

Catharine B. Mendes da Silva

Isabele Cristina R. de Souza

Sidnei M. dos Santos Junior

**Efeito do uso da água ozonizada na desinfecção do sistema de canais
radiculares**

Rio de Janeiro, Rj

2022

Catharine B. Mendes da Silva

Isabele Cristina R. de Souza

Sidnei M. dos Santos Junior

**Efeito do uso da água ozonizada na desinfecção do sistema de canais
radiculares**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade do Grande Rio “Professor
José de Souza Herdy”, como parte dos
requisitos parciais para obtenção do grau de
bacharel em Odontologia.**

Orientador: Emmanuel João N. Leal da Silva

Rio de Janeiro, Rj

2022

Catharine B. Mendes da Silva

Isabele Cristina R. de Souza

Sidnei M. dos Santos Junior

Efeito do uso da água ozonizada na desinfecção do sistema de canais radiculares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Grande Rio “Professor José de Souza Herdy”, como parte dos requisitos parciais para obtenção do grau de bacharel em Odontologia.

Aprovado em 14 de Junho de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva

Universidade do Grande Rio



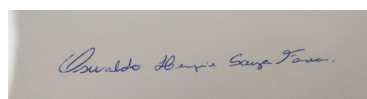
Prof. Katiana Accioly Lins Vidal

Universidade do Grande Rio



Prof. Oswaldo Henrique Fonseca

Universidade do Grande Rio



RESUMO

No tratamento endodôntico, o preparo químico mecânico é primordial na desinfecção do sistema de canais radiculares. É natural que com o decorrer do tempo novas pesquisas sejam feitas a fim de aprimorar as técnicas que hoje já são empregadas, visando obter uma substância irrigadora ideal, que não gere danos aos tecidos periapicais e que possua um alto potencial antimicrobiano. Nesse cenário, a água ozonizada surge como uma opção a ser estudada. O presente estudo teve como objetivo comparar a eficácia da redução microbiana intracanal quando utilizada a água ozonizada em relação ao hipoclorito de sódio. Quarenta dentes bovinos uniradiculares foram selecionados e seccionados com discos diamantados (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) de forma a padronizar o comprimento de suas raízes. Posteriormente, os dentes foram instrumentados com limas do tipo K nº 50, 55, 60 e 70, e, foram contaminados com *Enterococcus Faecalis* por 21 dias. Após este período, uma primeira amostra foi coletada e plaqueada em placas ágar Mitis salivarius (Difco, Maryland, EUA). Os dentes então, foram irrigados com água ozonizada, hipoclorito de sódio e soro fisiológico, tendo por padrão uma irrigação constante de 20 ml durante um período de vinte minutos com um descanso de cinco minutos, seguido novamente dos procedimentos de coleta das amostras, os dados foram submetidos à análise estatística. Como resultado pode-se observar uma redução significativa na contagem microbiana em todos os grupos comparando entre as amostras antes e depois da irrigação, contudo o grupo NaOCl se destacou sobre os irrigados com água ozonizada e soro fisiológico, apresentando um percentual maior de redução microbiana, ausência de diferença significativa foram apontadas entre os grupos ozônio e soro. Como conclusão, a água ozonizada não se demonstrou um substituto viável para o NaOCl exigindo futuras pesquisas para comprovar sua eficiência contra *Enterococcus Faecalis*.

ABSTRACT

In endodontic treatment, the chemomechanical canal preparation is essential in the disinfection of the root canal system. It is natural that, over time, new research will be carried out in order to improve the techniques that are already used, aiming to obtain an ideal irrigating substance, which does not cause damage to the periapical tissues and which has a high antimicrobial potential. In this scenario, ozonated water appears as an option to be studied. The present study aimed to compare the effectiveness of intracanal microbial reduction when using ozonated water in relation to sodium hypochlorite. Forty single-rooted bovine teeth were selected and sectioned with diamond discs (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) in order to standardize the length of their roots. Subsequently, the teeth were instrumented with K-files nº 50, 55, 60 and 70, and were contaminated with *Enterococcus Faecalis* for 21 days. After this period, a first sample was collected and plated on Mitis salivarius agar plates (Difco, Maryland, USA). The teeth were then irrigated with ozonated water, sodium hypochlorite and saline solution, with a standard constant irrigation of 20 ml for a period of twenty minutes with a five-minute rest, followed by the sample collection procedures, the data were subjected to statistical analysis. As a result, a significant reduction in microbial counts can be observed in all groups comparing the samples before and after irrigation, however the NaOCl group stood out over those irrigated with ozonated water and saline, showing a higher percentage of microbial reduction, no significant differences were noted between the ozone and serum groups. In conclusion, ozonated water did not prove to be a viable substitute for NaOCl requiring further research to prove its efficiency against *Enterococcus Faecalis*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	6
2	JUSTIFICATIVA.....	7
3	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	7
4	RESULTADOS.....	10
5	DISCUSSÃO.....	11
6	CONCLUSÃO.....	12
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

1 INTRODUÇÃO

A permanência de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares (SCR) pode levar à persistência de lesões periapicais e consequentemente ao insucesso do tratamento endodôntico ⁽¹⁾. Sua eliminação se dá por meio da ação mecânica dos instrumentos junto às paredes internas do canal radicular e ao fluxo e refluxo das soluções irrigadoras. O uso de irrigantes no tratamento endodôntico é uma etapa muito importante, já que os instrumentos usados durante a fase de preparo endodôntico só atingem cerca de 50% a 75% das paredes do canal ⁽²⁾.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução mais utilizada no tratamento endodôntico. Embora não haja irrigante que possua todas as características desejadas, o NaOCl possui função antimicrobiana, poucos relatos de reações alérgicas e tem a função única de dissolver tecidos orgânicos ⁽³⁾. Apesar de apresentar características desejáveis para um irrigante, o NaOCl possui alta toxicidade e seu efeito tóxico aos tecidos está diretamente relacionado com sua concentração ⁽⁴⁾. A injeção acidental de NaOCl pode causar sérias consequências nos tecidos periapicais incluindo dor aguda, edema, necrose, parestesia e até reações alérgicas graves ⁽⁴⁾.

Em busca de novos irrigantes para tratamento do SCR que não possuam tal toxicidade, tem crescido o número de estudos e pesquisas sobre a ozonioterapia. Embora não seja um conceito novo e já seja usado há muitas décadas, foi relatado que a primeira aplicação médica do uso do ozônio para tratamento de gangrena gasosa, pós-traumático em soldados alemães durante a 1ª Guerra Mundial ⁽⁵⁾. Em 1880 a ozonioterapia foi aceita nos Estados Unidos e tem sido usada há mais de 130 anos em cerca de 20 países ⁽⁶⁾.

Quando o ozônio entra em contato com bactérias in vitro, os fosfolipídios e as lipoproteínas presentes na membrana celular da bactéria sofrem oxidação. Esse mecanismo de oxidação rompe a integridade da membrana celular e o ozônio consegue penetrar no interior dos microrganismos oxidando glicoproteínas e glicolipídios bloqueando a função enzimática da bactéria ⁽⁷⁾.

Na endodontia a água ozonizada apresentou eficácia antimicrobiana significativa como irrigante na redução de *E Faecalis*, *Streptococcus Mutans*, *Peptostreptococcus Micros*, *Pseudomonas aeruginosa* de canais radiculares infectados, principalmente quando realizada com auxílio de agitação ultrassônica. A água ozonizada em concentração de até 5 µg/ml foi eficaz contra microrganismos na forma planctônica. Quando organizados na forma de biofilme, a eliminação foi quase completa com o uso de concentração mais elevada, como 20 µg/ml ⁽⁵⁾. Considerando o fato de a água ozonizada apresentar potencial bactericida, este estudo foi realizado objetivando comparar a desinfecção do sistema de canais radiculares após o uso da água ozonizada, NaOCl e soro fisiológico como soluções irrigadoras.

2 JUSTIFICATIVA

A solução de hipoclorito de sódio é o irrigante mais utilizado no preparo do sistema de canais radiculares. Entretanto, sabemos que nenhum irrigante usado até hoje é capaz de eliminar totalmente os microrganismos presentes no SCR. Além disso, outro ponto importante e que merece nossa atenção é o caráter de toxicidade do hipoclorito de sódio quando extravasado além do ápice(s) radicular(es). Sendo assim, nosso trabalho será desenvolvido a fim de comparar a redução microbiana do SCR quando realizada a irrigação com água ozonizada e NaOCl.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Seleção e padronização dos espécimes

Para esse estudo in vitro foram selecionados 40 dentes bovinos uniradiculares, sem alterações patológicas evidentes. Os elementos foram armazenados por um período de 6 meses em solução salina mantendo-os hidratados.

As coroas foram seccionadas com discos diamantados (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brasil) padronizando todas as raízes em 16mm de comprimento. Os 40 dentes foram instrumentados utilizando limas do tipo K nº 50, 55, 60 e 70 de 25mm

(Dentsply Sirona). A cada troca de instrumento os dentes receberam irrigação com 2ml de água para remoção de detritos.

Para esterilização dos elementos, os mesmos tiveram seus ápices cobertos com top dam (FGM, Joinville, Brasil), e posteriormente foram selados com esmalte de unha incolor por todo seu exterior e introduzidos, individualmente, em tubos de polipropileno contendo água destilada e levados à autoclave a 121°C por 40 min. Para verificar a eficácia da esterilização, cada espécime no grupo de controle negativo recebeu irrigação com 1mL de solução salina estéril e uma amostra foi retirada sequencialmente introduzindo três pontas de papel estéreis de tamanho 15 nos canais radiculares. As amostras foram plaqueadas em placas de ágar Mitis salivarius (Difco, Maryland, EUA) e incubadas a 37°C durante 48 horas. Após este processo, cada dente foi colocado sob pressão em uma rolha de borracha estéril (com orifício no meio), na porção cervical da raiz para que os elementos ficassem verticalizados e acima da estante para microtubos, nos quais foram mantidos por 21 dias. Todos os procedimentos com as amostras após esterilização foram realizados dentro de um fluxo laminar (Grupo Veco, Campinas, SP, Brasil)

Contaminação dos espécimes

A contaminação dos espécimes foi feita de acordo com estudo prévio ⁽⁸⁾. Uma cultura pura de *E. faecalis* (ATCC 29212) foi cultivada para contaminar os canais radiculares. A suspensão celular foi ajustada para $\pm 1,0$ McFarland padrão, para assegurar que o número de bactérias fosse de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC ml). Pipetas estéreis foram utilizadas, sob fluxo laminar, para inocular cada espécime com 100µL da suspensão bacteriana. Uma lima estéril tipo Kerr 15 foi utilizada para espalhar a suspensão bacteriana ao longo de todo o comprimento do canal radicular. As amostras estiveram mantidas a 37°C por 21 dias e a cada 2 dias, 100µL de BHI (Brain Heart Infusion) recentemente preparado, será adicionado às amostras, para manutenção do biofilme.

Após o período de contaminação, o canal de cada espécime foi irrigado com 1mL de solução salina estéril e a primeira amostra bacteriana (S1) foi obtida introduzindo sequencialmente três pontas de papel estéril (Dentsply Sirona) no

canal e mantendo-as por 1 min. As amostras coletadas foram transferidas individualmente para tubos Eppendorf de 1,5 mL contendo 1mL de solução salina estéril. As contagens de UFC serão realizadas conforme descrito ⁽⁸⁾ na quantificação da carga bacteriana.

Irrigação dos espécimes

Os elementos foram separados em 5 grupos de acordo com a solução irrigadora utilizada (n=8 por grupo):

- Grupo controle positivo: Neste grupo os elementos não receberam irrigação com nenhum tipo de substância.
- Grupo controle negativo: os elementos deste grupo não foram contaminados com *E. faecalis*.
- Grupo soro: a irrigação foi feita utilizando uma seringa estéril de 20ml contendo 20ml de soro fisiológico estéril por um período de 20 minutos, com repouso de 5 minutos da solução e irrigação com mais 4 ml de salina estéril.
- Grupo NaOCl: com uma seringa estéril de 20ml, contendo 20 mL de NaOCl 2,5 % por um período de 20 minutos ininterruptos. Após esse tempo a solução de NaOCl ficou em repouso por 5 minutos e depois a irrigação com 1 ml de soro fisiológico estéril foi realizada. Foi feita a irrigação com 2 ml de tiosulfato de sódio por um período de 4 minutos ininterruptos, seguido de um repouso de 1 minuto dando sequência a irrigação com mais 1 ml de salina estéril.
- Grupo água ozonizada: a água ozonizada foi obtida através do Gerador de Ozônio Philozon Medplus usando como base água bidestilada e seguindo as instruções do fabricante, foram utilizados 40 µg/ml de concentração do Ozônio para cada 250 ml de água bidestilada, obtendo-se a concentração de 8 ppm de ozônio na água bidestilada ⁽⁹⁾. A irrigação foi realizada com 20 ml da solução, por um período de 20 minutos ininterruptos, ficando em repouso por 5 minutos. Após esse período, o canal foi irrigado com 4 ml de soro estéril.

Análise microbiológica

Após cada grupo receber os seus protocolos de irrigação, foram realizados movimentos de scraping nas paredes do canal com uma lima hedstroem. e as amostras foram coletadas usando cones de papel absorvente, em um total de 3 cones por espécime. Os cones foram introduzidos individualmente e foi aguardado um período de 1 minuto cada um. Os cones de papel foram introduzidos em um tubo do tipo eppendorf contendo 1ml de solução salina estéril.

Os tubos Eppendorf contendo as amostras coletadas foram agitados em vórtex por 1 minuto e uma diluição de solução salina estéril até 10^{-10} foi preparada por diluição seriada. Um volume de 10 μ l de cada diluição foi inoculado em placas de ágar Mitis salivarius (Difco, Maryland, EUA), incubados a 37 °C por 48h, e depois submetidos a contagem bacteriana

Análise estatística

A análise foi realizada através do software estatístico BIOSTAT. Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste Shapiro Wilk, analisados intragrupo pelo teste de Wilcoxon e intergrupo pelos testes Kruskal-Wallis seguido de Dunn e Wilcoxon (signed-rank test). O nível de significância estatística foi estabelecido em 5%.

4 RESULTADOS

A esterilidade dos espécimes no controle negativo foi confirmada com a manutenção da cadeia asséptica durante todo o experimento, enquanto o crescimento microbiano dos espécimes do controle positivo confirmou a viabilidade das bactérias durante todo o processo experimental.

O método de cultura indicou presença bacteriana em 100% dos espécimes na primeira coleta de amostra (S1). Após a irrigação, a segunda coleta (S2) resultou em uma redução significativa na contagem microbiana em todos os grupos em comparação com a primeira amostra (S1) ($P < 0,05$).

A análise dos resultados da contagem microbiana intergrupos revelou que em S1 a carga bacteriana foi semelhante ($P>0,05$). Em S2, ocorreu diferença significativa entre os grupos NaOCl e ozônio e entre os grupos NaOCl e soro ($P<0,05$), com o grupo NaOCl tendo contagens microbianas menores do que os outros dois, sem diferenças entre os grupos ozônio e soro ($P>0,05$).

Já os resultados referentes ao percentual de redução microbiana entre os grupos mostraram diferença significativa entre os grupos NaOCl e ozônio e entre os grupos NaOCl e soro ($P<0,05$), com o grupo NaOCl uma porcentagem maior de redução microbiana do que os outros dois, sem diferenças entre os grupos ozônio e soro ($P>0,05$).

5 DISCUSSÃO

A desinfecção do SCR é o principal objetivo do tratamento endodôntico, mas até hoje não foi encontrada nenhuma substância que seja capaz de promover a esterilização dos canais radiculares, como observado no estudo de Estrela et al. ⁽¹⁰⁾ Por esse motivo novas tecnologias vêm sendo propostas e estudadas.

Apesar de estudos comprovarem a eficácia da água ozonizada como agente antimicrobiano ^(11,12,13,14), no presente trabalho não foram observados resultados satisfatórios quando este foi comparado ao NaOCl. Os resultados do presente estudo se assemelham aos achados de Hubbezoglu et al ⁽¹⁵⁾, no qual a água ozonizada testada em concentração de 8 ppm de ozônio diluído em água destilada não demonstrou eficácia contra *Enterococcus Faecalis* quando comparado com NaOCl.

Outro estudo, realizado por Nagayoshi et al ⁽¹⁶⁾, comparou a eficácia da irrigação com água ozonizada e NaOCl em dentes bovinos e sua ação contra bactérias do grupo *S. Mutans* que invadiram os túbulos dentinários. Apesar da água ozonizada ter se mostrado efetiva, principalmente quando associada com agitação pelo uso de ultrassom, os resultados obtidos com a irrigação feita com NaOCl a 2,5% se mostrou mais eficaz do que a água ozonizada, sendo equiparável com os resultados encontrados no presente trabalho.

Já no trabalho executado por Goztas et al ⁽¹⁴⁾, os resultados demonstraram que a água ozonizada se mostrou igualmente eficaz quando comparada ao NaOCl nas análises realizadas nos intervalos de 0 e 6h. O resultado diferente pode ser explicado por ter sido realizado com dentes humanos e incubação de *E. Faecalis* por um período de apenas 24 horas.

No estudo de Cardoso et al ⁽¹¹⁾, foram notadas diferenças em comparação com esse trabalho. Nesse estudo foram analisados diferentes períodos de espargimento da água ozonizada e foi observado que quando espargida por apenas 5 minutos houve crescimento de *E. Faecalis* em UFC/mL, o que não foi observado quando espargida por 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Diante dessa análise foram selecionados 23 dentes humanos que foram contaminados com *Enterococcus Faecalis* e *Candida Albicans*, posteriormente os elementos receberam irrigação com água ozonizada. Os autores selecionaram a água ozonizada espargida por 20 minutos para realizar a irrigação dos elementos, na qual se mostrou altamente eficaz na redução de UFC. ⁽¹¹⁾

De acordo com Paixão et al ⁽⁶⁾, mesmo que o ozônio esteja sendo utilizado em diversas áreas da odontologia, o mesmo não deve substituir as substâncias irrigadoras convencionalmente utilizadas no tratamento do SCR, devendo ser utilizada como um incremento a técnica tradicional de irrigação, pois é capaz de melhorar a oxigenação dos tecidos, reduzir a carga microbiológica e inflamatória. No entanto, ainda é necessário que sejam realizados mais estudos dentro desse tema de forma que esse resultado possa ser confirmado. Futuros estudos devem focar no uso de dentes humanos, avaliar também diferentes tempos de espargimento da água ozonizada e também associar o uso de ultrassom para a agitação das moléculas de ozônio. ^(11,15,16) Por fim, além da água existem outros meios de utilizar o ozônio, como o gás e o óleo que merecem ser avaliados e testados.

6 CONCLUSÃO

Com as limitações do presente estudo desenvolvido e de acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a água ozonizada não se mostrou uma

substância viável para ser usada de forma isolada na irrigação do SCR, não sendo uma opção interessante em substituição ao NaOCl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Nakamura VC, Cai S, Candeiro GTM, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int. Endod. J.* 2012 jan; 46; 217-224.
- 2- Mohammadi O Z, Shalavi S, Moeintaghavi A, Jafarzadeh H. A review over benefits and drawbacks of combining sodium hypochlorite with other endodontic materials. *Open Dent. J.* 2017; 11; 661-669.
- 3- Graça BP. O HIPOCLORITO DE SÓDIO EM ENDODONTIA. [dissertação]. Porto: UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE; 2014.
- 4- Da Silva JPM, Boijink D. Acidente com hipoclorito de sódio durante tratamento endodôntico: análise de prontuário. *Rev Odontol Arac.* 2019 jan/abril; 1; 25-28.
- 5- Gomes, BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho SJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19; 71-76.
- 6 - Paixão LD, Dietrich L, Martins LHB, Barros DV. Terapias alternativas na endodontia- ozonioterapia: Revisão de literatura. *Res., Soc. Dev;* 10; maio 2021; 1-8.
- 7 - Monzillo V, Lallitto F, Russo A, Poggio C, Scribante A, Arciola CR, Bertuccio FR, Colombo M. Ozonized gel against four *Candida* species: A pilot study and clinical perspectives. *Materials.* 2020; 13; 1-7
8. Gerard D, Sunnen MD. Ozone in Medicine: Overview and Future Directions. *Journal of Advancement in Medicine, Nova Iorque,* v.1, n.3, p. 159-174, 1988

9. PHILOZON. Instruções de Uso Gerador de Ozônio Philozon Medplus – MAN 001 – Rev. 05, Balneário Camboriú, SC.

10. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Holanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Internacional Endodontic Journal*. 2007; 85-93.

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

12. Pinheiro SL, da Silva CC, da Silva LA, Cicotti MP, Bueno CE da S, Fontana CE, et al. Antimicrobial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, and ozonated water as irrigants in mesiobuccal root canals with severe curvature of mandibular molars. *Eur J Dent*. (2018); 12(1), 94–99.

13. Hems, R. S., Gulabivala, K., -L. Ng, Y., Ready, D., & Spratt, D. A. (2005). An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 38, 22–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00891.x>.

14. Goztas Z, Onat H, Tosun G, Sener Y, Hadimli H. Antimicrobial effect of ozonated water, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in primary molar root canals. *European Journal of Dentistry*, vol 8 / issue 4. 2014; 469-474.

15. Hubbezoglu, I, Zan R, Tunc T, Sumer Z. Antibacterial efficacy of aqueous ozone in root canals infected by *Enterococcus Faecalis*. *Jundishapur J Microbiol*. 2014; 1-5.

16. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of endodontics*, vol 30. 2004; 778-781.

17- Hauser-Gerspach, I, Pfäffli-Savtchenko V, Dähnhardt JE, Meyer J, Lussi A. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. Clin Oral Invest. 2008 nov; 13; 287–291.

18- Hargreaves KM, Berman LHC, Rotstein I. Caminhos da polpa. 11nd ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2017;

19- Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002; 113-117.

20 - Nôleto IMS, Lia RCC, Neto CB, Oliveira MRB. Potencial irritativo de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio empregados na irrigação de canais radiculares. Estudo histomorfológico comparativo de dentes de cães. Rev. Odontol. 1992; 21; 119-131.

21- Martins IVR. Aplicação do Ozônio na Terapêutica do Sistema de Canais Radiculares: Revisão de Literatura [trabalho de conclusão de curso]. Brasília: UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA; 2018.

22- Barbosa AFA. The influence of endodontic access cavity design on the efficacy of canal instrumentation, microbial reduction, root canal filling and fracture resistance in mandibular molars. International Endodontic Journal. 2020; 53; 1666– 1679.

23- Loscertales H, Donato M, Cuadra D, Schwartz A, Lamas M. Ozonoterapia salud y vida. Rev. 2014; 1-32.

24. Cakir R, General Aspects of Ozone Therapy In: Atroshi F. Pharmacology and Nutritional Intervention in the Treatment of Disease. Londres: IntechOpen; 2014. Pagina 159-177