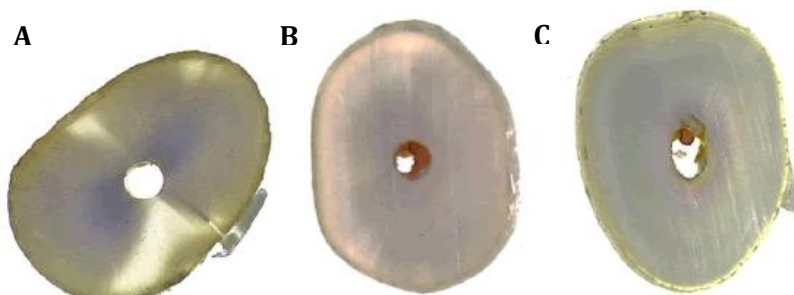
Após o teste, realizou-se a análise dos tipos de falha com auxílio de um microscópio operatório (DF Vasconcellos, Valença, RJ, Brasil) (Figura 22), com aumento de 40x (Figura 23). As falhas foram classificadas de acordo com sua localização e características: adesivas, quando ocorriam na interface entre dentina, cimento e cone; coesivas, quando o cimento ou material obturador recobria completamente a parede do canal; adesivas, quando a parede radicular apresenta ausência total; e mistas, quando áreas recobertas e desprovidas de material se alternavam (Figura 24).

Figura 23 – Microscópio operatório modelo DF Vasconcellos utilizado na análise de falha.



Fonte: DF Vasconcellos (disponível em <https://dfv.com.br/>, acesso em 21 jan. 2025).

Figura 24 - Exemplo de falhas- (A):Adesiva; (B) coesiva e (C) mista.



Fonte: Bayram *et al.*, 2018

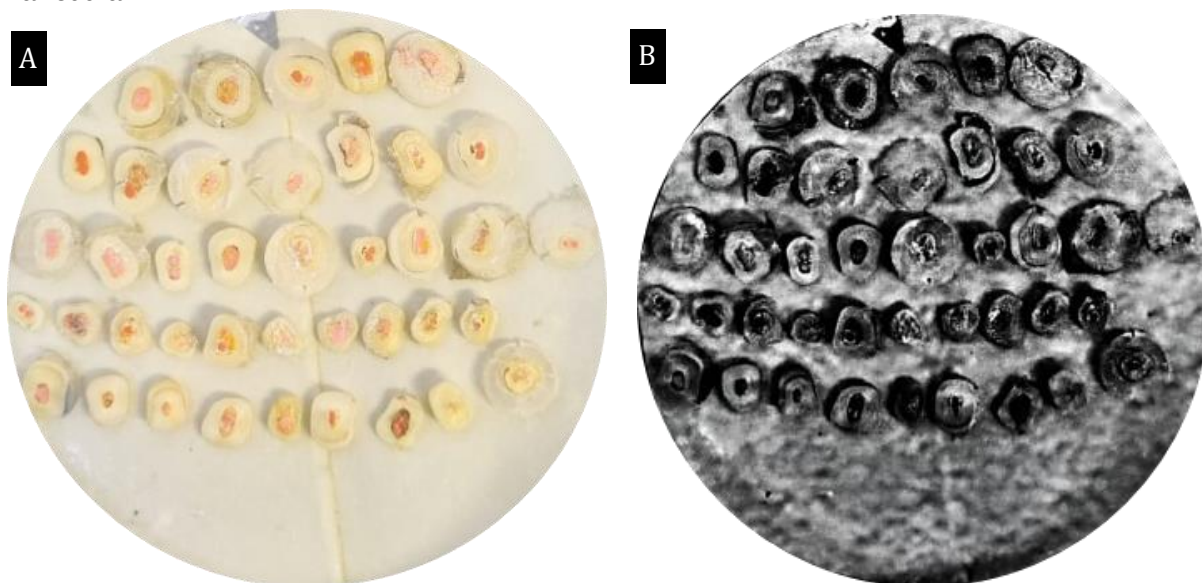
3.11.4 Microscopia eletrônica de varredura para análise da interface de união

A análise por MEV foi realizada com o segundo *slice* obtido de cada terço. Para a análise por MEV, a superfície dos corpos de prova foi regularizada e polida com lixa d'água carbureto de silício nas seguintes granulações: 400, 600 e 1200 (Norton, Lorena, SP, Brasil), sob movimentos repetidos em forma de "8". Em seguida, os *slices*

foram levados para cuba ultrassônica (Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech, São Carlos, SP, Brasil), por 20 min e imersos na bateria de álcool etílico com cinco concentrações crescentes (25, 50, 75, 80 e 100%), por 15 min cada. Em seguida, os *slices* foram imersos em ácido clorídrico (6 mol/L), por 1 min e, por fim, em NaOCl 2,5%, por 5 min. Após esses protocolos, os corpos de prova ficaram 24 horas em estufa à 37°C.

No dia seguinte, os *slices* foram posicionados com fita adesiva dupla face (3M, São Paulo, SP, Brasil) em *stub* metálico circular (Figura 25A) e levados ao aparelho metalizador (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein, Alemanha) para serem recobertos por fina camada da liga ouro paládio (Figura 25B). Finalmente, os espécimes foram analisados por MEV (JSM 5410, JEOL Ltda, Tóquio, Japão), com um aumento inicial de 50x para localização das áreas representativas e, posteriormente, de 200x.

Figura 25 – Preparação das amostras para MEV: A- Amostras fixadas em stub com fita dupla face; B- Slices fixados em *stub* e metalizados para posterior análise por meio de microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Autor

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de UFC foram transformados em $\log_{10}$ para a realização das análises estatísticas. Inicialmente, a normalidade dos dados transformados foi avaliada por meio do teste de Shapiro–Wilk, confirmando que os valores seguiam uma distribuição

normal em cada grupo. Em seguida, o teste de Levene foi aplicado para verificar a homogeneidade das variâncias entre os grupos, uma condição essencial para a realização de testes paramétricos. Com essas condições atendidas, foi aplicado o teste t para amostras independentes, permitindo a comparação das médias das contagens bacterianas (em log) entre os diferentes grupos. O objetivo foi identificar diferenças estatisticamente significativas na eficácia da descontaminação bacteriana entre os métodos, considerando um nível de significância de 5%.

Para os resultados do ensaio de *push-out* referentes aos grupos de remoção de óleo de girassol ozonizado, os dados foram igualmente submetidos ao teste de Shapiro–Wilk para avaliar a normalidade e ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias entre os diferentes terços radiculares e os grupos. Ambos os testes indicaram que os valores estatísticos foram atendidos ($p > 0,05$), permitindo a continuidade da análise., seguido de Anova dois fatores para análise de comparação entre terços e grupos, e complementado pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS EM BIOFILMES BACTERIANOS

4.1.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias

Após a realização das quatro diluições e a obtenção dos valores de UFC, procedeu-se à avaliação da descontaminação proporcionada pelos protocolos propostos em todos os corpos de prova dos grupos experimentais, excetuando-se os pertencentes aos grupos de controle negativo e positivo.

Na Tabela 3, fez apresentados os valores médios e os respectivos desvios-padrão do número de bactérias, obtidos pela contagem das UFCs, considerando as diferentes soluções irrigantes utilizadas.

O teste de *post-hoc* de Tukey mostrou a diferença estatística entre o efeito das soluções ($p < 0,05$) (Tabela 3), indicando uma redução do número de UFCs, conforme houve o aumento da concentração do ozônio nos diferentes grupos ($p < 0,05$). Para o grupo NaOCl obtiveram-se valores menores que os grupo clorexidina 2%, ozônio gasoso 15, 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$ e água ozonizada 15 $\mu\text{g/mL}$. Porém, para o grupo óleo de semente de girassol ozonizado, obtiveram-se os menores valores dentre os grupos analisados sem associação (Tabela 3).

Ao analisar os resultados dos grupos associados, pode-se verificar que o ôzônio gasoso associado ao NaOCl 2,5% não potencializou a ação antimicrobiana, apresentando-se estatisticamente semelhante ao grupo sem associação do ôzônio gasoso ($p < 0,05$). Porém, para o grupo clorexidina associada ao ôzônio gasoso verificou-se ação sinérgica e zerou os valores de UFC, sendo o grupo com maior redução bacteriana dentre todos os grupos analisados no estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de média e desvio padrão obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em valor absoluto e em Log₁₀ em cada grupo experimental testado.

Grupos	Média (absoluto)	Média (Log ₁₀)	D. Padrão (absoluto)	D. Padrão (Log ₁₀)
PBS ^A	4.026.000	6,604	1.150.710, 7	6,06
NaOCl 2,5% ^B	53.525	4,728	27.304,14	4,436
CLX ^B	62.275	4,794	28.335,65	4,452
Ozônio gasoso 15 µg/mL ^C	628.525	5,798	92.504,10	4,966
Ozônio gasoso 30 µg/mL ^C	122.025	5,086	18.338	4,263
Ozônio gasoso 60 µg/mL ^B	67.575	4,829	17.278,57	4,237
Ozônio gasoso 15 + NaOCl ^B	55.250	4,742	36.013,19	4,556
Ozônio gasoso 30 µg/mL + NaOCl ^B	53.750	4,730	22.812,64	4,358
Ozônio gasoso 60 + NaOCl ^B	53.350	4,727	31.441,96	4,497
Ozônio gasoso 15 µg/mL + CLX ^B	60.200	4,779	27.273,30	4,435
Ozônio gasoso 30 µg/mL + CLX ^B	44.750	4,650	26.495,34	4,423
Ozônio gasoso 60 µg/mL + CLX ^D	0	0	0	0
Água ozonizada 15 µg/mL ^A	3.255.000	6,512	1.671.445, 8	6,223
Óleo de semente de girassol ozonizado 330 mmolEq/kg ^B	77.250	4,887	20.131,9	4,303
Óleo de semente de girassol ozonizado 660 mmolEq/kg ^E	22300	4,348	9.936,13	3,997

* Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Fonte: Autor.

4.1.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

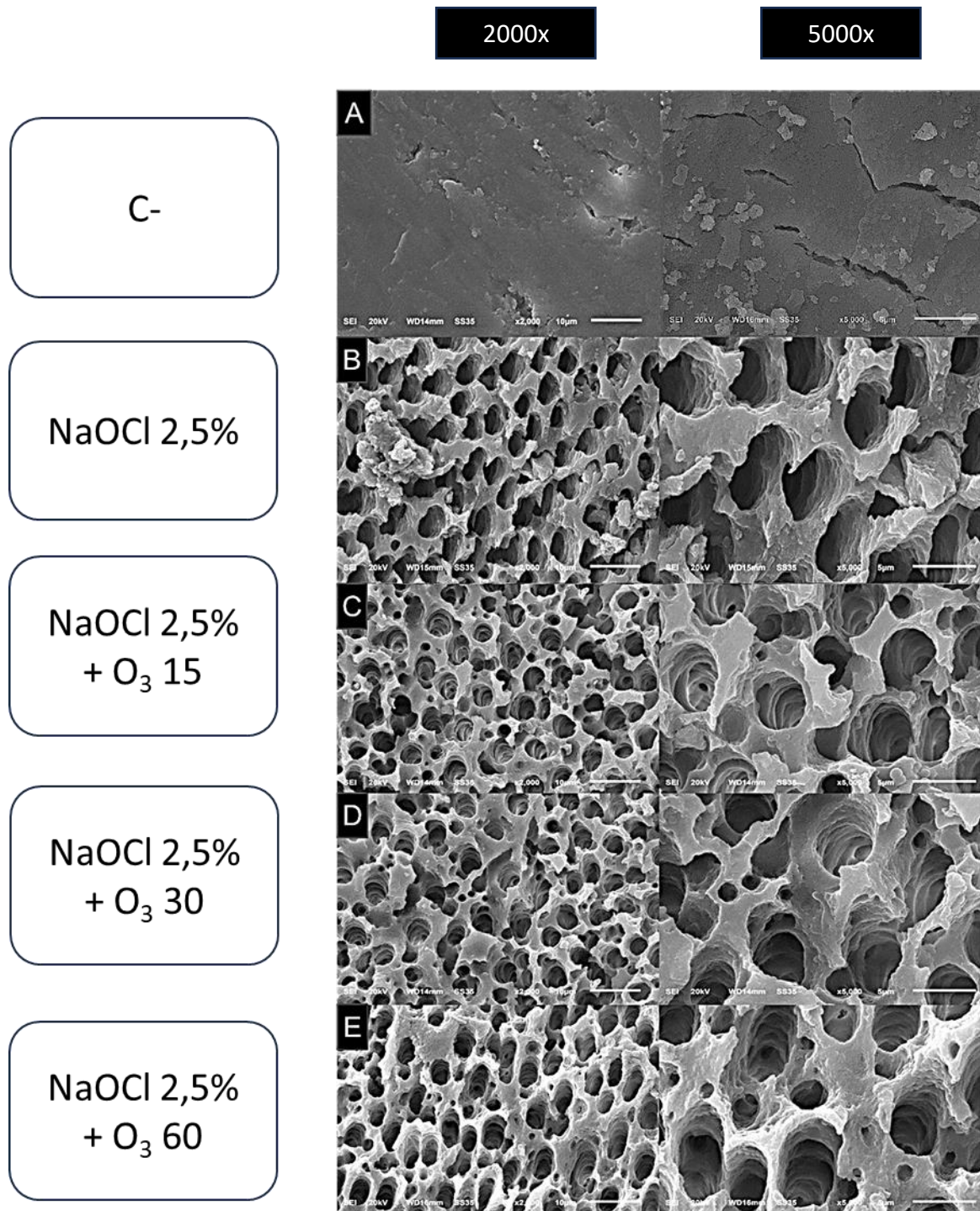
As análises realizadas por MEV possibilitaram uma avaliação qualitativa da presença de bactérias na superfície interna do SCR, bem como dos efeitos das soluções irrigantes na estrutura dentinária, após a aplicação dos protocolos de remoção de biofilme nos diferentes grupos. Para interpretar os resultados, foram capturadas imagens com ampliação de 2000x.

Para o grupo controle negativo (Figura 26A), foi possível observar a presença de biofilmes densos e maduros distribuídos pelo conduto radicular de forma homogênea, demonstrando o crescimento efetivo da bactéria dentro do período de 21 dias. Nos grupos NaOCl (Figura 26B) e Clorexidina 2% (Figura 26F), foi possível visualizar algumas bactérias pelo conduto radicular, porém em baixa quantidade, mas no grupo NaOCl foram visualizados alguns pontos de precipitado do sal e erosão dentinária.

Nos grupos com água ozonizada (Figura 26J) foi possível visualizar uma maior quantidade de bactérias pelo conduto radicular. Já nos grupos de ozônio gasoso, esse número diminui conforme a concentração aumenta de 15 (Figura 26K), 30 (Figura 26L) e 60 µg/mL (Figura 26M). No grupo óleo de girassol ozonizado (Figura 26N) houve presença de bactérias semelhante aos grupos NaOCl 2,5% (Figura 26B) e clorexidina 2% (Figura 26F), porém apresentou alguns túbulos obliterados pelo óleo e presença de imagens sugestivas de óleo no conduto radicular não obstruindo os túbulos, o que pode ocasionar falhas de adesividade e menor penetração de cimento obturador.

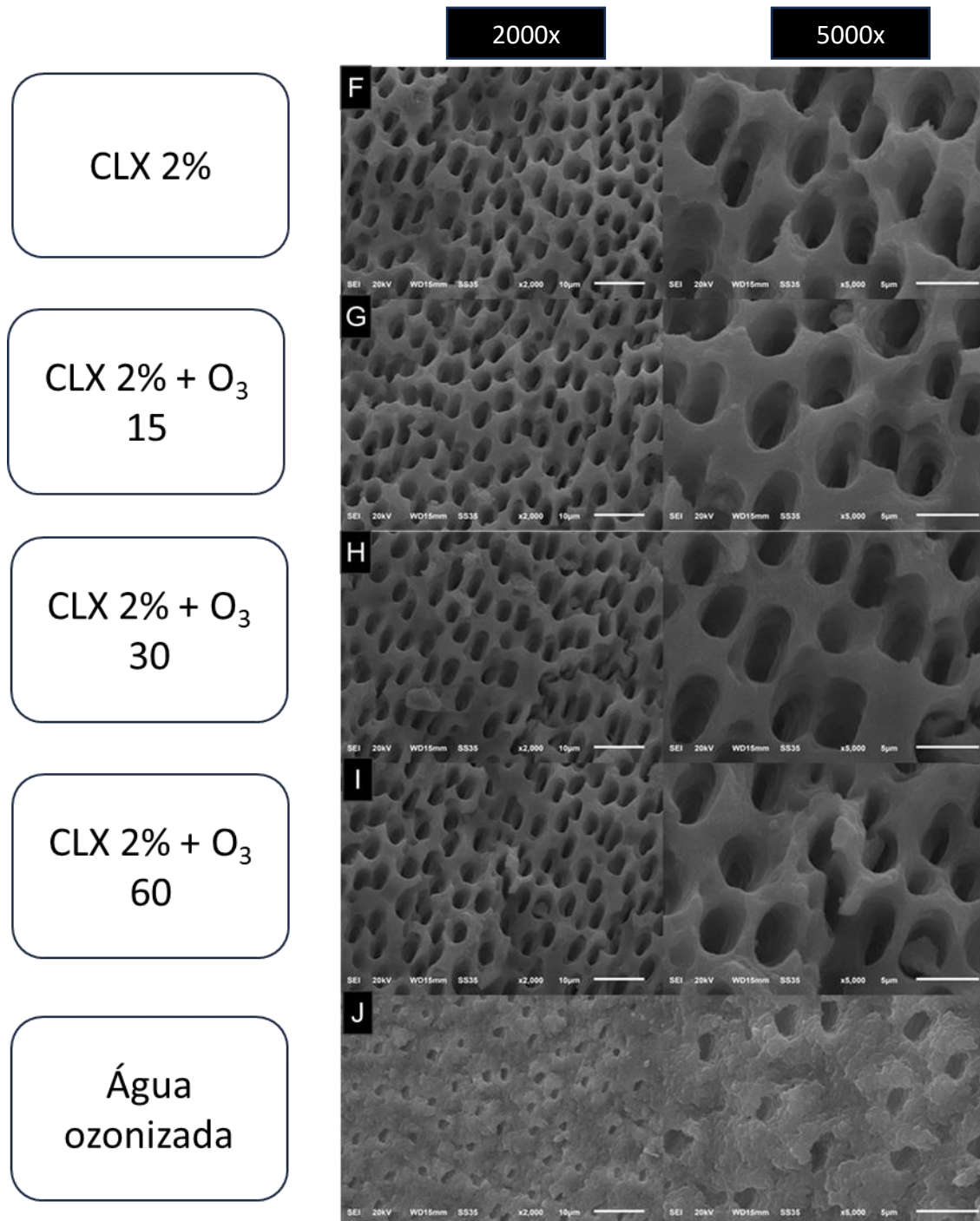
Nos grupos associados, a associação de NaOCl 2,5% + ozônio gasoso (Figura 26C-D-E) demonstrou imagens semelhantes ao grupo NaOCl 2,5% (Figura 26B), porém com maior erosão dentinária e presença de precipitado de sal. Já o grupo Clorexidina 2% associada ao ozônio gasoso (Figura 26G-H-I) apresentou baixa quantidade de bactérias aderidas, sem alteração da dentina. Os efeitos antimicrobianos se potencializaram com o aumento da concentração do ozônio gasoso, sendo que, em 60 (Figura 26M), a dentina apresentou ausência de microrganismos aderidos à mesma.

Figura 26 - Fotomicrografias da superfície dentinária em 2000x a esquerda e 5000x a direita, das diferentes soluções aplicadas no interior do conduto radicular, respectivamente dos grupos: Controle negativo (A), NaOCl 2,5% (B); ozônio gasoso 15 + NaOCl 2,5% (C) ozônio gasoso 30 + NaOCl 2,5%, (D), ozônio gasoso 60 + NaOCl 2,5% (E), clorexidina 2%(F), ozônio gasoso 15 + clorexidina 2% (G), ozônio gasoso 30 + clorexidina 2% (H), ozônio gasoso 60 + clorexidina 2% (I), água ozonizada (J), ozônio gasoso 15 (K); ozônio gasoso 30 (L), ozônio gasoso 60 (M), óleo de semente de girassol ozonizado 330 mmol.Eq/kg (N), óleo de semente de girassol ozonizado 660 mmol.Eq/Kg (O).



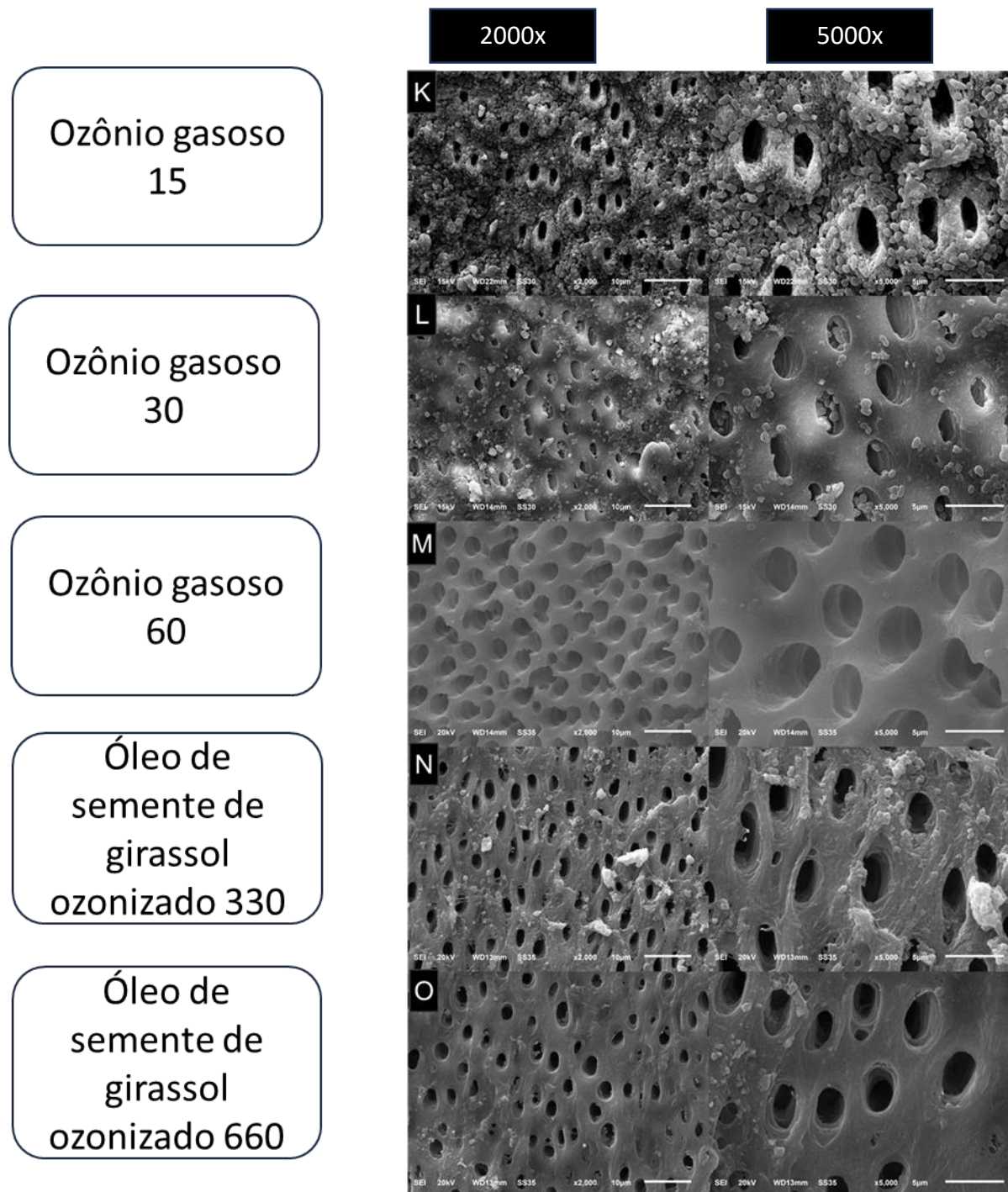
Fonte: Autor

Figura 26 - Fotomicrografias da superfície dentinária em 2000x a esquerda e 5000x a direita, das diferentes soluções aplicadas no interior do conduto radicular, respectivamente dos grupos: Controle negativo (A), NaOCl 2,5% (B); ozônio gasoso 15 + NaOCl 2,5% (C) ozônio gasoso 30 + NaOCl 2,5%, (D), ozônio gasoso 60 + NaOCl 2,5% (E), clorexidina 2%(F), ozônio gasoso 15 + clorexidina 2% (G), ozônio gasoso 30 + clorexidina 2% (H), ozônio gasoso 60 + clorexidina 2% (I), água ozonizada (J), ozônio gasoso 15 (K); ozônio gasoso 30 (L), ozônio gasoso 60 (M), óleo de semente de girassol ozonizado 330 mmol.Eq/kg (N), óleo de semente de girassol ozonizado 660 mmol.Eq/kg (O).



Fonte: Autor

Figura 26 - Fotomicrografias da superfície dentinária em 2000x a esquerda e 5000x a direita, das diferentes soluções aplicadas no interior do conduto radicular, respectivamente dos grupos: Controle negativo (A), NaOCl 2,5% (B); ozônio gasoso 15 + NaOCl 2,5% (C) ozônio gasoso 30 + NaOCl 2,5%, (D), ozônio gasoso 60 + NaOCl 2,5% (E), clorexidina 2%(F), ozônio gasoso 15 + clorexidina 2% (G), ozônio gasoso 30 + clorexidina 2% (H), ozônio gasoso 60 + clorexidina 2% (I), água ozonizada (J), ozônio gasoso 15 (K); ozônio gasoso 30 (L), ozônio gasoso 60 (M), óleo de semente de girassol ozonizado 330 mmol.Eq/kg (N), óleo de semente de girassol ozonizado 660 mmol.Eq/kg (O).



Fonte: Autor

4.3 TESTE DE *PUSH-OUT*

A análise estatística utilizando ANOVA de dois fatores revelou diferenças significativas entre os fatores "protocolo" e "terço radicular" ($p < 0,05$). O teste de comparações múltiplas de Tukey indicou que os maiores valores de resistência de união foram registrados no terço cervical, onde os diferentes protocolos de remoção apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. No terço médio, os grupos tratados com NaOCl 2,5% e clorexidina 2% apresentaram os maiores valores de resistência, sendo estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) ao obtido com o método de remoção do óleo de semente de girassol ozonizado associado ao PUI. Os dois métodos de irrigação do óleo de semente de girassol ozonizado, entretanto, não apresentaram semelhança estatística entre si. No terço apical, os valores médios obtidos para NaOCl 2,5% e clorexidina foram semelhantes entre si ($p < 0,05$) e comparáveis aos do grupo em que o óleo de semente de girassol ozonizado foi removido com NaOCl a 2,5% associado ao PUI ($p < 0,05$).

Os dados obtidos no ensaio de *push-out* estão apresentados na Tabela 4. Foram analisados as soluções irrigantes e os métodos de remoção do óleo de girassol ozonizado utilizando NaOCl a 2,5%, com e sem ativação ultrassônica. Ao avaliar isoladamente cada terço radicular, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na resistência de união em função dos métodos de remoção utilizados ($p < 0,05$). Além disso, ao comparar os terços radiculares para cada método, também foram identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os menores valores de resistência de união foram encontrados no terço apical, os grupos NaOCl 2,5%, clorexidina 2% e remoção de óleo de girassol ozonizado de girassol com NaOCl 2,5% +PUI foram estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$), enquanto o grupo remoção de óleo de girassol ozonizado com NaOCl apresentou-se estatisticamente diferente.

Tabela 4 - Teste de Push-out para média da resistência de união em MPa $\pm$ desvio padrão nos grupos experimentais em relação à cada terço radicular.

Grupos	Terço radicular		
	Cervical	Médio	Apical
NaOCL 2,5% + EDTA	3,30 $\pm$ 0,59 ^{aA}	2,83 $\pm$ 0,43 ^{aA}	2,10 $\pm$ 0,53 ^{aB}
Clorexidina 2% + EDTA	3,26 $\pm$ 0,51 ^{aA}	2,78 $\pm$ 0,38 ^{aA}	2,14 $\pm$ 0,46 ^{aB}
Oleo + NaOCl 2,5% + EDTA	2,57 $\pm$ 0,73 ^{bA}	1,94 $\pm$ 0,82 ^{bB}	1,40 $\pm$ 0,55 ^{bC}
Óleo + NaOCl 2,5% + Ultrassom + EDTA	3,10 $\pm$ 0,44 ^{aA}	2,45 $\pm$ 0,78 ^{aAB}	2,01 $\pm$ 0,38 ^{aB}

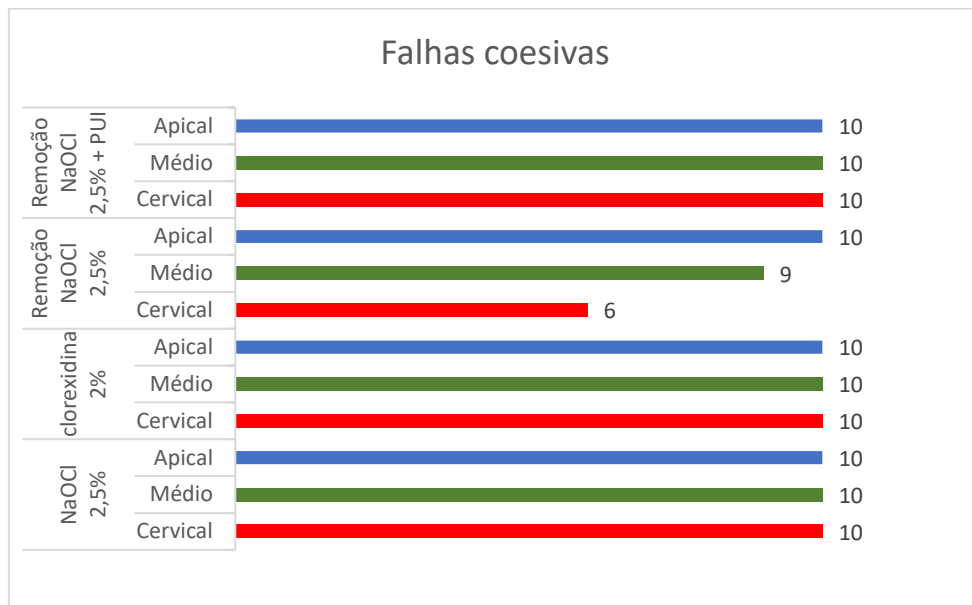
* Diferentes letras minúsculas na mesma coluna e diferentes letras maiúsculas nas linhas indicam diferença estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Fonte: Autor.

4.3.1 Ensaio do Tipo de Falha Ocorrida

A análise dos tipos de falha foi realizada em 10 corpos de prova para cada terço radicular (cervical, médio e apical) de cada grupo experimental (NaOCl 2,5%, clorexidina 2%, óleo de girassol ozonizado + NaOCl a 2,5% e óleo de girassol ozonizado + NaOCl a 2,5% com ultrassom). Nos grupos tratados com NaOCl 2,5%, clorexidina 2% e óleo de girassol ozonizado removido utilizando NaOCl 2,5% com ativação ultrassônica (PUI), observou-se uma predominância de falhas coesivas. No grupo óleo de girassol ozonizado + NaOCl a 2,5%, foram registradas quatro amostras com falhas mistas na região cervical e uma em região de terço médio (Figura 21).

Figura 27 – Valores obtidos para as falhas coesivas nos diferentes terços radiculares.



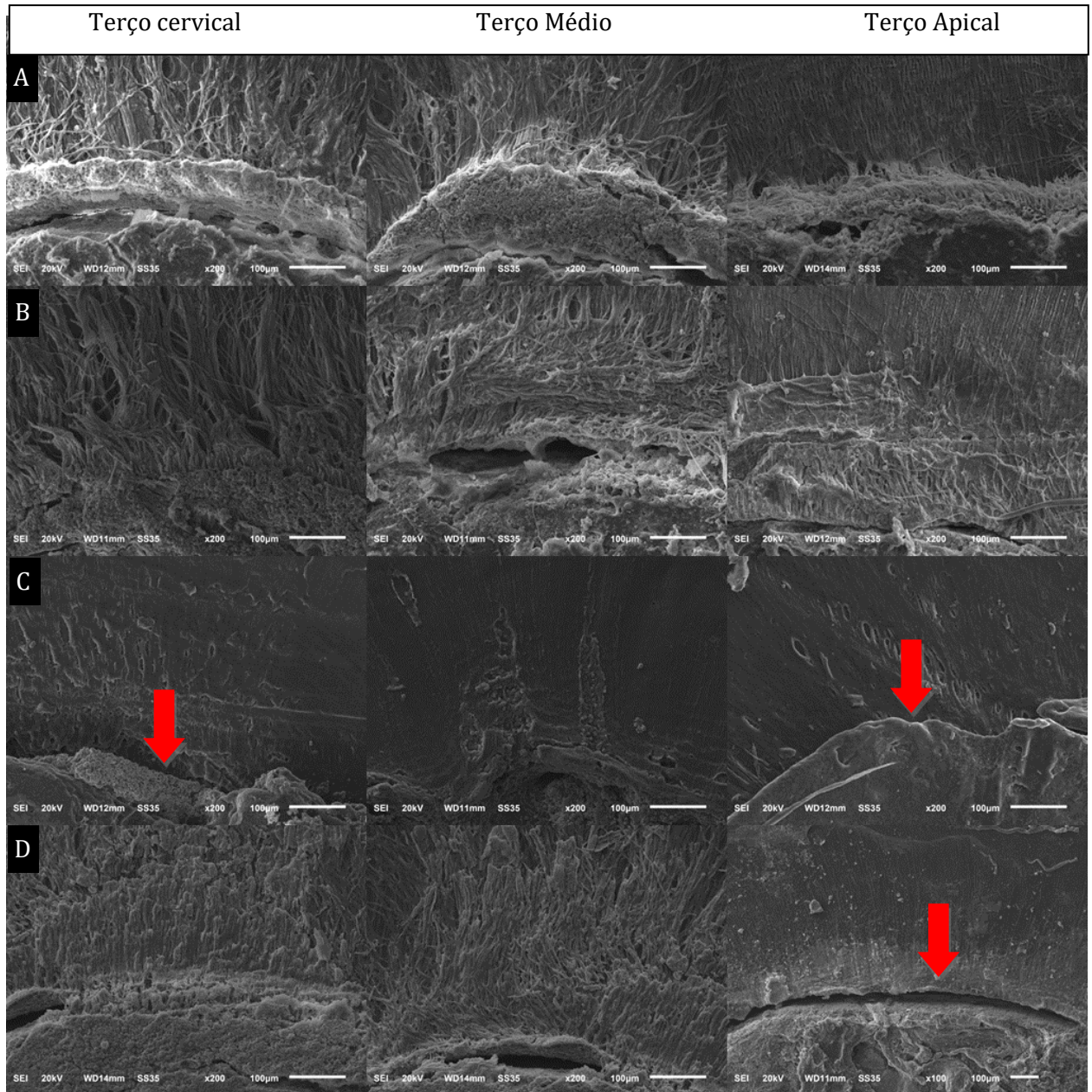
Fonte: Autor

4.3.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise de interface de união do cimento endodôntico por meio de MEV, demonstrou que os grupos NaOCl 2,5% e clorexidina 2% obtiveram melhores resultados apresentando cimento no interior dos túbulos dentinários em todos os terços analisados. A presença de cimento nos túbulos dentinários diminui conforme a profundidade no interior do canal radicular, sendo a menor em região de terço apical (Figura 28A - Terço Apical; Figura 28B – Terço Apical).

O grupo remoção de óleo com NaOCl 2,5% apresentou baixa interface de união de cimento e, em algumas amostras e terços, ausência de cimento nos túbulos dentinários (Figura 28C – Todos os terços). A ausência do cimento percorrendo os túbulos dentinários é mais presente em região de terço apical, indicando a possível obliteração dos túbulos dentinários pela solução oleosa. O grupo de remoção de ozônio com NaOCl 2,5% + ultrassom (Figura 28D) apresentou maior interface de união em relação ao grupo remoção apenas com NaOCl 2,5%, porém menor que os grupos NaOCl 2,5% e CLX 2%.

Figura 28 – Fotomicrografias da interface de união em ordem de linha para A- NaOCl 2,5%, B- clorexidina 2%, C-remoção de óleo de girassol ozonizado com NaOCl 2,5% e D- remoção de óleo de girassol ozonizado com NaOCl 2,5% + PUI, da interface cimento/dentina no aumento de 200x. As colunas determinam os Terços: Cervical, médio; e apical. Setas: Indicam a região de espaço entre dentina e material obturador, nas quais houve baixa ou nenhuma penetração de cimento.



Fonte: Autor.

5 DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, a hipótese nula deste trabalho foi rejeitada, considerando que a utilização de ozônio, em suas diferentes formas de aplicação (água ozonizada, ozônio gasoso e óleo de girassol ozonizado), apresentou eficácia antimicrobiana, em níveis diferentes, na eliminação de biofilmes de *E. faecalis* presentes no SCR. Foi demonstrado que há diferenças estatisticamente significativas na eficácia de descontaminação dos canais radiculares entre os diferentes agentes antimicrobianos testados, com destaque para a combinação envolvendo ozônio gasoso associado a clorexidina 2%, que resultou em um aumento significativo na eliminação dos biofilmes. Além disso, o método de remoção do óleo ozonizado com PUI e NaOCl 2,5% impactou positivamente na resistência de união do cimento endodôntico à dentina, contrariando as premissas da hipótese nula.

O protocolo de coleta adotado, baseado em Goulart et al. (2024), permitiu uma maior coleta do biofilme presente no SCR quando comparado a metodologias clássicas baseadas na utilização de cones de papel (Sathorn et al., 2007). Este diferencial metodológico torna os achados microbiológicos mais confiáveis e próximos da realidade clínica, uma vez que o biofilme maduro é mais resistente à ação de irrigantes e medicamentos intracanal convencionais.

A contagem de UFC após os protocolos de irrigação confirmou que o hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% continua sendo um dos agentes mais eficazes na eliminação de biofilmes, corroborando estudos anteriores (Pinheiro et al., 2018; Arias-Moliz et al., 2015; Ruksakiet et al., 2020). No entanto, a combinação de ozônio gasoso com NaOCl 2,5% não demonstrou um efeito sinérgico significativo, sendo estatisticamente semelhante ao grupo tratado apenas com hipoclorito de sódio. A ausência de sinergismo estatisticamente significativo quando associado ao ozônio gasoso sugere que a saturação da capacidade oxidativa de ambas pode limitar ganhos adicionais de eficácia, o que também foi sugerido por Araujo et al. (2024).

Com relação aos resultados do ozônio gasoso, os valores obtidos demonstram potencial de descontaminação do SCR, conforme o aumento da concentração, período de tempo de exposição e fluxo de borbulhamento proposto. Silva et al. (2020), realizaram uma revisão bibliográfica que demonstrou uma relação entre tempo de aplicação e concentração do ozônio gasoso aplicado nos biofilmes microbianos,

indicando o aumento do potencial antimicrobiano intimamente relacionado a esses parâmetros. Esta correlação vai de encontro aos resultados obtidos neste estudo, o qual utilizou de um aumento gradativo de concentração, fluxo maior de 5 mL/min e o tempo maior de ação continua da solução de 5 min.

A associação de clorexidina a 2% com ozônio gasoso promoveu uma eliminação quase total dos biofilmes, sugerindo uma ação sinérgica entre os compostos (Noites et al., 2014; Silva et al., 2020). Essa interação pode estar relacionada à capacidade oxidante do ozônio sobre estruturas orgânicas, tornando as bactérias mais suscetíveis à ação antimicrobiana da clorexidina. Ao entrar em contato com o meio aquoso, o ozônio gera espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1O_2$) e radical hidroxila ($\bullet OH$), que possuem alta capacidade oxidativa (Alfei et al., 2024). Essas espécies provocam lesões nos componentes do biofilme, especialmente na matriz exopolissacarídica (EPS), cuja integridade é fundamental para a resistência microbiana. Por meio de reações de oxidação, como as de Fenton e Haber–Weiss, ocorre a fragmentação das ligações covalentes de polissacarídeos e proteínas, resultando na desorganização da estrutura tridimensional do biofilme e facilitando a penetração de agentes antimicrobianos. A clorexidina, por sua vez, apresenta eficácia reduzida contra biofilmes maduros devido à sua limitada capacidade de degradação de estruturas orgânicas. Portanto, a aplicação prévia de ozônio pode aumentar a permeabilidade do biofilme e potencializar a ação da clorexidina (Alfei et al., 2024). Esses resultados são relevantes, pois indicam que a combinação de ozônio gasoso com clorexidina pode ser uma alternativa clinicamente viável para descontaminação de canais radiculares infectados, especialmente em casos de infecções persistentes, promovendo a descontaminação total do conduto radicular, e uma melhor regeneração dos tecidos periapicais pela ausência da interferência microbiana.

Além disso, a análise por MEV confirmou os achados microbiológicos, mostrando túbulos dentinários livres de microrganismos nos grupos tratados com CLX + ozônio, enquanto nos grupos de NaOCl com ou sem ozônio foram observadas colônias residuais e maior grau de erosão da dentina, evidenciando um efeito colateral potencial da combinação química na estrutura dentinária (Haapasalo et al., 2010).

A água ozonizada, embora apresente benefícios em termos de biocompatibilidade e estímulo à regeneração tecidual (Shetty et al., 2022; Floare et

al., 2021), demonstrou menor eficácia antimicrobiana neste estudo, o que corrobora achados de Nagayoshi et al. (2004) e Galdeano et al. (2018). Sua instabilidade em temperatura ambiente e rápida decomposição limitam seu potencial de uso como irrigante principal, mas não excluem sua utilidade como coadjuvante em protocolos clínicos específicos.

O óleo ozonizado vem sendo estudado na endodontia como irrigante intracanal demonstrando resultados próximos, porém inferiores, ao NaOCl 2,5% (Mittal et al., 2022; Mundhra et al., 2023). O potencial de remoção de biofilme é ampliado quando o óleo ozonizado é agitado com ultrassom, demonstrando, nesse caso, resultados mais próximos ao NaOCl 2,5%. (Mittal et al., 2022). Os resultados demonstraram eficácia comparável ao NaOCl 2,5% no grupo com concentração de 660 mmol.Eq/kg. A literatura já aponta o óleo ozonizado como uma alternativa viável, com ação prolongada devido à liberação lenta de ozonídeos e peróxidos (Kishore et al., 2016; Murugesan et al., 2022). Contudo, sua alta viscosidade dificulta a remoção completa do canal, levantando preocupações quanto à interferência na adesão de cimentos endodônticos.

Para contornar essa limitação, a utilização do sistema de irrigação com ativação por ultrassom (PUI) associada ao NaOCl demonstrou-se eficaz na remoção do óleo, como evidenciado nos resultados de *push-out*. Essa estratégia se mostrou superior à irrigação convencional com NaOCl 2,5%, embora inferior aos grupos sem uso prévio de óleo. A literatura corrobora o potencial do PUI em promover cavitação e microfluxos que aumentam a penetração do irrigante e a remoção de detritos e substâncias viscosas (van der Sluis et al., 2007; Jiang et al., 2010).

Os resultados de resistência de união demonstraram, de forma complementar, que a remoção inadequada de resíduos do óleo ozonizado pode comprometer significativamente a adesão dos cimentos endodônticos à dentina, afetando diretamente o sucesso do selamento apical. Isso reforça a necessidade de estratégias eficazes de irrigação final, sendo o PUI uma abordagem promissora, conforme demonstrado por Wagner et al. (2017), que apontaram sua superioridade na remoção de resíduos em relação a métodos passivos.

A presença de resíduos oleosos observada na análise por MEV nos grupos com óleo ozonizado reforça a hipótese de que a sua completa eliminação requer

protocolos complementares ou combinados, como o uso de agentes surfactantes ou aumento do tempo de agitação ultrassônica, o que poderia ser investigado em estudos futuros. Além disso, a avaliação da citotoxicidade residual dessas formulações no periápice ainda é limitada, sendo crucial investigar se a presença de peróxidos ou ozonídeos residuais pode interferir na resposta biológica dos tecidos adjacentes.

A remoção do óleo com NaOCl 2,5% ativado por ultrassom (PUI) melhorou a interface de união em comparação com a remoção convencional apenas com hipoclorito, reforçando os resultados de estudos prévios que demonstram que a ativação ultrassônica potencializa a remoção de resíduos oleosos e melhora a adesão dos materiais restauradores (Narimatsu *et al.* 2021, Macedo *et al.*, 2013, Gu *et al.*, 2009).

Muitos estudos demonstram que a ativação ou sinergia das soluções e protocolos pode potencializar a remoção de biofilme do interior do canal radicular (Hasheminia *et al.*, 2013; Noites *et al.*, 2014; Duque *et al.*, 2023; Gomes *et al.*, 2023). O estudo de Noites *et al.*, 2014 realizado com ozônio e NaOCl 2,5 % demonstrou que ocorre sinergia entre as soluções na remoção de biofilme. No atual estudo, os resultados foram diferentes ao estudo de Noites *et al.*, 2014, demonstrando que não ocorreu aumento do potencial antimicrobiano, e as imagens de MEV, demonstraram a presença de regiões com maior erosão. Além disso, no grupo NaOCl 2,5% houve a presença de detritos, proporcionados pela própria substância, enquanto os grupos que foram borbulhados com ozônio, obtiveram uma maior limpeza dos detritos, o que pode sugerir que a ação do ozônio ou do borbulhamento proporcionou uma maior remoção de *smear layer*, sujidades e erosão dentinária no canal radicular. Tais características são semelhantes ao processo ocasionado pelo PUI que gera bolhas, cuja implosão gera energia que potencializa sua ação promovendo maior limpeza do canal radicular (van der Sluis *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2017).

Os resultados de contagem de UFC e as imagens de MEV indicaram que ozônio gasoso borbulhado em clorexidina a 2% promoveu total remoção dos biofilmes maduros presentes no SCR. Tais resultados sugerem que existe sinergia entre as substâncias, e que o ozônio consegue potencializar a ação antibiofilme da clorexidina. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Noites *et al.*, 2014, que avaliou a ação do ozônio gasoso associado à clorexidina 2% em diferentes microrganismos e obteve total eliminação dos mesmos.

Os resultados deste estudo destacam o potencial promissor da sinergia entre clorexidina 2% e ozônio gasoso na descontaminação do SCR, possivelmente devido à amplificação da atividade antimicrobiana proporcionada pelo ozônio. Além disso, considerando a capacidade do ozônio de promover a degradação de matéria orgânica (Silva *et al.*, 2020; Murugesan *et al.*, 2022), essa combinação pode ter contribuído para uma remoção mais eficaz de resíduos biológicos, embora esse aspecto não tenha sido diretamente avaliado no presente estudo.

Ambas as estratégias, a associação de clorexidina com ozônio gasoso e o uso do óleo de girassol ozonizado, demonstraram eficácia significativa na descontaminação do SCR e apresentam potencial para aplicação clínica. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a capacidade dessas combinações na remoção de tecido orgânico e os subprodutos gerados pela interação entre clorexidina e ozônio gasoso, além de investigar seus possíveis efeitos nos tecidos periapicais. Pesquisas sobre a citotoxicidade dessas formulações também são essenciais para garantir a segurança e viabilidade do seu uso na prática endodôntica.

Apesar dos resultados promissores, algumas questões permanecem em aberto, como a necessidade de investigações mais detalhadas sobre a citotoxicidade das diferentes combinações de ozônio e seus possíveis impactos no tecido periapical. Estudos futuros devem explorar também a influência do ozônio na remoção de tecidos orgânicos e sua interação com materiais obturadores a longo prazo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a utilização do ozônio, em suas diferentes formas de aplicação (ozônio gasoso, água ozonizada e óleo de girassol ozonizado), apresenta potencial antimicrobiano significativo contra biofilmes maduros de *Enterococcus faecalis* presentes no SCR. Em particular, a combinação de clorexidina 2% com ozônio gasoso mostrou uma ação sinérgica, resultando na maior redução da carga microbiana. Os que indica a eficácia do ozônio, especialmente quando combinado à clorexidina, na desinfecção endodôntica, sugerindo sua viabilidade como alternativa complementar aos irrigantes tradicionais.

A análise da resistência de união do cimento endodôntico à dentina mostrou que a remoção do óleo ozonizado com NaOCl 2,5% e PUI apresentou melhores resultados em termos de adesão do material obturador, minimizando potenciais efeitos adversos da presença residual do óleo ozonizado nos túbulos dentinários.

REFERÊNCIAS

- AFKHAMI, F.; POURHASHEMI, S. J.; SADEGH, M.; SALEHI, Y.; FARD, M. J. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dentistry**, v.43, n.12, p.1573–1579, 2015.
- ALKAOUD, R. A.; MOHAMMED, Y. H.; GALILAH, A. A.; ALGHAMDI, S. A.; ALHABASHI, N. A. Prognostic Factors in Determining Success and Failure Rates in Endodontics. **Journal of Healthcare Sciences**. v.4, n.1, p.622-629, 2024.
- ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.44, n.7, p.1818–1824, 2000.
- ANDREANI, Y.; GAD, B. T.; COCKS, T. C.; HARRISON, J.; KERESZTES, M. E.; POMFRET, J. K.; REES, E. B.; MA, D.; BALOUN, B. L.; RAHIMI, M. Comparison of irrigant activation devices and conventional needle irrigation on smear layer and debris removal in curved canals. (Smear layer removal from irrigant activation using SEM). **Australian Endodontic Journal: the journal of the Australian Society of Endodontology Inc**, v.47, n.2, p.143–149, 2021.
- ARAUJO, C. A.; MACÊDO, A. F. L.; SANT'ANNA JUNIOR, A. Main findings from the use of ozone therapy alone or combined with conventional treatments in root canal treatment: a systematic review. **Journal of Medical and Health Sciences**, v.5, n.3, p.1-7, 2024
- BASRANI, B. R.; MANEK, S.; SODHI, R. N.; FILLERY, E.; MANZUR, A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **Journal of Endodontics**, v.33, n.8, p.966–969, 2007.
- BAYRAM, E.; BAYRAM, H. M.; ASLAN, T.; USTÜN, Y. Does MTA and Calcium Hydroxide Additives Effect on the Bond Strength of AH Plus Sealer? **Journal of Dental Sciences**, v. 6, n. 1, p. 25-31, 2018.
- BERBER, V. B.; GOMES, B. P.; SENA, N. T.; VIANNA, M. E.; FERRAZ, C. C. R.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **International Endodontic Journal**. v. 39, p. 10–17, 2006.
- BERKITEN, M.; BERKITEN, R.; OKAR, I. Comparative evaluation of antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation in root canals and dentinal tubules. **Journal of Endodontic**, v.26, n.5, p.268-70, 2000.
- BOCH, T.; TENNERT, C.; VACH, K.; AL-AHMAD, A.; HELLWIG, E.; POLY-DOROU, O. Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm-an in vitro study. **Clinical Oral Investigations**. v.20, n.17, p.33–39, 2016.

BOUTSIOUKIS, C.; PSIMMA, Z.; KASTRINAKIS, E. The effect of flow rate and agitation technique on irrigant extrusion ex vivo. **International Endodontic Journal**, v.47, n.1, p.487–496, 2014.

BOUTSIOUKIS, C.; ARIAS-MOLIZ, M. T. Present status and future directions - irrigants and irrigation methods. **International Endodontic Journal**, v.55, n.3, p.588–612, 2022.

BUSANELLO, F. H.; PETRIDIS, X.; SO, M. V. R.; DIJKSTRA, R. J. B.; SHARMA, P. K.; VAN DER SLUIS, L. W. M. Chemical biofilm removal capacity of endodontic irrigants as a function of biofilm structure: optical coherence tomography, confocal microscopy and viscoelasticity determination as integrated assessment tools. **International endodontic journal**, v.52, n.4, p.461–474, 2019.

BRESSAN, C. R. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* de um medicamento intracanal à base de N-aceticisteína**. Orientador: André Pitondo da Silva. 2023. Dissertação (Mestrado em Odontologia com ênfase em endodontia) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2023.

CHAU, N. P.; CHUNG, N. H.; JEON, J. G. Relationships between the antibacterial activity of sodium hypochlorite and treatment time and biofilm age in early *Enterococcus faecalis* biofilms. **International Endodontic Journal**, v.48, n.8, p.782–789, 2015.

CENCI, A.; MACCHIA, I.; LA SORSA, V.; SBARIGIA, C.; DI DONNA, V.; PIETRAFORTE, D. Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages with Reference to SARS-CoV-2. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1-20, 2022.

DASH, T.; MOHAN, R. P.; MANNAVA, Y.; THOMAS, M. S.; SRIKANTH, N. Effect of storage temperature and heating on the concentration of available chlorine and pH of 2.5% sodium hypochlorite. **Saudi Endodontic Journal**. v.7, n.1, p.161–165, 2017.

DE DEUS, Q. D. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canals. **Journal of Endodontics**, v.1, n.11, p.361–366, 1975.

DEWHIRST, F. E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B. J.; TANNER, A. C.; RYU, W.; LAKSHMANAN, A.; WADE, W. G. The Human Oral Microbiome. **Journal of Bacteriology**. v.192, n.19, 2010.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167–193, 2002.

DUGGAN, J. M.; SEDGLEY, C. M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontic**. v. 33, n. 7, p. 815-818, 2007.

DUQUE, C.; SOUZA, A. C. A.; AIDA, K. L.; PEREIRA, J. A.; CAIAFFA, K. S.; SANTOS, V. R. D.; COSME-SILVA, L.; PRAKKI, A. Synergistic antimicrobial potential

of EGCG and fosfomycin against biofilms associated with endodontic infections. **Journal of Applied Oral Science: revista FOB**, v.31, p.1-13, 2023

ELASHIRY, M. M.; BERGERON, B. E.; TAY, F. R. *Enterococcus faecalis* in secondary apical periodontitis: Mechanisms of bacterial survival and disease persistence. **Microbial Pathogenesis**, v.183, 2023.

FLOARE, A. D.; SCURTU, A. D.; BALEAN, O. I.; CHIORAN, D.; BUZATU, R.; SAVA ROSIANU, R.; ALEXA, V. T.; JUMANCA, D.; RUSU, L.-C.; RACEA, R. C.; CORICOVAC, D.; PINZARU, I.; DEHELEAN, C. A.; GALUSCAN, A. The Biological Effects of Ozone Gas on Soft and Hard Dental Tissues and the Impact on Human Gingival Fibroblasts and Gingival Keratinocytes. **Processes**. v.9, n.12, p.1-12, 2021.

GALDEANO, M. A.; WILHELM, A. E.; GOULART, I. B.; TONON, R. V.; FREITAS-SILVA, O.; GERMANI, R.; CHÁVEZ, D. W. H. Effect of water temperature and pH on the concentration and time of ozone saturation. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.21, n.1, p.1-7, 2017.

GEBREYOHANNES, G.; NYERERE, A.; BII, C.; SBHATU, D. B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. **Heliyon**, v.5, n.8, p.1-7, 2019.

GIARDINO, L.; PEDULLÀ, E.; CAVANI, F.; BISCOTTI, F.; GIANNETTI, L.; CHECCHI, V.; ANGERAME, D.; CONSOLO, U.; GENERALI, L. Comparative Evaluation of the Penetration Depth into Dentinal Tubules of Three Endodontic Irrigants. **Materials**. v.14, n.19, p.1-9, 2021.

GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; VIANNA, M. E.; BERBER, V. B.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v.34, n.6, p.424–428, 2001.

GOMES, B. P.; PINHEIRO, E. T.; SOUSA, E. L.; JACINTO, R. C.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; DE SOUZA-FILHO, F. J. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.102, n.2, p.247–253, 2006.

GOMES, B. P. F. A.; AVEIRO, E.; KISHEN, A. Irrigants and irrigation activation systems in Endodontics. **Brazilian Dental Journal**, v. 34, n. 4, p. 1-33, 2023.

GOULART, R. S.; OLIVEIRA-SILVA, M.; FARIA-JUNIOR, M.; SILVA-SOUSA, Y. T. C.; MIRANDA, C. E. S.; PITONDO-SILVA, A. Optimized protocol for collecting root canal biofilms for in vitro studies. **Journal of Microbiological Methods**, v.226, p.1-8, 2024.

GU, L. S.; KIM, J. R.; LING, J.; CHOI, K. K.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. **Journal of Endodontics**, v.35, n.6, p.791–804. 2009.

GUIVARC'H, M.; ORDIONI, U.; AHMED, H. M.; COHEN, S.; CATHERINE, J. H.; BUKIET, F. Sodium hypochlorite accident: a systematic review. **Journal of Endodontic**, v.43, n.1, p.16–24, 2017.

HASHEMINIA, S.; FARHAD, A. R.; SAATCHI, M.; RAJABZADEH, M. Synergistic antibacterial activity of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Oral Science**, v.55, n.4, p.275–280, 2013.

HORIUCHI, Z, H, F, N. **Influência dos sistemas de obturação MicroSeal e Obtura II na força de união de diferentes materiais endodônticos à dentina intrarradicular**. Orientador: Prof. Dr. Edson Alfredo. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia com ênfase em endodontia) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

HUANG, X.; ZHANG, K.; DENG, M.; EXTERKATE, R. A.M.; LIU, C.; ZHOU, X.; CHENG, L.; CATE, J. M. T. Effect of arginine on the growth and biofilm formation of oral bacteria. **Archives of Oral Biology**. v. 82, p.256-262, 2017.

HUANG, D.; WANG, X., LIANG, J.; LING, J., BIAN, Z.; YU, Q.; HOU, B.; CHEN, X.; LI, J.; YE, L.; CHENG, L.; XU, X.; HU, T.; WU, H.; GUO, B.; SU, Q.; CHEN, Z.; QIU, L.; CHEN, W.; WEI, X.; ZHOU, X. Expert consensus on difficulty assessment of endodontic therapy. **International Journal Of Oral Science**, v.16, n.1, p.22, 2024.

JENSEN, P. Ø., GIVSKOV, M., BJARNSHOLT, T., MOSER, C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS immunology and Medical Microbiology**, v.59, n.3, p.292–305, 2010.

JEONG, J. W.; SARMAST, N. D.; TERLIER, T.; VAN DER HOEVEN, R.; HOLLAND, J. N.; PARIKH, N. Assessment of the cytotoxic effects and chemical composition of the insoluble precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **International endodontic journal**, v.54, n.10, p.1892–1901, 2021.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.4, p.462–478, 1994.

JIANG, L. M.; VERHAAGEN, B.; VERSLUIS, M.; ZANGRILLO, C.; CUCKOVIC, D.; VAN DER SLUIS, L. W. An evaluation of the effect of pulsed ultrasound on the cleaning efficacy of passive ultrasonic irrigation. **Journal of Endodontics**, v.36, n.11, p.1887–1891, 2010.

KAUFMAN, B.; SPÅNGBERG, L.; BARRY, J.; FOUAD, A. F. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. **Journal of Endodontics**, v.31, n.12, p.851–856, 2005.

KAYAOGU, G.; OMÜRLÜ, H.; AKCA, G.; GÜREL, M.; GENÇAY, O.; SORKUN, K.; SALIH, B. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules, **Journal of Endodontic**. V.37, p.376–381, 2011.

KOMOROWSKI, R.; GRAD, H.; WU, X. Y.; FRIEDMAN, S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. **Journal of Endodontics**, v.26, n.6, p.315–317, 2000.

KISHEN, A.; HAAPASALO, M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. **Endodontic Topics**, v.22, n.1, p.58–78, 2010.

KISHORE, A.; OBULESU, G.; BABU, M. Determination of antimicrobial efficacy of calcium hydroxide, ozonated sesame oil and their combination as intra canal medicament against enterococcus faecalis—a study in Fathima Institute of Medical Sciences, Kadapa. **International Archives of Integrated Medicine**, v.3, n.8, p.219–227, 2016.

KRISHNAN, K.; CHEN, T.; PASTER, B. J. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. **Oral diseases**, v.23, n.3, p.276–286, 2017.
LI, B.; LI, X.; LIN, H.; ZHOU, Y. Curcumin as a Promising Antibacterial Agent: effects on metabolism and biofilm formation in *S. Mutans*. **Biomed Research International**. v. 2018, p.1-11, 2018

MACEDO, R. G.; WESSELINK, P. R.; ZACCHEO, F.; FANALI, D.; VAN DER SLUIS, L. W. M. Reaction rate of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. **International Endodontic Journal**, v.43, p.1108-15, 2010.

MACEDO, R. G.; VERHAAGEN, B.; RIVAS, D. F.; VERSLUIS, M.; WESSELINK, P. R.; VAN DER SLUIS, L. W. M. Cavitation measurement during sonic and ultrasonic activated irrigation. **Journal of Endodontics**, v.39, n.5, p.612–616. 2013.

MEGAHED, A.; ALDRIDGE, B.; LOWE, J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. **PloS one**, v.13, n.5, p.1-22, 2018.

MENEZES, M. M.; VALERA, M. C.; JORGE, A. O.; KOGA-ITO, C. Y.; CAMARGO, C. H.; MANCINI, M. N. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. **International Endodontic Journal**, v.37, n.5, p.311–319, 2004.

MITTAL, R.; TANDAN, M.; KAUSHIK, G. Antimicrobial efficacy of commercially available ozonated olive oil and sodium hypochlorite with and without ultrasonic activation in primary endodontic infections: A randomized clinical trial. **Endodontology**, v.34, n.2, p 102-107, 2022.

MOHAMMADI, Z.; SHALAVI, S.; KINOSHITA, J. I.; GIARDINO, L.; GUTMANN, J. L.; RAD, S. A. B.; UDOYE, C. I.; JAFARZADEH, H. A Review on Root Canal Irrigation Solutions in Endodontics. **Journal of Dental Materials & Techniques**, v.10, n.3, p.1-12, 2021.

MUNDHRA, R.; NAGPAL, R.; GUPTA. P. K.; JAJU, N.; DHOTE, S. S. Comparison of disinfecting potential of 3%naocl, 2%chx, ozonated olive oil and diode laser in

infected root canals by enterococcus faecalis -An in vitro study. **Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research**, v. 11, n. 6, p.47-52, 2023.

MURUGESAN, K.; VISHWANATH, S.; KADANDALE, S.; THANIKACHALAM, Y.; PARTHASARATHY, R.; ILANGO, S. Comparative Evaluation of Smear Layer Removal in Apical Third Using Four Different Irrigants with Ultrasonic Agitation: An In Vitro Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis. **Cureus**, v.14, n.3, p.1-9, 2022.

ARIAS-MOLIZ, M. T. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. **Journal of Endodontic**, v. 35, n. 5, p. 711-714, 2009.

NAENNI, N.; THOMA, K.; ZEHNDER, M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. **Journal of Endodontics**, v.30, n.11, p.785–787, 2004.

NARIMATSU, D. K.; MAEKAWA, L. E.; NOGALES, C. G.; SOUZA, N. J. A. A SEM evaluation of the different techniques effectiveness to remove ozonated oil from root canals. **Ozone Therapy Global Journal**, v.11, n.1, p.29-39, 2021.

NOITES, R.; PINA-VAZ, C.; ROCHA, R.; CARVALHO, M. F.; GONÇALVES, A.; PINA-VAZ, I. Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. **BioMed Research International**, p.16, 2014.

MOORER, W. R.; WESSELINK, P. R. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. **International Endodontic Journal**, v.15, n.4, p.187–196, 1982.

PETRIDIS, X.; BUSANELLO, F. H.; SO, M. V. R.; DIJKSTRA, R. J. B.; SHARMA, P. K.; VAN DER SLUIS, L. W. M. Factors affecting the chemical efficacy of 2% sodium hypochlorite against oral steady-state dual-species biofilms: Exposure time and volume application. **International Endodontic Journal**, v.52, n.8, p.1182–1195, 2019.

PÖNTINEN, A. K.; TOP, J.; ARREDONDO-ALONSO, S.; TONKIN-HILL, G.; FREITAS, A. R.; NOVAIS, C.; GLADSTONE, R. A.; PESONEN, M.; MENESES, R.; PESONEN, H.; LEES, J. A.; JAMROZY, D.; BENTLEY, S. D.; LANZA, V. F.; TORRES, C.; PEIXE, L.; COQUE, T. M.; PARKHILL, J.; SCHÜRCH, A. C.; WILLEMS, R. J. L.; CORANDER, J. Apparent nosocomial adaptation of Enterococcus faecalis predates the modern hospital era. **Nature Communications**, v.12, n.1, p.1523, 2021.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T.; ØRSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of Enterococcus faecalis to endodontic medicaments. **Journal of Endodontics**, v.31, n.5, p.380–386, 2005.

PRADO, M.; SANTOS JÚNIOR, H. M.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; FARIA, R. B.; SIMÃO, R. A.; GOMES, B. P. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. **Journal of Endodontics**, v.39, n.4, p.505–510, 2013.

- PRATYUSHA, M. V.; JAYALAKSHMI, K. B.; NADIG, P.; SUJATHA, I.; SELVAN, A.; ZAHARUNNISSA. Evaluation of antibacterial efficacy of ozonated olive oil and cold pressed neem oil against *Enterococcus faecalis*: An agar well diffusion study **International Journal of Current Research**, v.9, n.1, p.50711–50715, 2017.
- RAGAB, M.; SHARAAN, M. Influence of the Remnants of Silicone Oil on Penetration of Three Different Sealers into the Dentinal Tubules: A Confocal Laser Scanning Microscopy Study. **European Endodontic Journal**, v.7, n.3, p.234–240, 2022.
- RANGEL, K.; CABRAL, F. O.; LECHUGA, G. C.; CARVALHO, J. P. R. S.; VILLAS-BÔAS, M. H. S.; MIDDLEJ, V.; DE-SIMONE, S. G. Detrimental Effect of Ozone on Pathogenic Bacteria. **Microorganisms**, v.10, n.1, p.1-17, 2021.
- RICHARDS, M. J.; EDWARDS, J. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.21, n.8, p.510–515, 2000.
- ROSENTHAL, S.; SPÅNGBERG, L.; SAFAVI, K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.98, n.4, p.488–492, 2004.
- RUIZ-LINARES, M.; AGUADO-PÉREZ, B.; BACA, P.; ARIAS-MOLIZ, M. T.; FERRER-LUQUE, C. M. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. **International Endodontic Journal**, v.50, n.1, p.77–83, 2017.
- RUKSAKIET, K.; HANÁK, L.; FARKAS, N.; HEGYI, P.; SADAENG, W.; CZUMBEL, L. M.; SANG-NGOEN, T.; GARAMI, A.; MIKÓ, A.; VARGA, G.; LOHINAI, Z. 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, 2020.
- RUTHERFORD, S. T.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 11, p.1-25, 2012
- SATHORN, C.; PARASHOS, P.; MESSER, H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v.40, n.1, p.2–10, 2007.
- SÁNCHEZ, G. M. Ozonized water, background, general use in medicine and preclinic support. **Ozone Therapy Global Journal**, v.9, n.1, p.33-60, 2019.
- SCASSELLATI, C.; GALOFORO, A. C.; BONVICINI, C.; ESPOSITO, C.; RICEVUTI, G. Ozone: a natural bioactive molecule with antioxidant property as potential new strategy in aging and in neurodegenerative disorders. **Ageing Research Reviews**, v; 63, p.1-23, 2020
- SCOTT, M. B.; 2ND ZILINSKI, G. S.; KIRKPATRICK, T. C.; HIMEL, V. T.; SABEY, K. A.; LALLIER, T. E. The Effects of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla, Including Endocyn. **Journal of Endodontics**, v.44, n.2, p.263–268, 2018.

SEDGLEY, C.; NAGEL, A.; DAHLÉN, G.; REIT, C.; MOLANDER, A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Endodontics**, v.32, p.173–177, 2006.

SEGA, A.; ZANARDI, I.; CHIASSERINI, L. C.; GABBRIELLI, A.; BOCCI, V.; TRAGALI, V. Properties of sesame oil by detailed ¹H and ¹³C NMR assignments before and after ozonation and their correlation with iodine value, peroxide value, and viscosity measurements. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.163, n.2, p.148-156, 2010.

SHARMA, S.; MOHLER, J.; MAHAJAN, S. D.; SCHWARTZ, S. A.; BRUGGEMANN, L.; AALINKEEL, R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. **Microorganisms**, v.11, n.6, p.1-32, 2023.

SHETTY, N.; MATHEW, T.; SHETTY, A.; HEGDE, M. N.; ATTAVAR, S. Ozonated water as an irrigant in disinfecting root canal systems - a systematic review. **Evidence-based Dentistry**, 2022.

SIGMA- ALDRICH. Chlorhexidine digluconate solution - C9394, 1996. Disponível em <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/c9394>. Acesso em: 21 Jan. 2025.

SILVA, E. J. N. L.; PRADO, M. C.; SOARES, D. N.; HECKSHER, F.; MARTINS, J. N. R.; FIDALGO, T. K. S. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. **International Endodontic Journal**, v.53, n.3, p.317–332, 2020.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 11, 1291–1301, 2008.

SRIKANTH, A.; SATHISH, M.; SRI HARSHA, A. V. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v.5, n.1, p.89–94, 2013.

TAWAKOLI, P. N.; RAGNARSSON, K. T.; RECHENBERG, D. K.; MOHN, D.; ZEHNDER, M. Effect of endodontic irrigants on biofilm matrix polysaccharides. **International Endodontic Journal**, v.50, n.2, p.153–160, 2017.

TEJADA, S.; BACA, P.; FERRER-LUQUE, C. M.; RUIZ-LINARES, M.; VALDERRAMA, M. J.; ARIAS-MOLIZ, M. T. Influence of dentine debris and organic tissue on the properties of sodium hypochlorite solutions. *International endodontic journal*, v.52, n.1, p.114–122, 2019.

TONINI, R.; SALVADORI, M.; AUDINO, E.; SAURO, S.; GARO, M. L.; SALGARELLO, S. Irrigating Solutions and Activation Methods Used in Clinical Endodontics: A Systematic Review. **Frontiers in Oral Health**, v.3, p.1-13, 2022.

TUNCER, G.; AKTAS, Z.; BASARAN, S.; CAGATAY, A.; ERAKSOY, H. Effect of N-acetyl cysteine, rifampicin, and ozone on biofilm formation in pan-resistant *Klebsiella*

pneumoniae: an experimental study. **Sao Paulo medical journal - Revista paulista de medicina**, v.142, n.4, p.1-9, 2024.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Disinfection Profiling and Benchmarking: Technical Guidance, 2023. Disponível em https://www.epa.gov/system/files/documents/2022-02/disprof_bench_3rules_final_508.pdf. Acesso em: 25 Jan. 2025.

VAN DER SLUIS, L. W.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. The evaluation of removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove in the apical root canal using different irrigation methodologies. **International Endodontic Journal**, v.40, n.1, p.52–57, 2007.

VAN DER SLUIS, L. W.; VERSLUIS, M.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. **International Endodontic Journal**, v.40, n.6, p.415–426, 2007.

VENERI, F.; LANTERI, V.; CONSOLO, U.; CHECCHI, V.; GENERALI, L. Ozone in Dentistry: An Updated Overview of Current Applications and Future Perspectives. **Current Oral Health Reports**, v.12, n.3, p.1-13, 2025.

VIANNA, M. E.; GOMES, B. P.; BERBER, V. B.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; DE SOUZA-FILHO, F. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v.97, n.1, p.79–84, 2004.

VIEBAHN-HAENSLER, R.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S. Ozone in Medicine. The Low-Dose Ozone Concept and Its Basic Biochemical Mechanisms of Action in Chronic Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 1-15, 2021.

VOUZARA, T.; KOULAOUZIDOU, E.; ZIOUTI, F.; ECONOMIDES, N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. **International Endodontic Journal**, v.49, n.8, p.764–773, 2016.

WAGNER, M. H.; DA ROSA, R. A.; DE FIGUEIREDO, J. A. P.; DUARTE, M. A. H.; PEREIRA, J. R.; SÓ, M. V. R. Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. **Clinical oral Investigations**, v.21, n.7, p.2173–2182, 2017.

WU, M. K.; DUMMER, P. M.; WESSELINK, P. R. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. **International Endodontic Journal**, v.39, n.5, p.343-356, 2006.

WU, Y.; KLAPPER, I.; STEWART, P. S. Hypoxia arising from concerted oxygen consumption by neutrophils and microorganisms in biofilms. **Pathogens and Disease**, v.76, n.4, p. 1-10, 2018.

YANG, S.; MENG, X.; ZHEN, Y.; BAIMA, Q.; WANG, Y.; JIANG, X.; XU, Z. Strategies and mechanisms targeting *Enterococcus faecalis* biofilms associated with endodontic

infections: a comprehensive review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.14, p. 1-15, 2024.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v.32, n.5, p.389–398, 2006.

ZHANG, Y.; WANG, X.; LI, H.; NI, C.; DU, Z.; YAN, F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomedicine & pharmacotherapy - Biomedecine & Pharmacotherapie**, v.99, p.883–893, 2018.

ZHANG, C.; YANG, Z.; HOU, B. Diverse bacterial profile in extraradicular biofilms and periradicular lesions associated with persistent apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v.54, n.9, p.1425–1433. 2021.