

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Departamento de Odontologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação do potencial antimicrobiano da solução aquosa do digluconato de clorexidina 2% com e sem a associação com ozônio contra cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudo *in vitro*.

Patrícia Silva Oliveira

Brasília, 08 de junho de 2023

Patrícia Silva Oliveira

Avaliação do potencial antimicrobiano da solução aquosa de digluconato de clorexidina 2% com e sem a associação com ozônio contra cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudo *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Bruzadelli Macedo

Brasília, 2023

Patrícia Silva Oliveira

Avaliação do potencial antimicrobiano da solução aquosa de digluconato de clorexidina 2% com e sem a associação com ozônio contra cepas de *Enterococcus faecalis*. Estudo *in vitro*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 30 de junho de 2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira (Orientador)

Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles (Membro Titular)

Prof. Dr. Jacy Ribeiro de Carvalho Junior (Membro Titular)

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende (Suplente)

Aos meus pais, por todo amor, dedicação e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, me dando forças e me ajudando a ultrapassar os obstáculos ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, Izaura e Paulo, que sempre me incentivaram a estudar e me ensinaram a importância da educação. Obrigada por todo carinho, esforço e renúncia, para que eu e Paloma tivéssemos mais oportunidades. Serei eternamente grata à minha mãe, que sempre esteve ao meu lado, me amparando, confortando e motivando nos momentos mais difíceis, comemorando cada pequena conquista e me colocando nas suas orações.

À minha irmã, Paloma, obrigada pelo companheirismo, por sempre me ajudar em tudo e vibrar em todas minhas conquistas. Estou aqui para o que precisar.

Ao meu namorado, Diego, por todo amor, companheirismo, paciência e incentivo. Obrigada por acreditar em mim, mais que eu mesma. Você é minha inspiração! Obrigada por sempre me apoiar, ser meu porto seguro e fazer o melhor por nós.

À minha amiga de longa data, Rhaylanna, que sempre esteve ao meu lado, pela amizade incondicional, pelo apoio e todos os conselhos. Obrigada pelas palavras motivacionais, puxões de orelha, risadas e por sempre estar presente quando eu preciso. Minha eterna gratidão!

À minha duplinha, Bruna Bastos, que sempre me ajudou com sua vasta experiência desde o início deste projeto de pesquisa, pelo carinho, amizade e paciência ao longo do curso, por todos os momentos, pelas risadas e pela troca de experiência. Muito obrigada por tudo, você foi a melhor dupla que eu poderia ter, conte comigo sempre.

A todos meus amigos da turma 76, com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer. Em especial à Aninha, Luana, Gabi, Bru Dias, Vitinho e Lari, com vocês essa caminhada foi mais leve.

Agradeço a todos, minha família, parentes e amigos que com seu incentivo me fizeram chegar à conclusão do meu curso e começo de uma nova carreira. Em especial, às minhas tias Vanda, meu exemplo de superação, e Elaine que me ampararam quando cheguei em Brasília e sempre foram meu apoio, obrigada por acreditarem em mim. Agradeço também, minha sogrinha, Conceição, pelo cuidado e carinho.

Sou grata pela confiança depositada na minha proposta de projeto pelo meu professor Laudimar, orientador do meu trabalho. Obrigada por me conduzir durante todo o processo de uma forma tão leve.

Gostaria de agradecer também à Universidade de Brasília, aos professores e funcionários pelos recursos e ferramentas que me fizeram evoluir um pouco mais todos os dias. Obrigada ao ProIC UnB e CNPq pela oportunidade e incentivo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigada.

” Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

Objetivo: A presente pesquisa tem como objetivo analisar o uso do digluconato de clorexidina 2% isoladamente e em associação ao ozônio como substância auxiliar na irrigação do sistema de canais de dentes bovinos, contra cepas de *Enterococcus faecalis*. **Métodos:** Foram utilizadas 47 raízes de incisivos bovinos, contaminadas com cepas de *Enterococcus faecalis* e divididas em 6 grupos, irrigadas com substâncias distintas, sendo elas: digluconato de clorexidina 2% em associação com gás ozônio, clorexidina 2% mono ozonizada, digluconato de clorexidina 2% bi ozonizada, água bidestilada ozonizada, digluconato de clorexidina 2% (controle positivo) e soro fisiológico (controle negativo). Após 48 horas de irrigação dos canais, a carga microbiana remanescente foi analisada em espectrofotômetro de massa. **Resultados:** A água ozonizada se aproximou do controle negativo. O digluconato de clorexidina 2% mono e bi ozonizado apresentaram resultados próximos entre si e ambos evidenciaram potencial antimicrobiano inferior à clorexidina 2% isoladamente. A clorexidina associada ao gás ozônio expressou resultado similar ao controle positivo. **Conclusões:** No presente estudo, o potencial antimicrobiano da água ozonizada mostrou-se baixo ou nulo. A clorexidina 2% mono e bi ozonizada tiveram resultados inferiores à irrigação usando apenas a clorexidina, assim deduz-se que o ozônio contribuiu negativamente na solução. Por fim, a irrigação com clorexidina associada ao gás ozônio apresentou efeito similar ao controle positivo, revelando que não houve sinergismo antibacteriano das soluções associadas.

PALAVRAS-CHAVE: Clorexidina, Ozônio, Irrigantes do Canal Radicular, *Enterococcus faecalis*, Espectrofotometria.

ABSTRACT

Objective: This research aims to analyze the use of 2% chlorhexidine digluconate isolated and in association with ozone as an auxiliary substance in the irrigation of the root canal system of bovine teeth, against *Enterococcus faecalis* strains. **Methods:** Forty-seven roots of bovine incisors were used, contaminated with *Enterococcus faecalis* strains, and divided into 6 groups, irrigated with different substances, namely: 2% chlorhexidine digluconate in association with ozone gas, 2% mono-ozonized chlorhexidine, chlorhexidine digluconate 2% bi-ozonized solution, ozonated bidistilled water, 2% chlorhexidine digluconate (positive control) and saline solution (negative control). After 48 hours of canal irrigation, the remaining microbial load was analyzed in a mass spectrophotometer. **Results:** The ozonized water approached the negative control. Chlorhexidine digluconate 2% mono and bi-ozonized showed results close to each other, and both showed lower antimicrobial potential than chlorhexidine 2% alone. Chlorhexidine associated with ozone gas showed results like the positive control. **Conclusion:** In the present study, the antimicrobial potential of ozonized water was low or null. Chlorhexidine 2% mono and bi-ozonated had inferior results to irrigation using only chlorhexidine, so it can be deduced that ozone contributed negatively to the solution. Finally, irrigation with chlorhexidine associated with ozone gas had a similar effect to the positive control, revealing that there was no antibacterial synergism of the associated solutions.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Incisivos bovinos.....	17
Figura 2 – Raízes seccionadas e instrumentadas.....	17
Figura 3 – Raiz em eppendorf, contaminadas com <i>E. faecalis</i>	18
Figura 4 – Microscopia de varredura de Bactéria Gram + compatível com <i>E. faecalis</i> . Coloração de Gram. Aumento 40 vezes.....	19
Figura 5 – Identificação dos 6 grupos distintos.....	20
Figura 6 – Tubo contendo 3mL de caldo BHI e cone de papel que foi imergido nas raízes após a irrigação	22
Figura 7 – À direita o espectrofotômetro (UV-M51 [®] - <i>BEL Photonics</i>) e à esquerda cubetas de vidro contendo amostras diferentes a serem analisadas.	23
Figura 8 – Gráfico comparativo entre as medianas das amostras	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão de absorbância.....	20
Tabela 2 – Escala nefelométrica de <i>McFarland</i> para análise de quantidade de microrganismos em meio líquido.....	21
Tabela 3 – Teste de <i>Kruskal-Wallis</i>	23
Tabela 4 – Método <i>Dwass-Steel-Critchlow-Fligner</i>	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
COM	Clorexidina mono ozonizada
COB	Clorexidina bi ozonizada
AO	Água ozonizada
CI	Clorexidina pura
C + O	Clorexidina + gás ozônio
CP	Controle positivo (clorexidina 2%)
CN	Controle negativo (soro)
NaOCl	Hipoclorito de sódio
ATCC	American Type Culture Collection

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS	16
	2.1 PREPARAÇÃO DOS DENTES BOVINOS	16
	2.2 CONTAMINAÇÃO COM <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	17
	2.3 DESCONTAMINAÇÃO DAS RAÍZES COM SOLUÇÕES AUXILIARES.....	19
3	RESULTADOS	23
4	DISCUSSÃO	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	CONFLITOS DE INTERESSE	29
	FINANCIAMENTO	29
	REFERÊNCIAS	29
	ANEXOS	33
	NORMAS DA REVISTA	33

INTRODUÇÃO

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

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é considerada a solução de eleição devido às suas propriedades, como: potente ação antimicrobiana, dissolução de material orgânico e baixo custo. Porém, quando em contato com os tecidos periapicais, pele e mucosa o NaOCl causa significativo potencial irritativo [3,6,19,29]. Assim, faz-se necessário o estudo de outras substâncias com efetiva ação antimicrobiana, mas que oportunizem maior tolerância tecidual [4].

Embora o hipoclorito de sódio figure como substância principal para irrigação do sistema de canais na terapia endodôntica, verifica-se em diversos casos, seu elevado potencial de irritabilidade tecidual [6,19,29]. Com isso, em diversos casos o risco de extravasamento da substância para os tecidos periapicais contraindica sua escolha [3]. Assim, faz-se necessário pesquisas por substâncias alternativas que reduzam seu potencial de irritação tecidual ao tempo que mantenham sua capacidade de redução da carga microbiana existente [3,25].

O digluconato de clorexidina geralmente é usado no sistema de canais quando o paciente é reconhecidamente alérgico ao NaOCl ou quando o procedimento tem grande possibilidade de extravasamento apical. Essa substância associa sua atividade antibacteriana de amplo espectro com baixa irritabilidade aos tecidos e possui substantividade - efeito antimicrobiano residual [3]. Entretanto, a clorexidina não consegue dissolver os tecidos orgânicos [6,19,29]. Visando ampliar seu perfil antimicrobiano verifica-se na literatura a associação na limpeza de canais com ozônio.

Devido às suas características biológicas, o ozônio pode elevar o efeito antibacteriano, além de possuir baixa toxicidade para os tecidos periapicais em sua apresentação aquosa e gasosa, visto que seu potencial citotóxico se apresentou igual ou inferior quando comparado com irrigantes já utilizados na endodontia, como o digluconato de clorexidina 2% e o hipoclorito de sódio 5,25%, 2,25% [12,25]. A ação combinada de clorexidina

2% e 24 segundos de ozônio podem ser vantajosas, tendo em vista que elas atuam de modo distinto, o que provocaria sinergismo da ação antimicrobiana [17].

Várias substâncias têm sido propostas no contexto de reduzir o potencial de irritação tecidual ao tempo que mantêm a capacidade de redução da carga microbiana existente, com destaque para o digluconato de clorexidina, nas suas formas gel e aquosa, ambas com concentração de 2% [3,27]. Outra substância que vem apresentando destaque é o ozônio [25]. Tanto nas suas formas aquosa e oleosa quanto na apresentação gasosa, o ozônio vem oferecendo potencial antimicrobiano de interesse para a endodontia [27].

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

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no laboratório de endodontia, biomateriais e microbiologia oral do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde/UnB. Os dentes bovinos utilizados foram obtidos de frigoríficos cujo abate se deu em decorrência de atendimento para indústria alimentícia, não guardando relação direta com a presente pesquisa, portanto, sem implicação ética.

1.1 PREPARAÇÃO DOS DENTES BOVINOS

Foram extraídos dentes de mandíbulas bovinas. Foram excluídos dentes que apresentaram fraturas ou aspectos de anormalidades e por fim, selecionados 47 incisivos bovinos. Esses dentes foram mergulhados em uma solução com hipoclorito de sódio 2% por cerca de 1 hora e lavados em água corrente por um período de 24 horas. Com auxílio de curetas Gracey, foram removidos restos de tecidos moles nas superfícies das raízes (Figura 1).



Figura 1 – Incisivos bovinos

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



Figura 2 – Raízes deccionadas e instrumentadas.

2.2 CONTAMINAÇÃO COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

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

Após a aplicação do inóculo, os canais foram preenchidos a cada 3 dias com meio BHI líquido estéril para possibilitar a nutrição das cepas bacterianas e colocadas por 21 dias em estufa de crescimento a 37°C com umidade 100% (Figura 3).

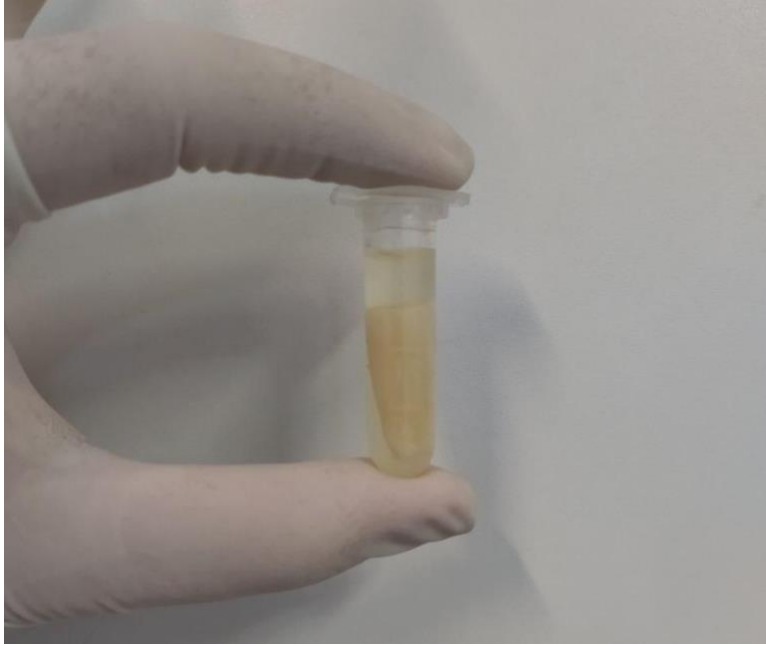


Figura 3 - Raiz em eppendorf, contaminadas com *E. faecalis*.

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

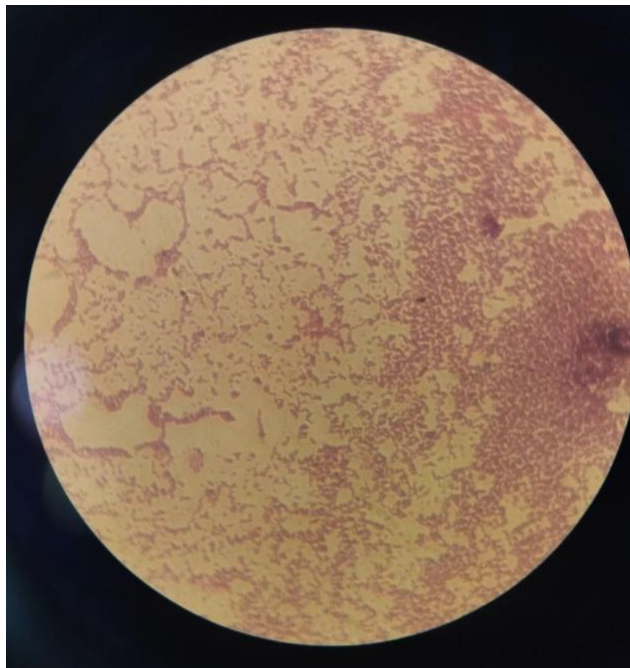


Figura 4 – Microscopia de varredura de Bactéria Gram+ compatível com *E. faecalis*. Coloração de Gram. Aumento 40 vezes.

2.3 DESCONTAMINAÇÃO DAS RAÍZES COM SOLUÇÕES AUXILIARES

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

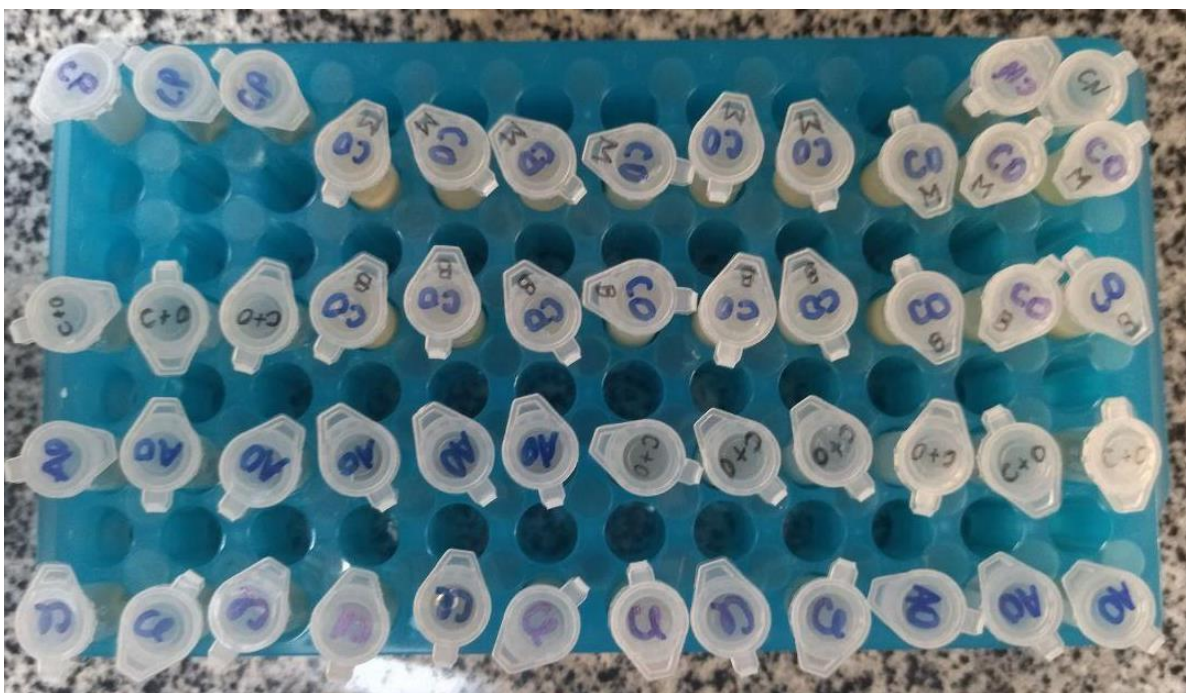


Figura 5 – Identificação dos 6 grupos distintos.

Foi utilizada solução aquosa de digluconato de clorexidina 2% (*Rioex*[®] - *Rioquímica*), a ozonização da clorexidina foi realizada em um gerador de ozônio (*MedplusV*[®] - *Philozon*), sendo o mesmo para fabricação do gás. A clorexidina foi ozonizada à uma concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, devido à grande quantidade de espuma resultante do processo. Foi considerada como mono ozonizada a clorexidina contida no primeiro frasco, onde recebia o gás ozônio diretamente. Parte dessa clorexidina do primeiro frasco se tornou espuma e foi extravasada a outro recipiente estéril, voltando ao meio líquido posteriormente, denominada bi ozonizada. A aplicação do gás ocorreu à uma concentração mais elevada de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi utilizado também para irrigação água bidestilada (água para injeção - *Fresenius*[®] *Kabi*) ozonizada a uma concentração de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9% - *Fresenius*[®] *Kabi*).

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

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

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

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

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

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

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

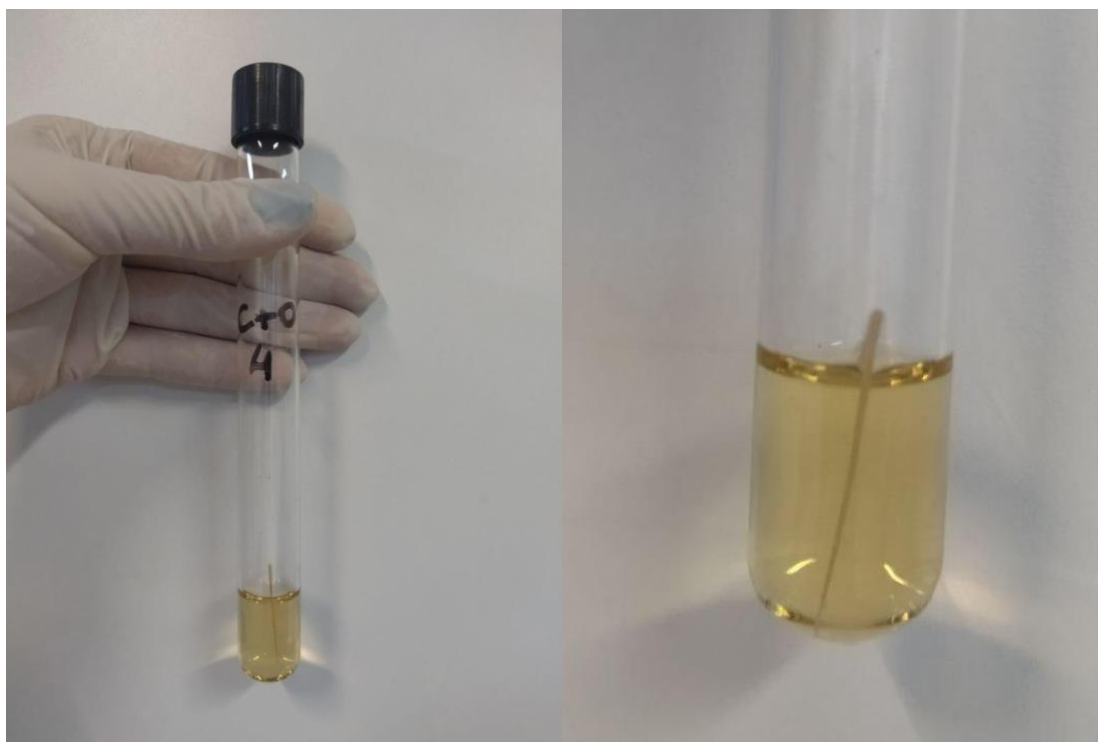


Figura 6 – Tubo contendo 3mL de caldo BHI e cone d epapel que foi imergido nas raízes após a irrigação.

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

Dessa forma, com o objetivo de quantificar, inferiu-se que quanto maior o valor de absorbância da amostra, maior será a concentração desta substância, que para este estudo significa que maior será a quantidade de bactérias, acompanhando os parâmetros da escala de *McFarland*. E assim, menor capacidade antimicrobiana da substância irrigadora⁹.

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



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

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

RESULTADOS

Os resultados obtidos no espectrofotômetro foram submetidos à análise estatística de *Kruskal-Wallis*, por meio do software estatístico *Jamovi*[®], pois foram analisadas 6 amostras independentes e 2 delas tiveram distribuição anormal no teste de *Shapiro-Wilk*.

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

Tabela 3 - Teste de *Kruskal-Wallis*

	χ^2	df	p
Absorbância	37.5	5	< .001

Realizado pelo software *Jamovi*[®].

Tabela 4 - Método *Dwass-Steel-Critchlow-Fligner*

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

Comparação dos graus de absorvância das amostras entre si.

Porém, a água ozonizada apresentou diferença significativa quando comparada às outras amostras, tendo uma eficácia inferior. Já o controle negativo não apresentou diferença significativa das outras amostras. Porém, isso pode ser atribuído pelo número de amostras reduzido comparado com os outros grupos.

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

Substâncias irrigadoras X Grau de absorbância

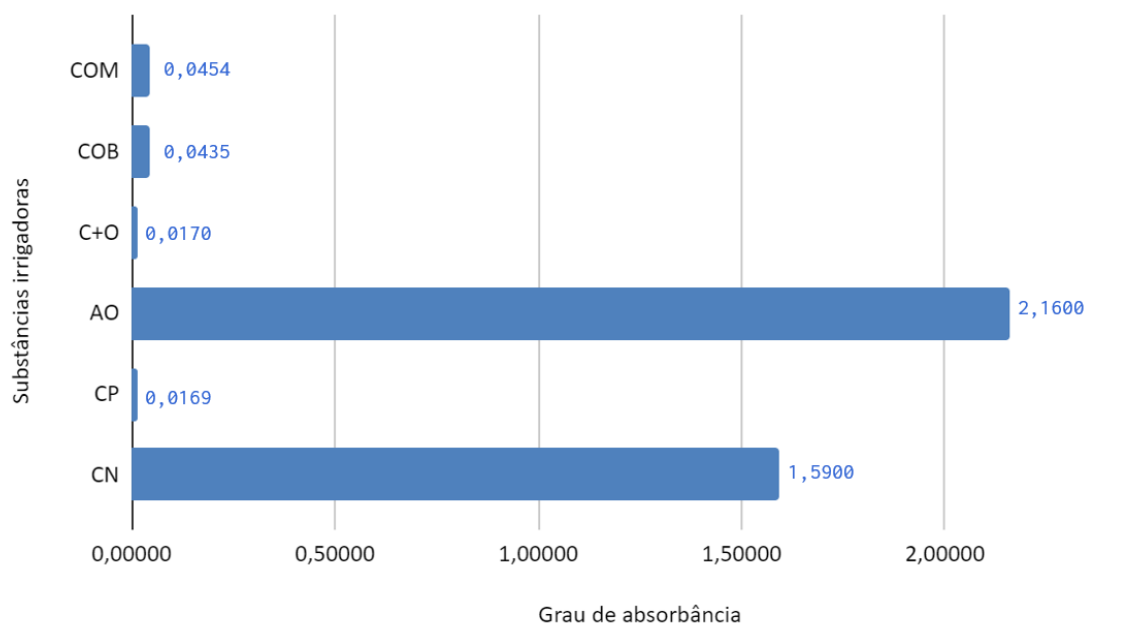


Figura 8 - Gráfico comparativo entre as medianas das amostras. Sendo COM - clorexidina mono ozonizada, COB - clorexidina bi ozonizada, AO - água ozonizada, CI - clorexidina pura, C + O - clorexidina + gás ozônio, CP - controle positivo (clorexidina 2%) e CN - controle negativo (soro). E o grau de absorbância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

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

DISCUSSÃO

Esse trabalho buscou apontar por meio de uma análise qualitativa qual a associação de digluconato de clorexidina 2% com gás ozônio apresentou comportamento antimicrobiano superior ao digluconato de clorexidina 2% puro quando aplicada como substância auxiliar no sistema de canais. Para tanto, foram utilizados modelos que mimetizaram a realidade clínica

com a contaminação do sistema de canais, em dentes bovinos, obtidos diretamente de frigoríficos de animais abatidos para indústria alimentícia [18,28]. Dessa maneira, não houve implicação ética no desenvolvimento do presente trabalho. O modelo experimental apresentado foi considerado satisfatório devido à similaridade na estrutura de canais de dentes bovinos evidenciada em dentes humanos [8].

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

Dessa forma, esse trabalho buscou traçar uma estratégia de utilização de substâncias auxiliares no sistema de canais para tratamento clínico mais eficaz contra canais contaminados que necessitem de substâncias com potencial antimicrobiano satisfatório para cada caso e que gerem menos danos teciduais.

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

As amostras de clorexidina mono e bi ozonizada, clorexidina associada ao gás ozônio e o controle positivo apresentaram medianas da absorbância de 0,054 nm, 0,043 nm, 0,017 e 0,016, respectivamente. Assim, o grau de opalescência seguindo o padrão de *McFarland* é de zero, o que se considera que por ml da substância pode ter até 300.000 UFCs. Isso sugere que essas substâncias foram capazes de reduzir a carga antimicrobiana, entretanto, a clorexidina mono e bi ozonizada não mostraram reduções estatisticamente significantes. Além disso, em consonância com Estrela et al. 2007 [10], nenhuma destas substâncias irrigadoras foi suficiente para inativar plenamente as cepas de *E. faecalis* existentes. Isso revela a necessidade e grande influência da instrumentação na limpeza do sistema de canais [2,5].

O uso clínico do ozônio na odontologia pode ser por meio da solução aquosa, gás e óleo [22]. Sua ação antimicrobiana se dá pelo elevado potencial antioxidante, supõe-se que o ozônio se dissocia rapidamente em água e libera uma forma reativa de oxigênio que ataca as

glicoproteínas, glicolípídeos, grupos sulfidrilo de algumas enzimas e outros aminoácidos presentes nas paredes celulares e membranas citoplasmáticas de bactérias e fungos, e com este processo a célula se desintegra [1,7,21,25]. Assim, o ozônio demonstra ser um eficaz antimicrobiano que age de modo rápido, sem gerar subprodutos tóxicos e sem induzir resistência aos medicamentos [7,21,24]. Além disso, o ozônio apresentou maior tolerância tecidual quando comparado com outros antissépticos comumente usados na odontologia [12,15]. Entretanto, a molécula ozônio (O_3) rapidamente se transforma em oxigênio puro (O_2) e por isso, é um gás bastante instável. Estima-se uma meia-vida de quarenta minutos a $20^{\circ}C$ para esse gás e quando vinculado a veículos aquosos essa conversão é acelerada. Dessa forma, entende-se que o ozônio não deve ser armazenado e seu uso deve ser imediato [11,26].

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

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

No estudo de Santiago (2019) [23], observou-se que raízes bovinas, contaminadas com *E. faecalis*, irrigadas com hipoclorito de sódio à 5%, hipoclorito de sódio à 2,5% e clorexidina à 2% apresentaram potencial antimicrobiano semelhantes e eficazes e que estes diferiram dos resultados obtidos com as amostras irrigadas com água ozonizada (concentração de 60 $\mu g/mL$), que apresentou resultados estatísticos próximos à água destilada (controle negativo).

Além disso, este estudo analisou as amostras 48 e 72 horas após a irrigação, cujo resultado se assemelhou ao presente trabalho, retratando que a irrigação com água ozonizada não parece haver efeito antimicrobiano residual satisfatório. Ademais, foram analisadas também o efeito da água ozonizada em consonância com ultrassom e *Easy Clean*® na limpeza de canais, que revelou não haver diferença estatística entre as amostras.

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

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

Além disso, foi estabelecido um protocolo de ozonização da clorexidina, nunca descrito, no intuito de analisar se o ozônio seria capaz de potencializar o efeito antimicrobiano da clorexidina em 2%. O ozônio foi produzido pelo gerador de ozônio, programado em uma concentração de 20 µg/mL. Ele foi borbulhado em cerca de 600 mL de digluconato de clorexidina 2% (clorexidina mono ozonizada), o líquido formou uma espuma que foi extravasada a outro recipiente estéril (clorexidina bi ozonizada), voltando ao estado líquido posteriormente. Em seguida, foi realizada a irrigação dos canais, em um grupo foi irrigado com o líquido do primeiro recipiente e em outro grupo foi irrigado com a substância do segundo recipiente. Sob essas condições, a clorexidina mono e bi ozonizada não apresentaram diferenças significativas entre seus resultados. Houve uma redução nas colônias de *E. faecalis*, entretanto não foi estatisticamente significativa e o resultado obtido foi inferior ao controle positivo (clorexidina 2%).

Dessa forma, são necessárias futuras análises para entender o que aconteceu a nível molecular, entretanto, afirma-se que, na presente pesquisa, no modelo apresentado, a incorporação do ozônio na clorexidina provocou uma redução do seu efeito antimicrobiano.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade de Brasília (UnB) 2021/2022.

REFERÊNCIAS

1. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry*. 2008;36(2):104–116.
2. Baugh D, Wallace J. The role of apical instrumentation in root canal treatment: a review of the literature. *Journal of endodontics*. 2005;31(5):333-340.
3. Bonan RF, Batista AUD, Hussne RP. Comparação do uso do hipoclorito de sódio e da clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*. 2011; 15(2): 237-244.
4. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology*. 1985;1(5):170-175.
5. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *European Journal of Oral Sciences*. 1981;89(4):321-328.
6. Câmara AC, Albuquerque MM, Aguiar CM. Soluções irrigadoras utilizadas para o preparo biomecânico de canais radiculares. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2010;10(1):127-133.
7. Crespo GD. Os efeitos da ozonioterapia na desinfecção dos canais radiculares comparado e associado a outros métodos de desinfecção: uma revisão de literatura. Serra (ES): Rede de ensino Doctum; 2021.
8. da Cruz Campos MI, Campos CN, Vitral RWF. O Uso de dentes bovinos como substitutos odontológicos de dentes humanos em pesquisas: uma revisão da literatura. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. 2008;8(1):127-132.
9. Espectrofotometria: Análise da concentração de soluções. São José do Pinhais: Kasvi; acesso em 16/03/2023. Disponível em: <https://kasvi.com.br/espectrofotometria-analise-concentracao-solucoes/>.
10. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *International Endodontic Journal*. 2007;40:85-93.

11. Hubbezoglu I, Zan R, Tunc T, Sumer Z. Antibacterial efficacy of aqueous ozone in root canals infected by *Enterococcus faecalis*. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014;7(7).
12. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *European journal of oral sciences*. 2006;114(5):435-440.
13. Huth, K. C., Quirling, M., Maier, S., Kamereck, K., Alkhayer, M., Paschos, E., et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *International Endodontic Journal*. 2009;42(1):3-13.
14. Lopes H, Siqueira JF Jr. "Irrigação dos canais radiculares". In: Lopes HP, Siqueira JFJ, editores. *Endodontia: biologia e técnica*. 5ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan Ltda; 2020. p. 468-496.
15. Lynch, E. Evidence-based efficacy of ozone for root canal irrigation. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 2008;20(5):287–293.
16. Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T., Terashita, M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of endodontics*. 2004;30(11):778-781.
17. Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Carvalho MF, Gonçalves A, Pina-Vaz I. Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. *BioMed research international*. 2014;2014.
18. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in South Korean population. *Journal of endodontics*. 2004;30(7):504-508.
19. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Lopes HP. Medicação intracanal. In: Lopes HP, Siqueira JFJ, editores. *Endodontia: biologia e técnica*. 5ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan Ltda; 2020. p. 497-520.
20. Rôças IN, Siqueira JF Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus Faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics*. 2004;30(5):315-320.
21. Rojas-Valencia MN. Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 2011;1:263–271.

22. Saini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*. 2011;2(2):151.
23. Santiago LM. Avaliação do potencial antimicrobiano da água ozonizada, digluconato de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 2, 5%, na terapia endodôntica de incisivos bovinos contaminados com *Enterococcus faecalis*: um estudo in vitro. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2019.
24. Sen S, Sen S. Ozone therapy a new vista in dentistry: Integrated review. *Medical Gas Research*. 2020;10(4):189–192.
25. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. *International endodontic journal*. 2020;53(3):317-332.
26. Silva, Y. D. C., da Silva, A. G. S., Martins, G. B., Sanches, A. C. B., de Lima Dantas, J. B., & Fortuna, T. Ozônio como agente antimicrobiano na odontologia: revisão de literatura. *Revista Da Faculdade De Odontologia Da Universidade Federal Da Bahia*. 2021;51(3):97-107.
27. Siqueira Jr JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *Journal of endodontics*. 1996;22(12):674-676.
28. Siqueira JF Jr., Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2004;97(1):85-94.
29. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. Ph changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *Journal of endodontics*. 1981; 7(1):17-21.

NORMAS DA REVISTA



Instruções aos autores

PROCESSO DE AVALIAÇÃO PELOS PARES

Todo o conteúdo publicado pela RCO passa por processo de revisão por especialistas (peer review). Cada artigo submetido para apreciação é encaminhado aos editores, que fazem uma revisão inicial quanto aos padrões mínimos de exigência e ao atendimento de todas as normas requeridas para envio dos originais. A seguir, remetem o artigo a dois revisores especialistas na área pertinente. O processo de análise dos manuscritos é feito pelo método duplo-cego. Após receber ambos os pareceres, o Conselho Editorial os avalia e decide pela aceitação do artigo sem modificações, pela recusa ou pela devolução aos autores com as sugestões de modificações. Conforme a necessidade, um determinado artigo pode retornar várias vezes aos autores para esclarecimentos e, a qualquer momento, pode ter sua recusa determinada, mas cada versão é sempre analisada pelo Conselho Editorial, que detém o poder da decisão final.

POLÍTICA DE ACESSO LIVRE

Esta revista oferece acesso livre imediato ao seu conteúdo, seguindo o princípio de que disponibilizar gratuitamente o conhecimento científico ao público proporciona maior democratização mundial do conhecimento.

DIRETRIZES PARA AUTORES

Instruções para envio de material para publicação. Os manuscritos devem ser enviados por meio do sistema de submissão de manuscrito.

DIRETRIZES PARA A PREPARAÇÃO DO ORIGINAL

Orientações gerais

O original – incluindo tabelas, ilustrações e referências bibliográficas – deve estar em conformidade com os “Requisitos Uniformes para Originais Submetidos a Revistas Biomédicas”, publicado pelo Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas.

Devem ser transferido pelo menos dois arquivos durante o processo de submissão:

1) Arquivo do manuscrito: deve ser carregado no passo 2 em Transferência do Manuscrito.

2) Página de rosto: deve ser carregado no passo 4 em Transferência de Documentos Suplementares.

As seções usadas no manuscrito na RCO são as seguintes: título em português, título em inglês, resumo em português, resumo em inglês, texto principal, agradecimentos, referências bibliográficas, tabelas (cada tabela completa, com título e notas de rodapé, em página separada), figuras (cada figura completa, com título e notas de rodapé em página separada) e legendas das figuras.

O texto deve ser digitado com fonte arial, tamanho 11 e margem de 2cm para todos os lados.

Página de rosto

A página de rosto deve conter todas as seguintes informações:

- a) título do artigo em inglês e em português;
- b) nome completo de cada um dos autores, endereço eletrônico de cada autor e filiação (instituição de vínculo);
- c) nome, endereço, telefone e endereço eletrônico do autor responsável pela correspondência;
- d) fonte financiadora ou fornecedora de equipamento e materiais, quando for o caso;
- e) declaração de conflito de interesse (escrever “nada a declarar” ou a revelação clara de quaisquer interesses econômicos ou de outra natureza que poderiam causar constrangimento se conhecidos depois da publicação do artigo);

f) transferência de direitos autorais (escrever que todos os autores concordam com o fornecimento de todos os direitos autorais a Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde).

Resumo

O resumo deve ter no máximo 250 palavras. O resumo das comunicações breves deve ter no máximo 150 palavras. Todas as informações que aparecem no resumo devem aparecer também no artigo. O resumo deve ser estruturado, conforme descrito a seguir:

Veja exemplo de Resumo de artigo original

Objetivo: informar por que o estudo foi iniciado e quais foram as hipóteses iniciais, se houve alguma. Definir precisamente qual foi o objetivo principal e informar somente os objetivos secundários mais relevantes. **Métodos:** informar sobre o delineamento do estudo (definir, se pertinente, se o estudo é randomizado, cego, prospectivo, etc.), o contexto ou local (definir, se pertinente, o nível de atendimento, se primário, secundário ou terciário, clínica privada, institucional, etc.), os pacientes ou participantes (definir critérios de seleção, número de casos no início e fim do estudo, etc.), as intervenções (descrever as características essenciais, incluindo métodos e duração) e os critérios de mensuração do desfecho. **Resultados:** informar os principais dados, intervalos de confiança e significância estatística. **Conclusões:** apresentar apenas aquelas apoiadas pelos dados do estudo e que contemplem os objetivos, bem como sua aplicação prática, dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares.

Veja exemplo de Resumo de artigo de revisão

Objetivo: informar por que a revisão da literatura foi feita, indicando se ela enfatiza algum fator em especial, como causa, prevenção, diagnóstico, tratamento ou prognóstico. **Fontes dos dados:** descrever as fontes da pesquisa, definindo as bases de dados e os anos pesquisados. Informar sucintamente os critérios de seleção de artigos e os métodos de extração e avaliação da qualidade das informações. **Síntese dos dados:** informar os principais resultados da pesquisa, sejam quantitativos ou qualitativos. **Conclusões:** apresentar as conclusões e suas aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão.

Veja exemplo de Resumo de comunicação breve e carta ao editor

Objetivo: informar por que o caso merece ser publicado, apontando a lacuna na literatura. Descrição: apresentar sinteticamente as informações básicas do caso. Comentários: conclusões sobre a importância do relato para a comunidade científica e as perspectivas de aplicação prática das abordagens inovadoras.

Palavras chave

Abaixo do resumo, fornecer de três a seis palavras chave ou expressões-chave que auxiliarão a inclusão adequada do resumo nos bancos de dados bibliográficos.

TEXTO DOS ARTIGOS DE ORIGINAIS

O texto dos artigos originais deve conter as seguintes seções, cada uma com seu respectivo subtítulo:

a) Introdução: sucinta, citando apenas referências estritamente pertinentes para mostrar a importância do tema e justificar o trabalho. Ao final da introdução, os objetivos do estudo devem ser claramente descritos.

b) Métodos: descrever a população estudada, a amostra e os critérios de seleção; definir claramente as variáveis e detalhar a análise estatística; incluir referências padronizadas sobre os métodos estatísticos e informação de eventuais programas de computação. Procedimentos, produtos e equipamentos utilizados devem ser descritos com detalhes suficientes para permitir a reprodução do estudo. É obrigatória a inclusão de declaração de que todos os procedimentos tenham sido aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da instituição a que se vinculam os autores ou, na falta deste, por um outro comitê de ética em pesquisa indicado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde.

c) Resultados: devem ser apresentados de maneira clara, objetiva e em sequência lógica. As informações contidas em tabelas ou figuras não devem ser repetidas no texto. Usar gráficos em vez de tabelas com um número muito grande de dados.

d) Discussão: deve interpretar os resultados e compará-los com os dados já descritos na literatura, enfatizando os aspectos novos e importantes do estudo. Discutir as implicações dos achados e suas limitações, bem como a necessidade de pesquisas adicionais. As conclusões devem ser apresentadas no final da discussão, levando em consideração os

objetivos do trabalho. Relacionar as conclusões aos objetivos iniciais do estudo, evitando assertivas não apoiadas pelos achados e dando ênfase igual a achados positivos e negativos que tenham méritos científicos similares. Incluir recomendações, quando pertinentes.

Texto dos artigos de revisão

O texto de artigos de revisão não obedece a um esquema rígido de seções. Sugere-se uma introdução breve, em que os autores explicam qual a importância da revisão para a área da saúde, à luz da literatura médica. Não é necessário descrever os métodos de seleção e extração dos dados, passando logo para a sua síntese, que, entretanto, deve apresentar todas as informações pertinentes em detalhe. A seção de conclusões deve correlacionar as idéias principais da revisão com as possíveis aplicações clínicas, limitando generalizações aos domínios da revisão.

Agradecimentos

Devem ser breves e objetivos, somente a pessoas ou instituições que contribuíram significativamente para o estudo, mas que não tenham preenchido os critérios de autoria. Integrantes da lista de agradecimento devem dar sua autorização por escrito para a divulgação de seus nomes, uma vez que os leitores podem supor seu endosso às conclusões do estudo.

Referências bibliográficas

As referências bibliográficas devem ser numeradas e ordenadas segundo a ordem alfabética, no qual devem ser identifi cadas pelos algarismos arábicos respectivos sobrescritos. Para listar as referências, não utilize o recurso de notas de fim ou notas de rodapé do Word. As referências devem ser formatadas no estilo Vancouver, de acordo com os exemplos listados a seguir:

1. Artigo padrão

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347:284-7.

2. Livro

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

3. Capítulo de livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editores. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

4. Teses e dissertações

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertação]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

5. Trabalho apresentado em congresso ou similar (publicado)

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5;Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

6. Artigo de revista eletrônica

Zimmerman RK, Wolfe RM, Fox DE, Fox JR, Nowalk MP, Troy JA et al. Vaccine criticism on the World Wide Web. J Med Internet Res. 2005;7(2):e17. <http://www.jmir.org/2005/2/e17/>. Acesso: 17/12/2005.

7. Materiais da Internet

7.1 Artigo publicado na Internet

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. The effectiveness of web- based vs. nonweb-based interventions: a meta- analysis of behavioral change outcomes. J Med Internet Res. 2004;6(4):e40. <http://www.jmir.org/2004/4/e40>. Acesso: 29/11/2004.

7.2 Site

Cancer-Pain.org [site na Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000- 01. <http://www.cancer-pain.org/>. Acesso: 9/07/2002.

7.3 Banco de dados na Internet

Who's certified [banco de dados na Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000. <http://www.abms.org/newsearch.asp>. Acesso: 8/03/2001.

Cada tabela deve ser apresentada em folha separada, numerada na ordem de aparecimento no texto, e conter um título sucinto, porém explicativo. Todas as explicações devem ser apresentadas em notas de rodapé e não no título.

Figuras (fotografias, desenhos, gráficos)

Todas as figuras devem ser numeradas na ordem de aparecimento no texto. Todas as explicações devem ser apresentadas nas legendas, inclusive acerca das abreviaturas utilizadas na tabela. Fotos não devem permitir a identificação do paciente. As ilustrações são aceitas em cores para publicação no site. Imagens geradas em computador, como gráficos, devem ser anexadas sob a forma de arquivos nos formatos .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi, para possibilitar uma impressão nítida; na versão eletrônica, a resolução será ajustada para 72 dpi. Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões, em qualquer circunstância.

Legendas das figuras

Devem ser apresentadas em página própria, devidamente identificadas com os respectivos números.

Declaração de Direito Autoral

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

a) Autores mantém os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Licença Creative Commons Attribution que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.

b) Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

c) Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou

durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja O Efeito do Acesso Livre).