

**ANÁLISE DO EFEITO DO *SPRAY* DE NITROGÊNIO
LÍQUIDO EM CULTURAS DE BACTÉRIAS
Enterococcus faecalis – ESTUDO *IN VITRO***

PAULO SÉRGIO BATISTA

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

**PORTO ALEGRE – RS
2006**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E
TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL**

PAULO SÉRGIO BATISTA

**ANÁLISE DO EFEITO DO *SPRAY* DE NITROGÊNIO
LÍQUIDO EM CULTURAS DE BACTÉRIAS
Enterococcus faecalis – ESTUDO *IN VITRO***

Linha de pesquisa: **Diagnóstico e terapêutica aplicada**

Orientador: **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**PORTO ALEGRE
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B333a Batista, Paulo Sérgio

Análise do efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias *enterococcus faecalis* – estudo *In Vitro* / . Paulo Sérgio Batista. – Porto Alegre, 2006.
97 f.

Tese (Doutorado em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Programa de Pós-graduação, Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

1. Crioterapia. 2. Endodontia. 3. *Enterococcus faecalis*. 4. Nitrogênio líquido.

CDD 617.695
617.52

Ficha elaborada pela bibliotecária Isabel Merlo Crespo CRB10/1201

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Data: 15 de maio de 2006.

DEDICATÓRIA

A DEUS:

“O Senhor o guardará e lhe conservará a vida. E o fará feliz na Terra.” (Salmo 40,3)

*À minha **MÃE**, por sua paciência, devotamento, carinho e pelas orações em todas as noites, durante as minhas idas e vindas de/para Curitiba.*

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, através da **Profa. Dra. Marilia Gerhardt de Oliveira**, pelo estímulo à Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e apoio à Pós-Graduação nesta Faculdade;

Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial**, pelos ensinamentos durante o curso;

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, pela sua paciência, compreensão e por suas orientações nesta pesquisa;

À **Profa. Dra. Marina de Oliveira Ribas**, da PUCPR, pela sua amizade, carinho e por me auxiliar na viabilização do projeto dessa pesquisa;

À **Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente**, pela confiança em me abrir as portas do laboratório de Microbiologia (Departamento de Patologia Básica) do Centro de Ciências Biológicas da UFPR e também por sua colaboração neste trabalho;

À **Profa. Ivone Maria Ratiguieri**, da PUCPR, que gentilmente cedeu a linhagem da bactéria utilizada nesta pesquisa;

À **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, por me deixar compartilhar com os alunos do curso de Odontologia, um pouco do que aprendi neste curso de Pós-graduação;

Ao **Prof. Monir Tacla**, diretor do curso de Odontologia da PUCPR, pela compreensão nos momentos de ausência naquela Universidade, quando da minha permanência durante essa jornada;

Ao **Prof. Dr. Sérgio Roberto Vieira**, pelo seu brilhante trabalho na coordenação do curso de Pós-graduação da PUCPR e por interceder junto aos órgãos competentes da PUCRS, durante meu alojamento nesta instituição;

Às professoras **Dra. Luciana Reis Azevedo** e **Michelle Santos Vianna**, da PUCPR, grandes amigas e colegas de disciplinas, pela dedicação e grande auxílio nos momentos de ausência naquela instituição;

Ao **Irmão Solimar dos Santos Amaro**, assessor do Centro de Pastoral da PUCRS, que gentilmente cedeu o alojamento durante parte de minha permanência em Porto Alegre;

A amiga **Janaína Paim** e sua família, pela amizade e hospitalidade durante o início dessa etapa de minha formação profissional;

Ao colega cirurgião-dentista e amigo **Juliano Fernandes Osório**, por tanto me buscar e levar ao aeroporto de Curitiba, e também pelo auxílio na documentação fotográfica...

... não se alcança a realidade sem um sonho. **MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS POR ESTE SONHO, ESTA REALIDADE.**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

“Não posso dizer qual é a fórmula mágica para o sucesso, mas posso dizer qual é a do fracasso: tentar agradar a todo mundo.”

Herbert Swope

À **Clotilde Hadas**, funcionária do laboratório de Microbiologia (Departamento de Patologia Básica) do Centro de Ciências Biológicas da UFPR, pelo grande auxílio no preparo dos meios de cultura;

À **Fernanda de Resende Gomes**, funcionária do laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, pelo auxílio durante os experimentos.

Ao aluno **Dayton Barp**, (curso de Odontologia da PUCPR) pelo seu grande auxílio durante a etapa experimental desta pesquisa;

Ao **Prof. Dr. Sérgio Luiz Inácio**, da PUCPR, pela análise estatística;

Aos colegas de turma **Bruno Campanha, Carlos Eduardo Baraldi, Cláudia Marcela Cancino, Daniela Nascimento Silva, Ingeburg Helwig, Marcel Fasolo Paris, Newton Kamei, Telmo Bertoldi**, pela agradável convivência ao longo desses anos;

Aos **meus alunos**, minhas sinceras desculpas pelos momentos de incompreensão, desatenção, impaciência e sono, principalmente naquelas aulas iniciadas após a longa jornada de doze horas de viagem;

À CAPES, pela bolsa concedida e pelo apoio destinado à pesquisa em nosso país;

Aos amigos **Dr. Witold**, aos professores **Dr. Antônio Adilson S. de Lima e Dra. Ângela Fernandes**, pela grande amizade e pelo apoio dispensado nos momentos de dificuldade;

À **Profa. Beatriz Sottile França**, da PUCPR, pela sua grande amizade, carinho, apoio e grande incentivo nos momentos de incerteza e desânimo;

E a todas as pessoas que colaboraram, direta ou indiretamente, na realização desta pesquisa ...

MUITO OBRIGADO!

ORAÇÃO DA SUPERAÇÃO

***Ó Senhor, por todas as nossas limitações
físicas, mentais, financeiras, de fé e de amor,
mostrai-nos a Tua face!***

***Se São Paulo nos lembra que
“quando somos fracos é que somos fortes”,
sede a nossa fortaleza, Senhor!***

***Preenche as nossas deficiências e carências
e transforma os nossos problemas em pontes para Ti.***

***Que os nossos olhos consigam ver assim e
os nossos corações entendam o que só desta
forma se há de entender.***

Amém!

RESUMO

RESUMO

A crioterapia com nitrogênio líquido tem sido utilizada em diversas áreas, inclusive com finalidades terapêuticas. Na Microbiologia, é vasto o número de pesquisas que abordam o efeito controlador do frio em bactérias (criobiologia), principalmente com a intenção de evitar sua proliferação. No entanto, pouco se sabe a respeito do efeito da queda brusca e intensa da temperatura, como aquela provocada pelo nitrogênio líquido, na forma de *spray*, em microrganismos como as bactérias *Enterococcus faecalis*, freqüentemente encontradas em canais com polpas necrosadas, infecções pulpares e periapicais refratárias ao tratamento endodôntico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar, *in vitro*, o efeito do *spray* de nitrogênio líquido nessas bactérias cultivadas em laboratório, em meios de cultura líquido (caldo BHI) e sólido (ágar-BHI). Para isso, uma suspensão de soro fisiológico concentrada em $1,5 \times 10^4$ bactérias/mL foi transferida para um frasco de vidro esterilizado e, em seguida, submetida à ação do *spray* de nitrogênio líquido. Através de diferentes protocolos estabelecidos, nos quais se variou o número de aplicações, com a presença ou não de um dispositivo que acelerava o descongelamento, o *spray* foi aplicado por meio de um sistema criogênico aberto (*CRY-AC do Brasil – Osasco/SP*), com uma ponta aberta acoplada num adaptador em ângulo reto. Após o ciclo de congelamento e descongelamento, um volume de 100 μ L dessa suspensão foi inoculado em tubos com tampa rosqueável, contendo meio líquido e para placas contendo meio sólido, que foram então incubados por 24 h, a 36°C. Para o meio líquido, os resultados obtidos na espectrofotometria mostraram discreta redução da turbidez, implicando numa redução da população bacteriana. Com relação ao cultivo em meio sólido, os resultados indicaram uma diminuição do número de colônias bacterianas dos grupos experimentais em relação ao grupo controle-positivo, principalmente nos ensaios com 2 intervalos de aplicação. Os resultados obtidos permitiram concluir que a aplicação do *spray* de nitrogênio líquido reduziu o crescimento *in vitro*, de *Enterococcus faecalis*. Entretanto, sob as condições testadas, não foi suficiente para eliminar toda a população bacteriana, a ponto de atribuir o poder bactericida ao nitrogênio líquido.

Unitermos¹: 1. Criocirurgia; 2. Crioterapia; 3. Endodontia; 4. *Enterococcus faecalis*; 5. Hipotermia induzida; 6. Microbiologia

¹ Acesso à BIREME

ABSTRACT

ABSTRACT

Liquid nitrogen cryotherapy has been used in several areas, including its use for therapeutic purposes. Concerning microbiology, there are a great number of researches focusing cold controlling effect on bacteria, mainly addressed to preventing their proliferation through freezing food. However, we have a limited knowledge of the intense and abrupt temperature drop effect, as that caused by liquid nitrogen spray, on microorganisms such as the *Enterococcus faecalis* bacteria. Thus, this work aims at analyzing, *in vitro*, the liquid nitrogen spray effect on bacteria cultivated in liquid (BHI broth) and solid (agar-BHI) culture media. To that end, a suspension concentrated in $1,5 \times 10^4$ bacteria/ml was transferred to an sterilized glass phial and subjected to liquid nitrogen spray application. Spray was applied, according to different established protocols, through using an open cryogenic system (CRY-AC[®]) with an open extremity and a right angle adapter coupled together. After the freezing/defrosting cycle, a little amount (100 μ L) of that suspension was transferred to test tubes filled with liquid medium and to Petri dishes containing solid medium, which were then incubated at a 36°C temperature for 24h. The liquid medium spectrography results showed a discrete turbidity reduction with decrease in the bacterium population. Regarding the solid medium culture, results showed a decreased number of bacterium colonies in the experimental groups when compared to the negative-control groups, mainly in the tests with two application intervals. Analyzing the obtained results we can infer that liquid nitrogen spray cryotherapy interfered with the *E. faecalis* *in vitro* growth, but under this work test conditions such interference was not enough to eliminate the whole bacterium population and to assign a bactericide power to liquid nitrogen.

Key-words: 1. Cryosurgery; 2. Cryotherapy; 3. Endodontics; 4. *Enterococcus faecalis*; 5. Induced Hypothermia; 6. Microbiology

RESUMEN

RESUMEN

La crioterapia con nitrógeno líquido ha sido utilizada en muchas áreas, incluso con finalidades terapéuticas. En la Microbiología, es amplio el número de pesquisas que abordan el efecto controlador del frío en bacterias, principalmente con la intención de evitar su proliferación, a través del congelamiento de alimentos. Entretanto, mucho poco se sabe a respecto del efecto de la caída brusca e intensa de la temperatura, como aquella provocada por el nitrógeno en la forma de *spray*, en microorganismos como las bacterias del tipo *Enterococcus faecalis*. De esa forma, el objetivo de este trabajo fué analizar, *in vitro*, el efecto del *spray* de nitrógeno líquido en bacterias cultivadas en laboratorio, en medios de cultura líquido (caldo BHI) y sólido (ágar-BHI). Para eso, una suspensión concentrada en $1,5 \times 10^4$ bacterias/ml fué transferida para un frasco de vidrio esterilizado y en seguida, sometida a la acción del *spray* de nitrógeno líquido. A través de diferentes protocolos establecidos, el *spray* fué aplicado por medio de un sistema criógeno abierto (CRY-AC[®]), con una punta abierta acoplada a un adaptador de ángulo recto. Después del ciclo de congelamiento y descongelamiento, un pequeño volumen (100 ul) de esa suspensión fué transferido para tubos conteniendo medio líquido y para las cajas conteniendo medio sólido, que fueron encubados por 24 horas, a 36°C. Para el medio líquido, los resultados obtenidos en la espectrofotometría mostraron discreta reducción en la turbidez, resultando en una reducción de la población bacteriana. Con relación al cultivo en medio sólido, los resultados mostraron una disminución del número de colonias bacterianas de los grupos experimentales en relación al grupo controle-positivo, principalmente en las muestras con 2 intervalos de aplicación. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la crioterapia con *spray* de nitrógeno líquido interfirió en el crecimiento de bacterias cultivadas en laboratorio, pero, no fué suficiente para eliminar toda la población bacteriana, a punto de atribuir el poder bactericida al nitrógeno líquido.

Palabras-llave: 1. Criocirugía; 2. Crioterapia; 3. Endodoncia. 4. *Enterococcus faecalis*; 5. Hipotermia inducida; 6. Microbiología

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19.433) cultivadas em ágar-sangue – após 24 h de incubação a 36°C.....	55
FIGURA 2 – Representação dos valores de absorvância da escala de <i>Mac Farland</i> , que representa o aumento da concentração bacteriana nos diversos tubos. Dados da Pesquisa, UFPR/2005.....	57
FIGURA 3 – Preparo do inóculo.....	58
FIGURA 4. A – Aparelho criogênico e acessórios utilizados: A – CRY-AC® (<i>Brymill Cryogenics Systems</i>); B – ponta com adaptador em ângulo reto (modelo #309) e C – ponta com abertura de 0, 57 mm de diâmetro.	59
FIGURA 5 – Diferentes procedimentos adotados durante a etapa experimental.....	61
FIGURA 6 – Caldo BHI em tubos de ensaio com tampa rosqueável	62
FIGURA 7 – Representação do procedimento de contagem do número de UFC/ μ L, para estimativa do número de colônias na superfície do meio sólido ágar-BHI.....	64
FIGURA 8 – Resultados obtidos com o cultivo em meio líquido – caldo BHI.....	67
FIGURA 9 – Representação dos valores médios da absorvância, obtida por análise espectrofotométrica, segundo os grupos.....	67
FIGURA 10 – Placa com as colônias de <i>E. faecalis</i> formadas na superfície do ágar-BHI (grupo controle-positivo).....	69
FIGURA 11 – Placa com as colônias de <i>E. faecalis</i> formadas na superfície do ágar-BHI (grupo experimental 5).....	70
FIGURA 12 – Placa com as colônias de <i>E. faecalis</i> formadas na superfície do ágar-BHI (grupo experimental 11).....	70
FIGURA 13 – Representação do número médio de colônias bacterianas no meio de cultura ágar-BHI, após 24 h de incubação para os diferentes grupos testados.....	73
FIGURA 14 – Representação dos valores médios do número de colônias formadas no meio ágar-BHI, segundo os novos grupos.....	74

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valores da escala de Mac Farland, em relação ao número e a composição do tubo e sua correspondência em número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).....	56
TABELA 2 – Distribuição dos grupos e respectivos protocolos de tratamento	60
TABELA 3 – Distribuição dos grupos e respectivos protocolos de tratamento	63
TABELA 4 – Distribuição dos valores de absorvância para <i>E. faecalis</i> em caldo BHI, após 24 h de incubação a 36°C. Análise por espectrofotometria	66
TABELA 5 – Análise estatística descritiva da absorvância obtida em análise espectrofotométrica, segundo os grupos.....	68
TABELA 6 – Estimativa do número de colônias de <i>E. faecalis</i> (ATCC 19.433) presentes no meio ágar-BHI, após os diferentes protocolos de tratamento e cultivo a 36°C, por 24 h.....	71
TABELA 7 – Análise estatística descritiva referente à estimativa do número de unidades formadoras de colônias, em meio ágar-BHI, segundo os grupos.....	72
TABELA 8 – Estimativa das unidades formadoras de colônias de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19.433), a partir do cultivo em meio sólido – ágar-BHI.....	74
TABELA 9 – Análise estatística descritiva referente à estimativa do número de unidades formadoras de colônias, segundo os novos protocolos de tratamento.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a. C. – antes de Cristo

ANOVA – análise de variância univariada

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção de culturas do tipo americana)

BaCl₂ – cloreto de bário

BaSO₄ – sulfato de bário

BHI – *Brain Heart Infusion* (Infusão cérebro-coração)

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CO₂ – dióxido de carbono (gás carbônico)

cm – centímetro(s)

CV – coeficiente de variação

d = diâmetro do círculo na circunferência traçada no centro da placa

D = diâmetro da placa de Petri

h – hora(s)

HSD – *Honestly Significantly Difference* (Diferença honestamente significativa)

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

mL – mililitro(s)

nm – nanômetro(s)

N₂ – nitrogênio (forma molecular)

N₂O – óxido nitroso

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PUCPR – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SF – soro fisiológico

SPSS – *Statistic Packet of Social Science*

UFC – unidades formadoras de colônias

UFPR – Universidade Federal do Paraná

°C – grau(s) Celsius

® – marca registrada

μm – micrometro(s)

μL – microlitro(s)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
RESUMEN	16
LISTA DE FIGURAS	18
LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	22
1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISTA DA LITERATURA	34
2.1 Criobiologia	35
2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	39
2.3 Mecanismo de injúria bacteriana pela baixa temperatura.....	45
3 METODOLOGIA	53
3.1 Termo de aprovação na comissão científica e de ética	54
3.2. Delineamento da Pesquisa	54
3.3 Hipótese	54
3.4 Procedimentos metodológicos.....	55
3.4.1 Linhagem.....	55
3.4.2 Cultivo e preparo do inóculo.....	55
3.4.3 Classificação dos grupos x tratamento.....	59
3.4.4 Avaliação do crescimento de <i>E. faecalis</i> em meio líquido caldo BHI.....	62
3.4.5 Avaliação do crescimento de <i>E. faecalis</i> em meio sólido ágar-BHI.....	63
3.4.6 Contagem do número de unidades formadoras de colônias.....	64
3.4.7 Análise estatística.....	64
4 RESULTADOS	65

4.1 Avaliação do crescimento de <i>E. faecalis</i> em meio líquido.....	66
4.2 Avaliação do crescimento de <i>E. faecalis</i> em meio sólido.....	69
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES	83
7 REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	91
ANEXO A – Aprovação do Projeto de Pesquisa pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.....	92
ANEXO B – Declaração de aceitação do Departamento de Patologia Básica (Setor de Ciências Biológicas) da UFPR.....	93
ANEXO C – Espectrofotômetro digital <i>Thermo Spectronic</i> – Genesys 10 uv ..	94
ANEXO D – Representação do método empregado para a aplicação do <i>spray</i> de N ₂ líquido no frasco contendo o inóculo	95
ANEXO E – Aparelho agitador de tubos tipo Vórtex	96
ANEXO F – Representação da técnica de semeadura em superfície (Distribuição do inóculo com alça de Drigalski)	97

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Crioterapia ou criocirurgia é uma técnica cirúrgica que consiste na aplicação de uma temperatura extremamente baixa com a finalidade de se conseguir a destruição de tecidos. Mais adequado, seria incluir o adjetivo “local”, a fim de se distinguir este novo método daquele outro em que o resfriamento é sistêmico.

O conceito de cirurgia modificou-se no transcorrer dos anos e tem hoje um significado mais amplo, apresentando uma relação mais efetiva com o ato de seccionar tecidos. Muitas vezes, a exérese de tecidos não ocorre neste método terapêutico e, portanto, parece incoerente denominá-lo criocirurgia. A expressão crioterapia local parece ser mais adequada quando se deseja designar este tipo de tratamento que, na literatura médica, aparece sob a epígrafe de criocirurgia. Por outro lado, quando se estuda o efeito de baixas temperaturas em células, tecidos e organismos vivos, o termo mais adequado é criobiologia (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Criobiologia>).

A crioterapia local moderna surgiu em 1959, com o neurocirurgião norte-americano Cooper, para o tratamento do Parkinsonismo. Cooper projetou e construiu um aparelho dotado de um aplicador protegido por vácuo, exceto na extremidade. Para regular o grau de queda de temperatura, capaz de alcançar cerca de -196°C , fez variar a velocidade com que o nitrogênio líquido (N_2) se projetava na ponta do aplicador. A temperatura na extremidade do aplicador era registrada em agulhas termoeletricas ligadas a um criômetro. Devido ao êxito no tratamento do Parkinsonismo, Cooper resolveu estudar o efeito do congelamento extremo na periferia de tumores superficiais, observando que toda a zona congelada sofria necrose e esfacelo, com desaparecimento das células neoplásicas. A esse processo, denominou-se crionecrose (BARBOSA e SANVITTO, 1973).

A morte celular ocorre quando se atingem temperaturas inferiores a -20°C (Salmassy e POGREL, 1995).

Relatos da literatura descrevem duas formas para a realização da crioterapia local: através do sistema fechado e pelo sistema aberto. Mais utilizado para tecidos moles, o sistema fechado é assim chamado por não haver contato da

substância criogênica com o meio externo antes da aplicação na lesão e a crionecrose se dá pelo contato do agente criogênico na forma de uma sonda com o tecido a ser tratado. Já no sistema aberto, há um contato direto do agente criogênico com a lesão, conduzido através de uma haste de algodão ou através de um dispositivo que libera o N2 líquido na forma de *spray*.

O sistema aberto caracteriza-se pela simplicidade e facilidade de aplicação, além de ser de fácil obtenção e de menor custo. Consiste numa técnica aparentemente simples e é bastante utilizada para o tratamento de lesões ósseas agressivas como ameloblastomas, mixomas, lesões de células gigantes e outras com grande potencial de recorrência. Nesses casos, a abordagem convencional e mais radical requer a ressecção parcial do osso envolvido com a finalidade de se conseguir uma margem de segurança, o que pode levar a um grande prejuízo do ponto de vista anatomofuncional, além de comprometer a estética. Com a crioterapia local, o sistema aberto é bastante agressivo para a lesão, pois o *spray* penetra no interior do osso e o resfriamento brusco e intenso provoca a necrose de células tumorais que por ventura tenham permanecido no leito ósseo após a curetagem. Dessa forma, existe a possibilidade de que novos protocolos sejam implantados, revolucionando a terapêutica cirúrgica dessas lesões, uma vez que elas poderão ser tratadas com a enucleação seguida de curetagem e aplicação de *spray* de N2 líquido. A penetração no osso e a crionecrose induzida fornece a margem de segurança requerida e, ao mesmo tempo, esta técnica é descrita como conservadora para o paciente, uma vez que impede que grandes segmentos ou seções da maxila ou mandíbula sejam ressecados, evitando dessa forma, grandes defeitos ou mutilações para esses pacientes (POGREL, 1995).

Na literatura, há relatos de baixas taxas de recorrência da lesão, quando tratadas por esta técnica, com valores próximos àqueles para os casos tratados pela técnica convencional. Esses casos de recorrência podem, inclusive, ser resolvidos com uma segunda intervenção, com nova enucleação, curetagem e crioterapia local (POGREL, 1993; BIAZOLLA e MAGRO FILHO, 1994; CURI, DIB e SANTOS PINTO, 1997).

Pela técnica do sistema aberto, o *spray* de N2 líquido tem sido citado por inúmeros autores quanto ao seu poder criogênico de induzir necrose e baixos efeitos adversos (LEOPARD, 1975; READ, 1979).

Também pelo sistema aberto, Beltrão e Sant'Ana Filho (2003) realizaram análise clínica dos efeitos do nitrogênio líquido em lábio e palato de coelhos e concluíram que é possível controlar a extensão do congelamento e a cicatrização ocorre em 14 dias.

Em 1995, Pogrel relata que o N₂, em baixa temperatura, destrói a matriz óssea orgânica pela crionecrose, mantendo preservada, entretanto, a matriz inorgânica, aquela que serve de guia para o novo osso que será formado.

Embora ainda seja pouco utilizada atualmente, a crioterapia local, graças a um considerável desenvolvimento nos últimos 20 anos, tem sido indicada como modalidade terapêutica em diversas áreas da saúde e encontra aplicação nos dias atuais, em quase todas as áreas da Medicina: Dermatologia, Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Cirurgia Plástica, Ginecologia e Oncologia.

Na Odontologia, especialmente na Cirurgia Bucomaxilofacial, a aplicação da crioterapia pode ser muito benéfica nos casos de lesões da mucosa bucal, como leucoplasias, hemangiomas, linfangiomas, granulomas piogênicos, além de outras. Atualmente, muitos benefícios têm sido atribuídos com o uso dessa técnica no tratamento de tumores odontogênicos, principalmente nos ameloblastomas, que são bastante conhecidos por sua agressividade local dentro dos ossos maxilares e mandibular afetados.

Na literatura, existem poucos relatos que demonstram os efeitos do congelamento e descongelamento em células bacterianas. Entre estes, a maioria descreve as substâncias criogênicas como agentes conservantes de bactérias, sêmen e embriões.

Estudos realizados no fim do século XIX e no início do século XX foram conduzidos de forma a estimar a viabilidade do crescimento bacteriano após o congelamento e o descongelamento. A disponibilidade do “ar líquido”, como o hidrogênio e o nitrogênio líquido, durante esse período, tornou possível aos pesquisadores explorar os efeitos da baixa temperatura (tão baixa quanto -190°C) na sobrevivência de bactérias (RAY e SPECK, 1973).

Em 1884, Pictet e Yung (apud RAY e SPECK, 1973) congelaram suspensão de várias culturas bacterianas a -120°C e armazenaram por 36 h, e observaram que, após o descongelamento, as bactérias sobreviveram e retomaram o crescimento.

Em 1900, MacFayden (apud RAY e SPECK,1973) relatou que o congelamento a -190°C , por 20 horas, as culturas bacterianas não apenas sobreviveram, mas também preservaram suas características bioquímicas e propriedades patogênicas. Gradualmente, tornou-se aparente para os pesquisadores da área, que nem todas as espécies de bactérias sobrevivem quando congeladas e igualmente descongeladas. Dessa forma, o congelamento não poderia ser utilizado, em longo prazo, para preservar culturas bacterianas a menos que métodos aperfeiçoados fossem desenvolvidos.

Outros estudos foram realizados com a finalidade de se entender o mecanismo de como o congelamento e descongelamento produziram efeito letal nas células bacterianas. Isso provavelmente iniciou uma estimativa da letalidade produzida pelo congelamento/descongelamento nas bactérias.

Os efeitos do congelamento e descongelamento na perda da viabilidade da célula bacteriana, sob condições variadas, foram testadas para explicar o mecanismo da morte bacteriana causada pelo congelamento. Isso tornou claro aos pesquisadores que as bactérias diferem na sua sensibilidade ao congelamento e ao descongelamento, de acordo com linhagem, espécie, idade, condição de crescimento, natureza do meio de cultura, condições do congelamento e descongelamento e muitos outros (RAY e SPECK, 1973).

Poucos estudos foram realizados com a finalidade de demonstrar a sensibilidade bacteriana ao frio intenso (Dumont, Marechal e Gervais, 2004), especialmente com os *Enterococcus faecalis*.

Na Odontologia, os enterococos têm sido muito estudados atualmente em função da sua presença nas patologias pulpares e periapicais, sobretudo naquelas onde o tratamento endodôntico não é bem sucedido.

Atribui-se a importância dessa pesquisa no desdobramento da crioterapia local com *spray* de N_2 líquido como um recurso terapêutico viável, que pode se justificar pela acessível e excelente alternativa de se criar um novo modelo experimental para o estudo do efeito da criobiologia em microorganismos.

Dessa forma, com base nas informações relatadas anteriormente e, de acordo com o estágio atual da terapia antimicrobiana, sobretudo naquelas infecções pulpares e/ou periapicais refratárias, advindas com o insucesso do tratamento endodôntico, surge o questionamento: diferentes formas de aplicação

do *spray* de N₂ líquido tem efeito letal para colônias bacterianas cultivadas em laboratório?

Considerando-se a necrose provocada em células humanas pelo N₂, com aplicação clínica, pode-se levantar a hipótese de que a queda brusca de temperatura provocada pelo N₂ líquido interfere no crescimento dos *Enterococcus faecalis*, reduzindo o número de bactérias cultivadas e semeadas em meios de cultura.

O presente estudo tem como objetivo verificar o efeito da aplicação do *spray* de N₂ líquido em bactérias, visando especificamente:

1. analisar, *in vitro*, o efeito do resfriamento brusco e intenso, produzido pelo *spray* de N₂ líquido em culturas de bactérias *Enterococcus faecalis*;
2. avaliar qual dos protocolos de aplicação de N₂ analisados foi o melhor para promover a redução da população bacteriana nos *Enterococcus faecalis* cultivados em meios líquido e sólido;
3. verificar se a queda brusca de temperatura induzida pelo N₂ líquido tem efeito letal em bactérias cultivadas em laboratório;
4. verificar se o tempo e o número de aplicações de *spray* de N₂ líquido reduz a população bacteriana, no meio de cultura à base de BHI.

REVISTA DA LITERATURA

2. REVISTA DA LITERATURA

2.1. Criobiologia

Os relatos mais antigos sobre a ação terapêutica do frio remontam à antigüidade. Os egípcios, em 2.500 a.C. já utilizavam o frio na forma de compressas geladas, nas fraturas de crânio e feridas infectadas do tórax.

Hipócrates, por volta de 400 a.C. usava o frio no controle de hemorragias e edemas (BARBOSA e SANVITTO, 1973).

Num período mais recente, o cientista Robert Boyle (1665) descreveu os efeitos do frio em animais mortos, mostrando que o mesmo evitava a putrefação dos tecidos.

No século XIX, o cirurgião das tropas napoleônicas Barão Jean Larrey, notou a possibilidade de amputar, sem dor, membros congelados de soldados (BARBOSA e SANVITTO, 1973). Esse poder anestésico do frio, assinalado por Boyle e Jean Larrey, está em perfeita consonância com as atuais conquistas da crioterapia, onde se salienta essa sua capacidade anestésica.

Coube a James Arnott, em 1851, a primeira referência bibliográfica sobre o uso da temperatura subzero, para a destruição de tecidos patológicos, especialmente em tumores. Nos seus experimentos, enchia reservatórios com água salgada gelada e aplicava a superfície desses recipientes diretamente sobre massas tumorais e conseguia resfriamentos de até -24°C.

Em 1903, Juliusberg preconizava o tratamento de lesões cutâneas com *spray* de CO₂, que foi popularizada por Pusey, em 1907 – “a era do CO₂”.

Entretanto, grandes reduções de temperatura que são exigidas pela crioterapia local recente só tornaram possíveis quando o cientista francês Cailletet conseguiu liquefazer o ar.

James Dewar, em 1892, idealizou e construiu um reservatório protegido por vácuo para o armazenamento e conservação do ar liquefeito.

Em 1889, Campbell White, o idealizador do 1º *spray* para ar líquido, foi o primeiro cirurgião a trabalhar com temperaturas extremamente reduzidas.

Publicou um trabalho sobre o uso do ar líquido na Medicina, que era utilizado em contato direto com as lesões por meio de algodão embebido.

Em 1940, o nitrogênio é liquefeito e revelou-se como o refrigerante mais adequado à crioterapia local, em função da necrose que causava nos tecidos. (BARBOSA e SANVITTO, 1973)

Como agentes criogênicos, a literatura relata o dióxido de carbono (CO₂), que evapora a -78,5°C, o óxido nitroso (N₂O) a -89,7°C e o nitrogênio líquido (N₂) que evapora à temperatura de -196°C. (SALMASSY e POGREL, 1995). Por atingir temperaturas menores, provocar maior efeito congelante e ser de fácil acesso e transporte, o N₂ é o agente criogênico mais utilizado nas diversas formas de crioterapia local. A forma de *spray* destaca-se pela indicação nos tecidos ósseos por atingir maiores profundidades. (BRADLEY e FISHER, 1975; TAL, 1992; YEH, 2000)

Gage et al. (1966) e Emmings et al. (1966) realizaram os primeiros experimentos em animais para observar a ação do frio intenso, através da passagem de nitrogênio líquido por espirais intra-ósseos no fêmur e na mandíbula de cães e observaram necrose óssea seguida por uma reparação advinda do periósteo e do endósteo. Nessa mesma época, Marcove e Miller (*apud* BARBOSA e SANVITTO, 1973) utilizaram a crioterapia local em lesões malignas e relataram diminuição do índice de recidiva e eliminação da dor, inclusive nos casos onde a radioterapia havia fracassado.

Segundo Barbosa e Sanvitto (1973), quase todos os trabalhos consultados são unânimes em numerar os seguintes, como os mais importantes fatores implicados na destruição celular:

- a. choque térmico;
- b. cristalização;
- c. desequilíbrio eletrolítico;
- d. desnaturação protéica;
- e. alterações na microcirculação sangüínea;
- f. possível reação imunológica local e geral.

Outros trabalhos colaboraram para se compreender o mecanismo da morte celular (WHITAKER, 1984), o comportamento ósseo durante a reparação, o melhor agente crioterápico a ser utilizado (BRAHDLEY; FISHER, 1975), e a

extensão da área necrótica a partir da superfície submetida ao agente criogênico (FISHER et al. 1977, POGREL et al.,1996).

Desde então diversos autores passaram a publicar suas experiências com a utilização desta técnica: Moroni et al. (1982) relataram bons resultados em quatro pacientes portadores de ameloblastoma.

Tal, Koslovsky e Pitaru (1991) avaliaram o potencial de regeneração do ligamento periodontal após trauma induzido pela baixa temperatura. Após a realização de uma incisão semilunar, uma sonda foi colocada em contato com a cortical óssea alveolar vestibular de 6 cães. Essa sonda, colocado a 5 mm de distância da crista óssea alveolar durante 10 segundos, levou a um resfriamento de -81°C. O ciclo congelamento-descongelamento foi repetido 3 vezes. Na região contralateral, todo o procedimento cirúrgico foi realizado, apenas com a simulação da crioterapia, porém sem o resfriamento com a sonda. Após 1 hora, os achados histológicos nos grupos experimental e controle foram similares. Após 48 horas de pós-operatório, o componente celular do ligamento periodontal congelado não pôde ser identificado e a resposta inflamatória foi mínima. No entanto, as fibras colágenas mostraram-se de forma contínua entre o osso alveolar e o cimento. Lacunas no osso do segmento congelado estavam vazias. O ligamento periodontal injuriado estava circundado por ligamento periodontal normal. Após 30 dias, o espaço do ligamento periodontal do segmento congelado estava ocupado por células semelhantes às do ligamento periodontal normal, que não eram significativamente diferentes das células do ligamento periodontal da região apical ou coronal. Fibras colágenas apresentavam-se conectadas ao cimento num dos lados e ao osso alveolar do outro. No grupo experimental, não foi observada reabsorção ou anquilose. Os autores concluíram que a matriz extracelular da área desvitalizada foi preservada, servindo de suporte para a regeneração após a “criolesão”.

Em 1995, Pogrel apresentou o seguimento de seus casos a partir de 1983, onde reuniu 48 pacientes, havendo apenas um episódio atípico de recidiva de ceratocisto, pois ocorreu a certa distância da lesão primária.

Curi, Dib e Santos Pinto (1997) apresentaram um estudo retrospectivo de 36 pacientes com o diagnóstico histopatológico de ameloblastoma, tratados por curetagem associada à crioterapia local, com *spray* de N₂ líquido e observaram recidiva em 11 casos (taxa de 30,55%). Os autores

realizaram ainda um estudo comparativo, no qual a taxa de recidiva para o ameloblastoma é bastante variada de acordo com o tratamento proposto, variando de 14 a 22% quando se realiza a ressecção segmentar ou em bloco e de 60 a 100%, quando apenas a enucleação e curetagem são empregadas.

Dentre as especialidades médicas, a ortopedia também utiliza a crioterapia local através de N₂ para o tratamento coadjuvante de tumores de células gigantes de epífises ósseas (MALAWER et al., 1999).

Existem várias formas de se conseguir o resfriamento, visando o congelamento rápido do local e conseqüentemente a necrose da área. Através do sistema aberto, o *spray* de N₂ líquido tem sido citado por inúmeros autores quanto ao seu poder criogênico de induzir necrose e baixos efeitos adversos. Consiste numa técnica aparentemente simples, sendo bastante agressiva para a lesão, pois o *spray* penetra no interior do osso, provocando a necrose de células tumorais que por ventura tenham permanecido no leito ósseo após a curetagem. Ao mesmo tempo, esta técnica é descrita como conservadora para o paciente, uma vez que impede que grandes segmentos ou seções da maxila ou mandíbula sejam ressecados, evitando dessa forma, grandes defeitos ou mutilações para esses pacientes (POGREL, 1995).

Em 2002, Santos e Sant'Ana Filho realizaram análise morfológica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido, através dos sistemas aberto e fechado. A técnica de aplicação do nitrogênio com a sonda aberta apresentou dano tecidual mais localizado. Os autores observaram que as alterações provocadas pela aplicação do nitrogênio com hastes de algodão foram mais brandas e restritas à área central de aplicação do agente criogênico. Concluiu-se que o *spray* não deve ser usado como tratamento de lesões em cavidade bucal.

Martins da Silva e Sant'Ana Filho (2003) realizaram análise microscópica do efeito do *spray* de N₂ líquido em mandíbula de coelhos e observaram que, embora a crioterapia tenha causado necrose das paredes ósseas, não interferiu no processo de reparo e que, de acordo com o método empregado, foi possível prever a extensão da área necrótica do tecido ósseo.

Scortegagna e Sant'Ana Filho (2004) avaliaram o grau de reparação óssea em defeitos cirúrgicos produzidos em mandíbulas de coelhos, as quais foram submetidas à crioterapia local com *spray* de N₂ líquido e submetidas a enxerto ósseo autógeno. Mediante histomorfometria, os resultados mostraram

que a crioterapia com N₂ líquido pôde retardar, porém, não inviabiliza o processo de integração enxerto – leito receptor, podendo ser empregada previamente em situações onde se faz necessária a colocação de enxertos imediatos.

Utilizando-se do sistema fechado, Borges e Sant’Ana Filho (2005) utilizaram o *spray* de N₂ líquido para o tratamento de lesões de hiperplasia gengival em doze pacientes. O sucesso obtido com a redução da lesão foi de 50%. Os autores também demonstraram que a técnica utilizada é eficaz naquelas lesões pediculadas e se constitui numa excelente alternativa indolor e de rápida execução nesses casos.

2.2. *Enterococcus faecalis*

Os enterococos (“cocos entéricos”) são bactérias do tipo cocos Gram-positivos que fazem parte da microbiota intestinal. Geralmente estão dispostos em pares e cadeias curtas. Antigamente, eram classificados como estreptococos do grupo D, devido à presença do antígeno de parede celular do grupo D (ácido teicóico glicerol associado à membrana citoplasmática). Apesar desta observação, foi constatado que estes microrganismos são diferentes de outros estreptococos do grupo D (descritos como estreptococos do grupo D não-enterocócicos, como o *S. bovis*).

Espécies de enterococos pertenciam anteriormente ao gênero *Streptococcus*, classificadas como estreptococos do Grupo D de Lancefield. Vários estudos realizados entre os anos 60 e 70 (MÖLLER, 1966; MIRANDA, 1969; NORD e WADSRÖM, 1973; HEINTZ et al., 1975) referiam-se a espécies de *Streptococcus faecalis*. Em 1984, os enterococos foram reclassificados no novo gênero *Enterococcus*, havendo atualmente 18 espécies desse gênero. As espécies mais comumente isoladas e importantes do ponto de vista clínico são *Enterococcus faecalis* (“relativo a fezes”) e *Enterococcus faecium* (“das fezes”).

O *Enterococcus faecalis* é a espécie mais freqüente do gênero *Enterococcus*, compreendendo cerca de 80 a 85% das amostras de enterococos isoladas de material clínico (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

Segundo PELCZAR (1997), os enterococos são anaeróbios facultativos e exibem crescimento ótimo a 35°C, embora a maioria dos microrganismos isolados possa crescer entre 10 e 45°C. Crescem rapidamente

em meios de cultura de ágar-sangue ou ágar-chocolate, produzindo grandes colônias brancas após 24 horas de incubação. Os enterococos crescem na presença de NaCl a 6,5%, toleram sais biliares a 40% e podem hidrolisar a esculina. Estas propriedades básicas podem ser utilizadas para distinguir os enterococos de outros cocos Gram-positivos catalase-negativos.

Os enterococos são microrganismos comensais de potencial limitado para produzir doença. Estas bactérias não possuem toxina potente ou enzima hidrolítica, como aquelas produzidas por outros microrganismos e, em geral, não dispõem de mecanismos para evitar a sua ingestão e destruição por células fagocíticas. Entretanto, devido a uma combinação de fatores de virulência, os enterococos são capazes de produzir doença grave.

O principal reservatório humano dos enterococos é o trato gastrointestinal, no entanto, ele pode ser encontrado com menos frequência na cavidade bucal, vesícula biliar, uretra e vagina (MURRAY, 1990; MOELLERING, 1992). As fezes de adultos saudáveis contêm altas concentrações de *Enterococcus faecalis* ($>10^6$ UFC/gr), enquanto que o *E. faecium* é encontrado em concentrações menores nas fezes, de aproximadamente 25% dos adultos saudáveis (HAYDEN et al, 1993).

Embora ainda existam controvérsias a respeito da virulência dos enterococos, estes patógenos são importantes no desenvolvimento da endocardite infecciosa, bacteremia, infecções do trato urinário, infecção de ferida cirúrgica e sepse neonatal (TRABULSI, 2004).

A importância do enterococo deve-se não somente a sua elevada frequência em infecções hospitalares nos últimos anos, mas também da sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos comumente utilizados. A pressão seletiva provocada pelo uso extensivo de cefalosporinas de amplo espectro, aminoglicosídeos e outros antimicrobianos com atividade limitada contra enterococos, tem permitido que esse patógeno sobreviva e prevaleça entre bactérias que colonizam o trato gastrointestinal de pacientes graves, imunossuprimidos e neutropênicos. Conseqüentemente, a ocorrência de infecções graves por enterococos tem aumentado progressivamente, principalmente em hospitais terciários, onde esse patógeno é responsável por um número importante de infecções que apresentam alta morbidade e mortalidade. Particularmente temível é a capacidade do enterococo de transferir genes a

espécies mais virulentas como por exemplo o estafilococo. As amostras de *E. faecium* tendem a ser mais resistentes aos antimicrobianos do que as amostras de *Enterococcus faecalis* (MURRAY, 1990).

Vários estudos têm demonstrado que a infecção de canais radiculares não-tratados (e com polpas necrosadas) caracteriza-se pela presença de uma microbiota mista e polimicrobiana, comumente em combinações de 4 a 7 espécies, predominantemente anaeróbica estrita, com um relativo equilíbrio entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium* são freqüentemente cultivadas de canais radiculares infectados (SUNDQVIST et al., 1989, SUNDQVIST 1992a,b; BAUMGARTNER, 1991; BAUMGARTNER e FALKER, 1991; SATO et al., 1993; GOMES, 1995; GOMES et al., 1994, 2004; SOUSA et al., 2003; JACINTO et al., 2003).

Engström (1964), investigando a presença de *Enterococcus spp.* nas infecções endodônticas, verificou que estavam presentes em 20,9% das amostras de dentes com tratamento endodôntico prévio, enquanto representavam 12,1% das amostras de polpas necrosadas. O autor ressaltou a dificuldade em eliminar esses microrganismos dos canais radiculares, constituindo um problema na terapêutica endodôntica.

Molander et al. (1998) analisaram o estado microbiológico de 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical visível radiograficamente. Os dentes estudados apresentavam-se assintomáticos, e com a obturação do canal apresentando uma distância máxima de 5 mm aquém do ápice radiográfico. Após a remoção do material obturador, levando em consideração a ação do clorofórmio, como solvente da guta-percha, um total de 117 cepas microbianas foi isolado, com 114 bactérias e 3 fungos. A maioria dos canais continha uma ou duas espécies bacterianas (85% dos casos). As bactérias anaeróbicas facultativas Gram-positivas predominaram, constituindo 69% das espécies isoladas. Os microrganismos isolados foram: *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, bacilos Gram-positivos anaeróbios, bacilos Gram-negativos facultativos, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* e *Candida spp.* O gênero bacteriano mais freqüentemente isolado foi o *Enterococcus*, presente em 47% dos canais com bactérias. Os autores

concluíram que a microbiota dos dentes tratados endodonticamente diferenciava, quantitativa e qualitativamente, dos dentes com polpas necrosadas.

Sundqvist et al. (1998) realizaram coletas microbiológicas de 54 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, porém com lesões periapicais visíveis radiograficamente. A técnica do retratamento foi executada sem o uso de solventes de guta-percha. O crescimento bacteriano foi detectado em 24 casos, sendo caracterizado por monoinfecções de microrganismos predominantemente Gram-positivos (87% das bactérias isoladas), com proporções quase iguais de bactérias anaeróbias facultativas (58%) e estritas (42%). Vários gêneros foram isolados, dentre eles os *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*. *Candida* spp. foi detectada em 2 casos. O *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüente, isolada em 38% dos canais radiculares.

Peciulienė et al. (2000) investigaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em 25 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com periodontites apicais visíveis radiograficamente. Microrganismos foram detectados em 20 dentes, e o *Enterococcus faecalis* estava presente em 70% dos casos com culturas positivas, geralmente em cultura pura ou como o principal componente da microbiota.

O *Enterococcus faecalis* também foi a bactéria mais freqüente, isolada em 30% dos canais radiculares nos estudos de Hancock et al, em 2001, quando analisaram a composição da microbiota presente em 54 dentes com insucesso no tratamento endodôntico. Detectou-se o crescimento em 34 casos (62,96%).

Peciulienė et al. (2001) investigaram a ocorrência de fungos, bacilos entéricos Gram-negativos e *Enterococcus* spp. em 40 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com periodontites apicais visíveis radiograficamente. Foi detectada a presença de microrganismos em 33 dentes, num total de 40. *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. estavam presentes em 21 canais (64% das culturas positivas), sendo o principal ou o único componente da microbiota em 19 casos. Todas as cepas foram identificadas como *Enterococcus faecalis*.

Gomes et al. (1995) investigaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em canais com polpas necrosadas e em canais de dentes com insucesso

no tratamento endodôntico, utilizando a cultura e o PCR. Nos 50 casos de insucesso, o *Enterococcus faecalis* estava presente em 21 (42%) casos pela cultura, e em 38 (76%) casos pela análise do PCR das mesmas amostras. Por outro lado, nos 50 casos de infecções primárias, os *Enterococcus faecalis* estavam presentes em 2 (4%) e 41 (82%) canais, respectivamente, pela cultura e PCR. Esses resultados mostraram que *Enterococcus faecalis* está presente em canais com polpas necrosadas, porém em quantidades bem pequenas, não detectáveis pelo método da cultura. Segundo os autores, o crescimento dessa espécie bacteriana pode ser favorecido por mudanças ecológicas no canal radicular, após o preparo químico-mecânico ou obturação deficiente, tornando possível sua detecção nas culturas microbiológicas nesses casos.

Os microrganismos encontrados nos dentes tratados endodonticamente são resultados de fatores de seleção que determinam a persistência das bactérias capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos e medicamentos utilizados na terapia endodôntica, e de sobreviver em um meio escasso de nutrientes (SUNDQVIST et al., 1998).

Pazelli, Freitas e Ito (2003) demonstraram por meio de cultura bacteriológica de 31 dentes, que a infecção em canais radiculares de dentes decíduos humanos portadores de necrose pulpar e lesão periapical é polimicrobiana, com grande quantidade de microrganismos, sendo mais freqüentemente encontrados estreptococos e microrganismos anaeróbios (96,7%)

Em 2003, Pinheiro et al. identificaram a flora microbiana presente nos canais radiculares de 60 dentes com insucesso no tratamento endodôntico e encontraram 83,3% de microrganismos Gram-positivos, sendo que dentre os anaeróbicos facultativos, os *Enterococcus faecalis* foram os mais freqüentes.

Em 2004, Rôças, Siqueira Jr. e Santos realizaram estudo através da Biologia Molecular para investigar a prevalência de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas e encontraram resultados significativos que comprovaram a presença de tais microrganismos nas infecções perirradiculares, principalmente nos casos assintomáticos. Os *Enterococcus faecalis* foram isolados em 67% (20/30) dos dentes com insucesso do tratamento endodôntico e em 18% (9/50) dos casos de infecção primária, sendo detectado principalmente em dentes assintomáticos.

No que se refere à terapêutica medicamentosa, os enterococos são pouco sensíveis à penicilina (MURRAY, 1990; SHEPARD & GILMORE, 2002). Estudos *in vitro*, testando os *Enterococcus faecalis*, mostram que as concentrações inibitórias mínimas da penicilina são 10 a 100 vezes maiores do que aquelas encontradas para a maioria dos *Streptococcus spp.* Embora eles sejam um pouco mais sensíveis à amoxicilina e à ampicilina, esses antibióticos têm apenas um efeito bacteriostático sobre a maioria dos *Enterococcus spp.* Por isso, para o tratamento de infecções enterocócicas sérias, uma terapia combinada de amoxicilina ou ampicilina associada à gentamicina é necessária para exercer ação bactericida (MORRISON et. al, 1997).

Em 2000, Dahlén et al. testaram a susceptibilidade antimicrobiana de 29 cepas de enterococos, os quais foram isolados após o uso de hidróxido de cálcio em canais radiculares. Todas as cepas encontradas eram sensíveis à vancomicina e à eritromicina, porém resistentes ao metronidazol. A maioria das cepas (25 – 86,2%) apresentou resistência à clindamicina. Foram também encontradas cepas de enterococos resistentes à benzilpenicilina, à ampicilina e à tetraciclina.

Love (2001) demonstrou que os *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo facilitar sua fuga aos procedimentos químicos-mecânicos. Esses microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio, medicamento comumente utilizado para descontaminação dos canais radiculares (HAAPASALO e ORSTAVIK, 1987).

Pinheiro et al. (2003) estudaram a susceptibilidade antimicrobiana de 10 cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de 30 canais com insucesso da terapia endodôntica. As autoras observaram que as cepas estudadas eram sensíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. No entanto, foi encontrada resistência bacteriana aos antibióticos eritromicina e azitromicina. Devido à resistência intrínseca dos enterococos à clindamicina, as autoras concluíram que os antibióticos utilizados tradicionalmente na Odontologia, como alternativos aos pacientes alérgicos a penicilinas, parecem ser de valor limitado contra os enterococos. Devido à predominância de *Enterococcus faecalis* em dentes com insucesso do tratamento endodôntico, drogas alternativas devem ser consideradas para profilaxia, em casos de risco de desenvolvimento de

endocardite infecciosa, durante o retratamento endodôntico. Recentemente, Figdor et al. (2003) demonstraram, *in vitro*, a capacidade do *Enterococcus faecalis* de suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes em um estado metabólico mínimo.

Os autores demonstraram a sobrevivência de um pequeno remanescente da população de *Enterococcus faecalis* na água (por 4 meses) e em meios com nutrientes limitados (por mais de 4 meses). Essas bactérias foram capazes de retornar ao crescimento após a adição de nutrientes. Todos esses fatores puderam contribuir para a alta prevalência desse microrganismo em dentes com tratamento endodôntico prévio, associado a lesões periapicais (SIQUEIRA e RÔÇAS, 2004).

Na endodontia, infecções crônicas geralmente não requerem terapia antibiótica, exceto durante uma exacerbação aguda. Lesões periapicais crônicas estão associadas a dentes com polpas necrosadas ou com tratamento endodôntico prévio, portanto, não possuem suprimento sanguíneo. Assim, quando um antibiótico é administrado por via sistêmica, a concentração do antimicrobiano que alcança o local de infecção, ou seja, o canal radicular, é insignificante e insuficiente para inibir o crescimento bacteriano (ABBOTT et al., 1990).

Segundo Pelczar Jr. et al (1997), os microrganismos podem ser divididos em três grupos, de acordo com a variação de temperatura na qual crescem melhor: são considerados psicrófilos, aqueles que normalmente crescem em baixas temperaturas, de 15 a 20°C, mesófilos são aqueles microrganismos que crescem em temperaturas moderadas, de 25 a 40°C e termófilos, os que crescem em altas temperaturas de 103 a 110°C.

2.3. Mecanismo de injúria bacteriana pela baixa temperatura

No que se refere a terapias alternativas de destruição de bactérias, a literatura especializada é escassa em relatos que demonstram tais métodos. O congelamento, seguido pelo descongelamento é uma das formas onde se pode conseguir essa destruição.

São raros os relatos clínicos e experimentais sobre o uso do *spray* de N₂ líquido para a destruição de bactérias pelo resfriamento/aquecimento brusco. Desses poucos relatos, a maioria descreve os agentes criogênicos no

sentido de preservar bactérias, assim como se preservam sêmen e embriões. Outros, demonstram o uso do frio intenso com a finalidade de evitar a proliferação bacteriana e de outros microrganismos.

Outros estudos que demonstram o mecanismo de injúria às bactérias pelo frio estão restritos a relatos publicados na década de 70 (RAY e SPECK, 1973). Pesquisas realizadas no fim do século XIX e início do século XX foram conduzidas de forma a estimar a viabilidade do crescimento bacteriano em alimentos, após o congelamento e descongelamento.

A disponibilidade do nitrogênio líquido, durante esse período, tornou possível aos pesquisadores explorar os efeitos da baixa temperatura (tão baixa quanto -190°C) na sobrevivência de bactérias (RAY e SPECK, 1973).

Em 1884, Pictet e Yung (*apud* RAY e SPECK, 1973) congelaram suspensão de várias culturas bacterianas a -120°C e armazenaram por 36 h. Eles observaram que, após o descongelamento, as bactérias sobreviveram e retomaram o crescimento.

Em 1900, MacFayden (*apud* RAY e SPECK, 1973) relatou que o congelamento a -190°C por 20 h, as culturas bacterianas não apenas sobreviveram, mas também preservaram suas características bioquímicas e propriedades patogênicas. Gradualmente, isso se tornou aparente para os pesquisadores da área, que nem todas as espécies de bactérias sobrevivem quando congeladas e igualmente descongeladas. Dessa forma, o congelamento não poderia ser utilizado, em longo prazo, para preservar culturas bacterianas, a menos que métodos aperfeiçoados fossem desenvolvidos. Outros estudos foram realizados com a finalidade de se entender o mecanismo de como o congelamento e descongelamento produziram efeito letal nas células bacterianas. Isso provavelmente iniciou uma estimativa da letalidade produzida pelo ciclo congelamento-descongelamento nas bactérias.

Os efeitos do congelamento e descongelamento na perda da viabilidade da célula bacteriana, sob condições variadas, foram testadas para explicar o mecanismo da morte bacteriana causada pelo congelamento. Isso possibilitou demonstrar que as bactérias diferem na sua sensibilidade ao congelamento e descongelamento, de acordo com linhagem, espécie, idade, condição de crescimento, natureza do meio de cultura, condições do congelamento e descongelamento e muitos outros (RAY e SPECK, 1973).

Na literatura, são poucos os estudos que demonstram a sensibilidade de bactérias ao frio intenso, especialmente com os *Enterococcus faecalis*.

Em 1976, Calcott, Lee e MacLeod relataram que a maioria das bactérias testadas são sensíveis ao congelamento e descongelamento. Quando armazenadas em solução salina e submetidas ao congelamento-descongelamento, bactérias como o *Azotobacter chroococcum*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus faecalis* perderam sua “viabilidade” quando comparadas àquelas armazenadas somente em água.

Segundo Pelczar (1965), a parede celular é um envoltório de proteção que reveste a membrana celular bacteriana, localizada abaixo das substâncias extracelulares, como o são as cápsulas, e na periferia de uma membrana delicada que está em contato direto com o citoplasma; é uma estrutura rígida que dá forma à célula. A rigidez da parede celular é facilmente demonstrada, quando se submete a bactéria a condições físicas rigorosas, tais como pressões osmóticas, quer muito baixas quer elevadas, ou temperaturas inferiores à de congelamento seguido de descongelamento rápido, apesar disto conservando a sua forma original.

Ray e Speck (1973) descrevem o mecanismo de injúria causada pelo congelamento de bactérias. Eles afirmam que as manifestações causadas pela baixa temperatura podem ser do tipo letal ou não-letal para as bactérias. Naquelas onde a injúria não foi letal, pode haver a perda da viabilidade em se multiplicar. Acreditam que a lise celular pelos cristais de gelo no seu interior seria o fator responsável pela perda da sua viabilidade.

Esses autores descrevem os fatores que podem estar relacionados com a injúria bacteriana e citam:

- a. Perda da habilidade para se multiplicar;
- b. Extravasamento do material celular;
- c. Aumento da necessidade nutricional;
- d. Fase demorada de recuperação;
- e. Aumento da sensibilidade à radiação;
- f. Natureza da injúria por congelamento;
- g. Alterações grosseiras na sua morfologia;

- h. Alterações estruturais sutis:
- na membrana celular;
 - na parede celular;
 - nos ácidos nucléicos;
 - nas proteínas;
- i. Alterações nas funções celulares:
- atividade enzimática;
 - patogenicidade;
 - respiração;
 - oxidação fosforilativa;
 - aglutinação ácida;
 - mobilidade;
- j. Alterações na estabilidade genética.

Segundo Dubos (1937), quando *Diplococcus pneumoniae* são congelados e em seguida, descongelados em alta temperatura, lisam-se rapidamente, provavelmente devido à ativação de algum mecanismo autolítico dentro da célula.

Segundo relatam Pelczar et al (1997),

algumas bactérias psicrófilas podem crescer a 0°C, porém temperaturas abaixo de 0°C inibirão o metabolismo dos microrganismos em geral. O congelamento é comumente utilizado para preservar alimentos, drogas e espécimes laboratoriais, porque bloqueia efetivamente o crescimento microbiano. (Um freezer doméstico mantém temperaturas de -20°C.) Entretanto, temperaturas abaixo de zero não podem matar os microrganismos e, desta maneira, conseguem preservá-los por um longo tempo em materiais congelados. Este fenômeno tem sido utilizado pelos microbiologistas para a manutenção indefinida dos microrganismos. Culturas-estoque são congeladas em freezer a -70°C, ou em nitrogênio líquido a -196°C. Estas culturas não sofrerão alterações genéticas ao longo do tempo nem contaminação com outros microrganismos. Tal estabilidade permite aos pesquisadores padronizar seus experimentos e preservar culturas específicas para experimentos futuros.

Altas ou baixas temperaturas realizam um papel importante no controle dos microrganismos.

Por outro lado, segundo relata Mazur (1970), para entender o mecanismo de injúria pelo frio em bactérias, é necessário reconhecer as várias mudanças físicas, químicas e bioquímicas que ocorrem na célula bacteriana e seu meio-ambiente durante o congelamento e descongelamento. Durante o congelamento, como a temperatura da suspensão bacteriana cai abaixo de 0°C, o meio externo inicialmente se torna muito frio e então, começa a congelar-se e pela formação de cristais de gelo. A temperatura em que inicia o congelamento é determinada pela natureza e pela concentração do soluto no meio em que se encontra. Como a água da célula pode permanecer gelada até a temperatura atingir -10 a -15°C, abaixo dessa temperatura, o congelamento ocorre somente no meio externo. Isso pode ser devido a diferença de pressão entre os lados de dentro e de fora da bactéria, sendo menor no lado de fora e maior no lado de dentro. O sistema tende a estabelecer um equilíbrio pelo congelamento da água intracelular e isso pode ocorrer de duas formas: pela remoção de água da célula e congelando-a extracelularmente ou por congelamento da água intracelularmente. O equilíbrio é estabelecido então, no primeiro caso, pela desidratação e no segundo, por nucleação espontânea ou pelo crescimento de cristais de gelo externos através dos canais da membrana.

A membrana da célula atua, normalmente, como uma barreira contra a passagem de cristais de gelo, mas a -10°C ou abaixo disso, ela cessa tal propriedade. Esses canais se tornam congelados e isso leva ao congelamento da água intracelular. Os meios pelos quais as células estabelecem equilíbrio dependem principalmente da velocidade de congelamento e da permeabilidade da membrana à água. Se a velocidade for alta, ou seja, se o congelamento for rápido ou se a permeabilidade da membrana for baixa, a célula irá congelar pela formação de gelo intracelular. Contrariamente, se a velocidade de congelamento for lenta ou se a permeabilidade da membrana à água é elevada, a célula irá congelar pela formação de cristais de gelo extracelulares.

A quantidade de água que pode sofrer congelamento já foi determinada: bactérias como *Escherichia coli* contém cerca de 90% de água livre. À temperatura de -15 a -20°C e abaixo disso, cerca de 90% de toda essa água congela. Um congelamento rápido produz pequenos cristais de gelo no interior da célula. Esses cristais são instáveis, tendendo a aumentar de tamanho e, com o

tempo, aumentar pela recristalização, que pode ocorrer a -100°C e durante o descongelamento. O fenômeno de congelamento pela formação de gelo intra e extracelular, assim como a recristalização do gelo intracelular foi verificada por microscopia eletrônica em *Escherichia coli*, por Nei, Araka e Matsusaka (*apud* RAY e SPECK, 1973). Células congeladas lentamente encolheram, porém não mostraram sinais de cristais de gelo. Por outro lado, aquelas que sofreram um congelamento rápido, não alteraram suas dimensões, mas continham numerosas cavidades intracelulares, provavelmente ocupadas por pequenos cristais de gelo. Células que foram congeladas rapidamente a -150°C e armazenadas a -25°C por 3 dias, mostraram apenas poucas e largas cavidades intracelulares.

Se células bacterianas congelam pela formação de gelo intracelular ou por desidratação, o congelamento remove a água tanto do meio externo quanto do meio interno e aumenta a concentração de solutos tanto dentro quanto fora da célula. O pH do ambiente pode diminuir consideravelmente e causar a precipitação de solutos de alto e baixo peso molecular. A concentração aumentada de solutos, especialmente os reagentes, podem aumentar a velocidade de várias reações químicas, mas isso pode ser compensada pela baixa temperatura. Os cristais de gelo formados durante o congelamento, especialmente durante a recristalização pode produzir dano à membrana da célula. Uma alta concentração de eletrólitos, produzido pelo congelamento, afeta a membrana lipídica e causa um “rombo” nessa membrana (RAY e SPECK, 1973).

Alterações no pH podem afetar secundariamente as estruturas de macromoléculas celulares como DNA, RNA e proteínas, além de causar desnaturação de muitas delas. Algumas dessas alterações podem ser irreversíveis (MAZUR, 1966). Sais concentrados que resultam do congelamento provavelmente dissociam partículas de proteínas da membrana, alterando sua função.

Durante o aquecimento, ou seja, no descongelamento, como a água começa a aparecer no ambiente externo à célula, o equilíbrio entre a concentração de solutos dentro e fora da célula é novamente perturbado. O equilíbrio é restabelecido rapidamente, pelo derretimento da quantidade de gelo requerida dentro da célula se o congelamento foi intracelular, ou pelo influxo de água para dentro da célula, em velocidade primariamente controlada pela

permeabilidade da membrana, se o congelamento ocorreu por desidratação. O equilíbrio da concentração de soluto durante o descongelamento é restabelecido rapidamente, especialmente em células com permeabilidade de membrana alterada (WEISTER e OSTERUD, 1945).

Muitas teorias têm sido propostas para explicar a morte de células bacterianas pelo congelamento. Uma delas foca o esmagamento e a perfuração mecânica da célula pelos cristais de gelo formados durante o congelamento. Altas taxas de mortalidade obtidas pelo congelamento de células em água foram propostas com base para essa teoria. Os pesquisadores sugeriram que a intensidade da temperatura do congelamento não foi importante para a letalidade, e que abaixo do ponto de congelamento não havia nenhuma temperatura crítica onde o efeito letal fosse muito maior. Acreditava-se que durante o congelamento, os cristais de gelo intracelulares não se formavam e que a formação de gelo extracelular era a principal causa de morte da célula (WEISTER e OSTERUD, 1945).

Harrison, em 1956 (*apud* RAY e SPECK) contradisse essa opinião pela demonstração de que a morte de bactérias ocorria a -22°C tanto em suspensões congeladas quanto em suspensões demasiadamente frias, porém não solidificadas. Ele havia sugerido que a morte bacteriana por congelamento estava relacionada com os solutos não solidificados, a água que estava congelando e formando cristais de gelo, as células se tornaram expostas a solutos concentrados. O grau de letalidade dependia da composição dos solutos: o NaCl era mais letal do que o glicerol.

Outros autores têm sugerido que a principal causa da morte por congelamento em bactérias é a formação de gelo intracelular. Essa teoria foi sugerida por estudos com microscopia eletrônica através de cortes congelados e não congelados de *Escherichia coli* (NEI, ARAKA E MATSUSAKA, *apud* RAY e SPECK, 1973).

Células congeladas rapidamente mantinham sua forma original e continham cavidades possivelmente ocupadas por pequenos cristais de gelo. Um rápido congelamento produziu maior taxa de mortalidade de células. Em contraste, células congeladas lentamente reduziram de tamanho, tornaram-se irregulares e não possuíam cavidades, mas tinham uma alta taxa de sobrevivência. Embora as células bacterianas possam perder água rapidamente,

devido a sua alta relação entre superfície e volume, fatores como a baixa permeabilidade à água e uma elevada velocidade de congelamento podem forçar a célula a reter uma quantidade de água suficiente para produzir gelo intracelular.

Mazur, em 1966, sugeriu vários fatores que atuam causando injúria na célula bacteriana. Esses fatores, já mencionados, incluem a baixa temperatura, formação de cristais de gelo extra ou intracelulares e concentração de solutos intra e extracelulares. Ainda não se sabe se a injúria é devida a um desses fatores apenas ou à combinação de mais de um deles.

Evidências experimentais sugerem alguns importantes fatores técnicos: assim, se a (extrema) baixa temperatura é letal, a morte pode ocorrer em suspensões congeladas ou extremamente frias, porém não solidificadas. Similarmente, a velocidade do resfriamento, temperatura de congelamento, velocidade do aquecimento (descongelamento) e tempo de armazenamento não terão nenhum efeito se a letalidade é devida ao gelo externo (desidratação) (WEISTER e OSTERUD, 1945; MAZUR, 1966; RAY e SPECK, 1973).

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

Esta pesquisa foi idealizada de acordo com o capítulo XIV, art. 94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e em todas as etapas dessa pesquisa foram respeitados rigorosamente os Princípios de Biossegurança.

3.1. Aprovação no comitê de ética

Este trabalho foi realizado após aprovação do seu projeto de pesquisa pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS, mediante protocolo nº 0081/05 (ANEXO A).

3.2. Delineamento da pesquisa

Esta pesquisa apresenta uma abordagem experimental, situa-se no paradigma tradicional quantitativo, classificando-se como um estudo quase experimental – delineamento de amostras temporais equivalentes, que apresenta o seguinte diagrama, segundo Campbell e Stanley (1979):

X₁O X₀O X₂O X₃O X₄O X₅O

X = Grupo experimental

O = Observação

3.3. Hipótese:

A queda brusca de temperatura provocada pelo *spray* de N₂ líquido reduz o crescimento de bactérias cultivadas e semeadas em meios de cultura.

3.4. Procedimentos metodológicos

3.4.1. Linhagem

A linhagem referência utilizada no presente estudo foi a de *Enterococcus faecalis* (ATCC 19.433)², obtida e ativada no laboratório de Microbiologia (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) da PUCPR (Curitiba/PR).

3.4.2. Cultivo e preparo do inóculo

A etapa experimental dessa pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia (Departamento de Patologia Básica – Setor de Ciências Biológicas) da UFPR (ANEXO B).

As bactérias foram cultivadas por repique, pela técnica de esgotamento por estrias (PELCZAR et al., 1997), em meio de cultura ágar-sangue (Fig.1) e incubadas por 24 h, a 36°C ($\pm 1,5^\circ\text{C}$).

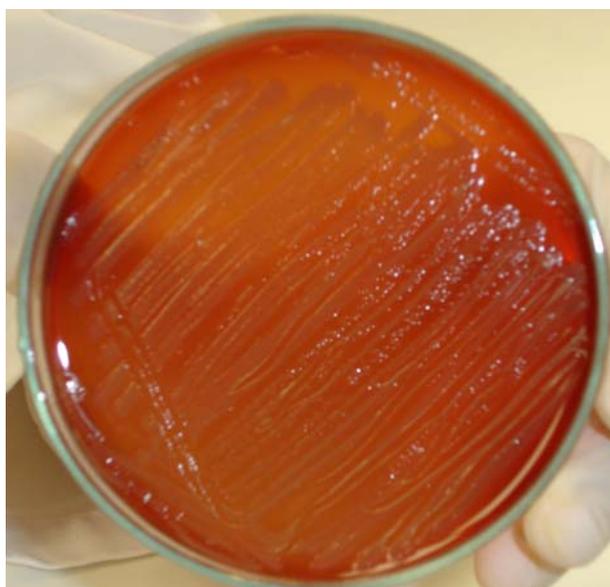


Fig. 1 – *Enterococcus faecalis* (ATCC 19.433) cultivadas em ágar-sangue – após 24 h de incubação a 36°C.

² NEWPROV – Pinhais/PR – Brasil

O inóculo inicial foi preparado a partir da transferência de três alçadas provenientes da cultura de *Enterococcus faecalis*, em ágar-sangue, para um tubo contendo 10 mL de solução de NaCl a 0,9% (soro fisiológico) esterilizada.

Após a diluição, realizou-se a homogeneização sob agitação do tubo, por 10 segundos. A suspensão obtida foi diluída em solução salina a tal ponto que ficasse com a mesma turbidez que o tubo 1 da Escala de Mac Farland, controlada por análise espectrofotométrica³.

A escala de Mac Farland consiste numa série de 10 tubos de diâmetro uniforme contendo os produtos da reação de diferentes volumes de BaCl₂ a 1% misturados a diferentes volumes de H₂SO₄ a 1%. Dessa forma, obtém-se uma série de tubos contendo volumes iguais de uma suspensão de turbidez crescente, em correspondência com a quantidade de BaSO₄ que se forma. O grau de turbidez em cada tubo corresponde a determinada concentração bacteriana, conforme demonstrado na tabela 1.

TABELA 1 – Valores da escala de Mac Farland, em relação ao número e a composição do tubo e sua correspondência em número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL).

Tubo nº	Composição (em mL)		Concentração bacteriana em milhões/mL
	BaCl ₂ a 1%	H ₂ SO ₄ a 1%	
0	0	10	0
1	0,1	9,9	3,0 X 10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0 X 10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0 X 10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2 X 10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5 X 10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8 X 10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1 X 10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4 X 10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7 X 10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0 X 10 ⁹

Fonte: *BIER, 1990*.

³ Espectrofotômetro digital *Thermo Spectronic* – Genesys 10 uv. (ANEXO C)

A figura 2 representa, os valores de absorvância dos tubos da escala de Mac Farland, encontrados na espectrofotometria.

A suspensão obtida apresentou portanto, uma concentração bacteriana estimada em 300.000.000 (3×10^8) células/mL.

Logo após, foi realizada uma diluição de 1:1, ou seja, 5 mL da suspensão inicial foram adicionados em 5 mL de soro fisiológico esterilizado e homogeneizado sob agitação durante 10 segundos. Dessa forma, foi obtido um volume final igual a 10 mL de suspensão de *Enterococcus faecalis* com uma concentração de aproximadamente 150.000.000 por mililitro ($1,5 \times 10^8$ bactérias/mL).

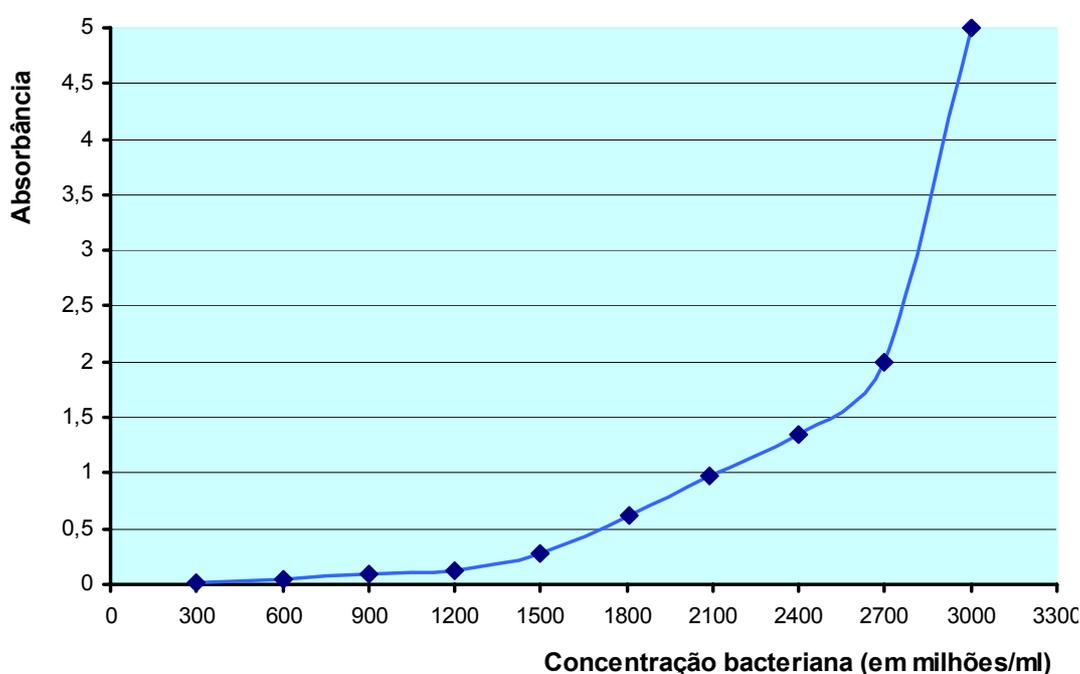
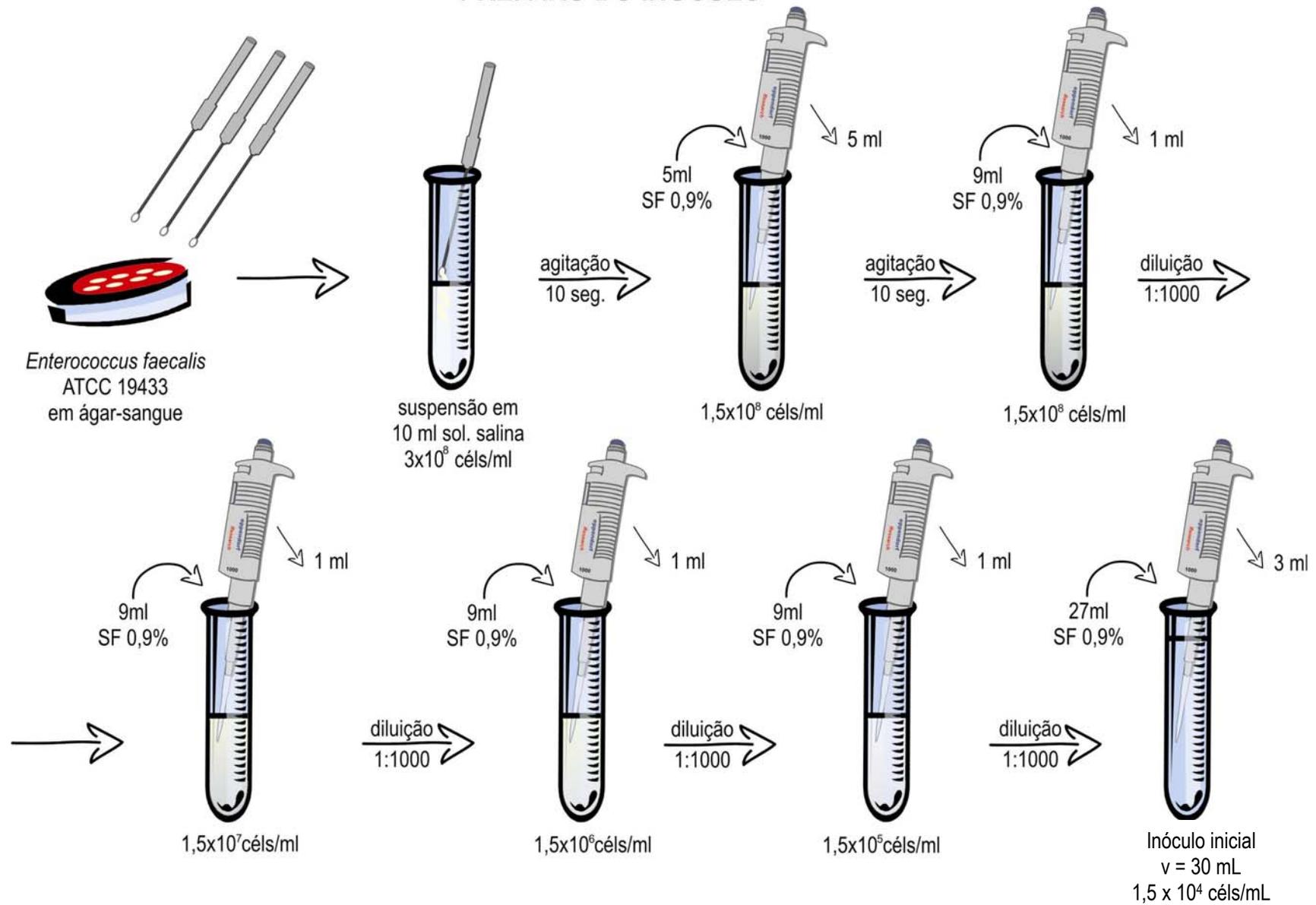


Fig. 2 – Representação dos valores de absorvância da escala de Mac Farland, correspondentes à concentração bacteriana nos diversos tubos.

Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*

Em seguida, foram realizadas 4 diluições sucessivas de 1:1000, sendo que na primeira, 1 mL dessa suspensão foi adicionado a 9 mL de soro fisiológico, diminuindo a concentração para $1,5 \times 10^7$ bactérias/mL. Nas outras, o mesmo procedimento foi adotado, sempre diluindo a suspensão anterior, e na última, 3 mL foram diluídos em 27 mL de soro fisiológico. Assim, obteve-se o inóculo inicial contendo 30 mL de suspensão com aproximadamente 15.000 células bacterianas por mililitro ($1,5 \times 10^4$ bactérias/mL) – fig. 3.

PREPARO DO INÓCULO



3.4.3. Classificação dos grupos x tratamento

Como forma de padronização, cada grupo recebeu a aplicação do N₂ líquido⁴ durante 30 segundos, tempo necessário para que a suspensão (inóculo) ficasse totalmente congelada. A aplicação do *spray* foi realizada através de uma ponta de abertura circular de 0,57 mm de diâmetro acoplada numa sonda aberta e angulada (modelo 309 – Brymill[®]) conectada em aparelho criogênico Cry-AC[®] (Osasco/SP – Brasil) – fig. 4.

A distância entre o inóculo contido no frasco e o orifício de saída do *spray* era de 7,5 cm (ANEXO D).

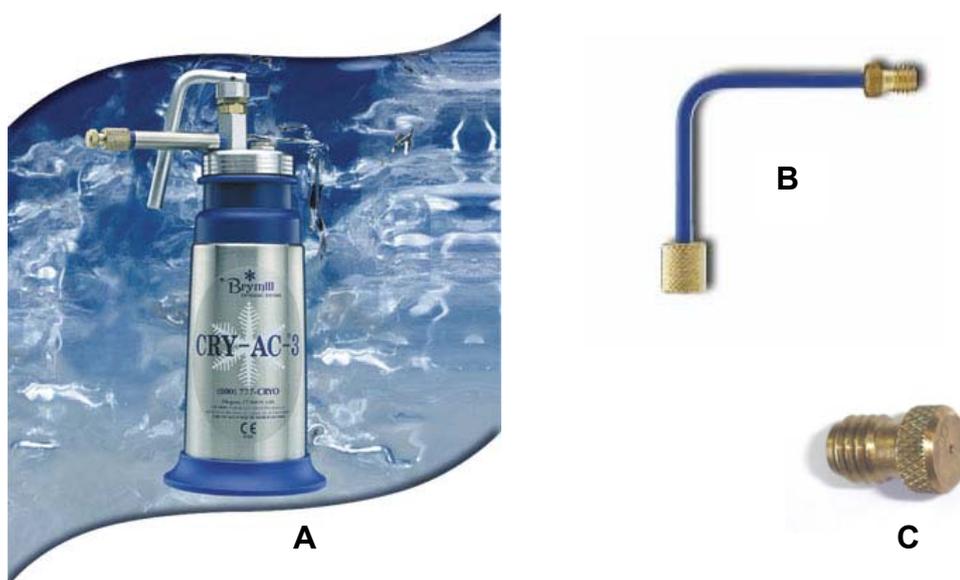


Fig. 4. A – Aparelho criogênico e acessórios utilizados: A – CRY-AC[®] (*Cry-Ac do Brasil*); B – ponta com adaptador em ângulo reto (modelo #309) e C – ponta com abertura de 0,57 mm de diâmetro.

A partir do inóculo inicial, um volume de 4mL foi pipetado⁵ e transferido para cinco frascos de vidro⁶ esterilizados, que correspondiam aos cinco grupos (controle-positivo e experimentais), de acordo com o tratamento assim instituído:

- a. O **grupo 1** não recebeu tratamento e foi denominado grupo controle-positivo;
- b. No **grupo 2**, foi realizada uma aplicação do *spray*;

⁴ Produto fabricado pela *White Martins Gases Industriais Ltda.*, com 99,9% de grau de pureza, e adquirido junto à *Nitrosêmen Produtos Agropecuários Ltda.* (Curitiba/PR – Brasil).

⁵ 100 – 1000 µL (EPPENDORF[®])

⁶ Dimensões: altura = 7 cm; diâmetro da largura = 3 cm; diâmetro da abertura superior = 1,3 cm

c. No **grupo 3**, foram realizadas duas aplicações do *spray*, com intervalo de 8 minutos entre elas, tempo necessário para o descongelamento total da suspensão;

d. No **grupo 4**, foi realizada uma aplicação e, em seguida, o frasco de vidro foi mergulhado (banho-maria) numa cuba de aço inoxidável, contendo 100 mL de água a 50°C, para acelerar o descongelamento.

e. O **grupo 5** recebeu duas aplicações, com intervalo de 2 minutos entre elas, sendo que logo após as aplicações, o frasco foi descongelado em banho-maria a 50°C.

f. Para o **grupo 6**, denominado controle-negativo, utilizou-se o mesmo protocolo que do grupo 3, porém a suspensão bacteriana foi substituída por soro fisiológico esterilizado.

Na tabela 2, pode-se verificar a distribuição dos grupos e os protocolos utilizados.

TABELA 2 – Distribuição dos grupos e respectivos protocolos de tratamento

Grupo	Nº de tubos	Protocolo estabelecido	Tempo de descongelamento
1	30	nenhum (grupo controle-positivo)	–
2	30	1 aplicação sem aquecimento	–
3	30	2 aplicações sem aquecimento	8 minutos
4	30	1 aplicação com aquecimento	–
5	30	2 aplicações com aquecimento	2 minutos
6	30	2 aplicações (em SF 0,9%) sem aquecimento	8 minutos

Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*

A figura 5 representa um esquema ilustrativo de todos os procedimentos descritos.

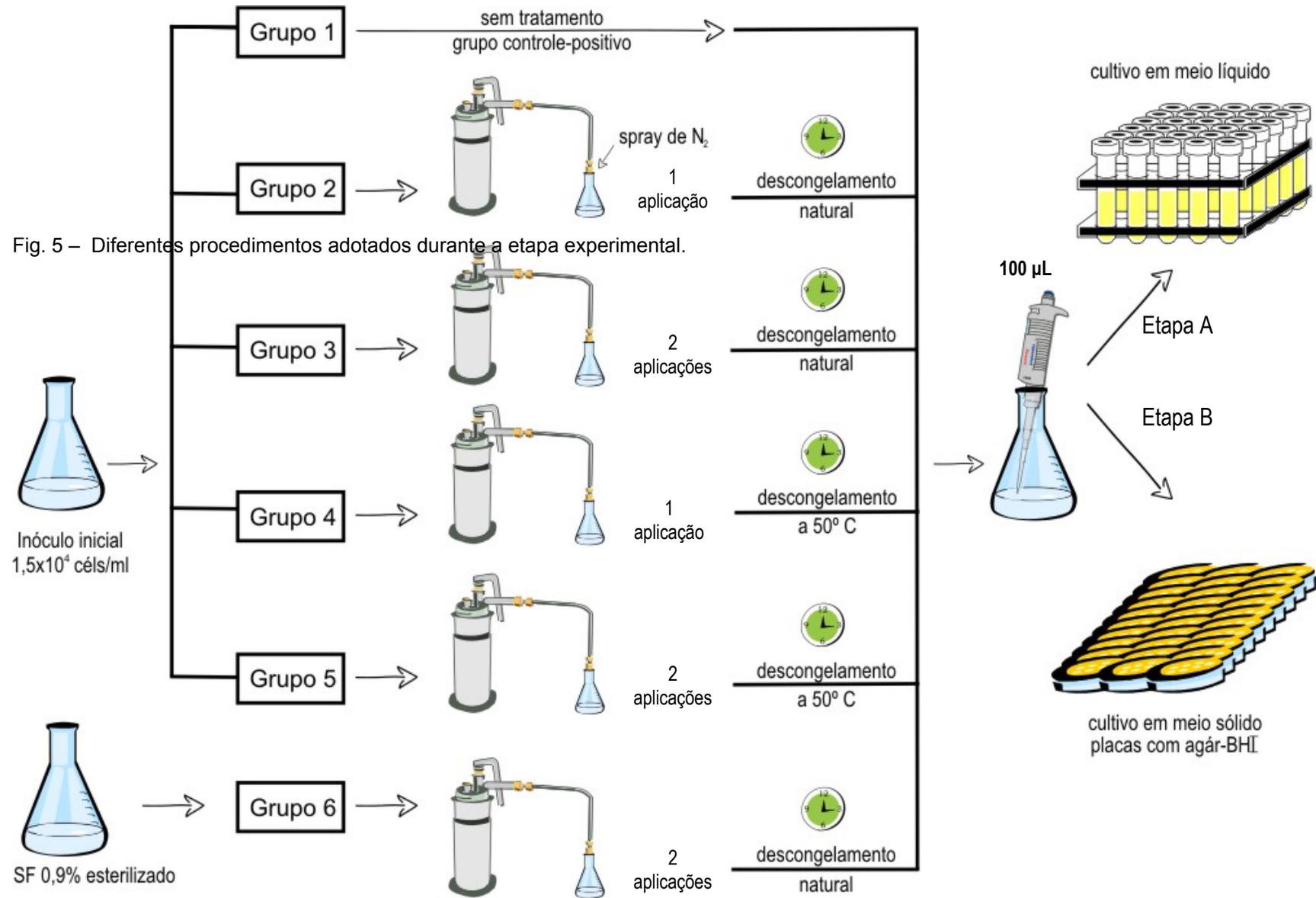


Fig. 5 – Diferentes procedimentos adotados durante os experimentos.

3.4.4. Avaliação do crescimento de *Enterococcus faecalis* em meio líquido caldo BHI

Após os respectivos tratamentos, 100 μ L foram capturados com uma micropipeta calibrada⁷ de cada um desses frascos pertencentes aos diferentes grupos e em seguida, inoculados em tubos contendo 4 ml caldo BHI (fig. 5 – grupos 1 a 5 \rightarrow etapa A e fig. 6). Cada grupo possuía um total de 30 tubos, devidamente identificados. Logo após, os tubos foram agitados para homogeneização durante 10 segundos e levados para incubação a 36°C (\pm 1,5°C) – ANEXO E.



Fig. 6 – Caldo BHI⁸ em tubos de ensaio com tampa rosqueável.

Após 24 h de incubação, foi realizada a aferição do crescimento bacteriano, utilizando-se os valores de absorbância obtidos em cada tubo, mediante análise espectrofotométrica, com o comprimento de onda padronizado em 550 nm.

⁷ Ponteiras com filtro 100 – 1000 μ L (FINETIPS[®]) – esterilizados por óxido de etileno.

⁸ NEWPROV[®] – Pinhais – PR/Brasil (volume = 4 mL/tubo)

3.4.5. Avaliação do crescimento de *Enterococcus faecalis* em meio sólido ágar-BHI

Os tratamentos foram novamente realizados, de acordo com os respectivos grupos e, em seguida, 100 µL foram pipetados e transferidos para o meio de cultura ágar-BHI contido nas placas de Petri. O inóculo foi espalhado na superfície do meio pela técnica de semeadura em superfície (PELCZAR et al, 1997) – ANEXO F.

Para cada grupo, 30 placas receberam o inóculo devidamente tratado, de acordo com seu grupo, totalizando 180 placas. A seguir, as placas foram devidamente identificadas e incubadas a 36°C ($\pm 1,5^\circ\text{C}$) durante 24 h. (fig. 5 – grupos 1 a 6 → etapa B).

Após a incubação, as placas foram submetidas à leitura dos resultados. A avaliação do crescimento foi realizada pela contagem do número de colônias (UFC/µL), utilizando-se o método visual.

Numa terceira etapa, todo o procedimento foi repetido, desde o preparo do inóculo inicial (fig. 3), até a semeadura na superfície do meio ágar-BHI, sendo que novos protocolos de tratamento foram idealizados.

A tabela 3 resume os protocolos estabelecidos para os novos cultivos em meio sólido ágar-BHI.

TABELA 3 – Distribuição dos grupos e respectivos protocolos de tratamento com *spray* de N₂ líquido.

Grupo	Nº de placas	Protocolo estabelecido (<i>spray</i> de N ₂ líquido)	Tempo de descongelamento
7	10	nenhum (grupo controle-positivo)	–
8	10	2 aplicações de 60 segundos	1,5 minuto
9	10	2 aplicações de 90 segundos	1,5 minuto
10	10	2 aplicações de 120 segundos	2 minutos
11	10	2 aplicações de 120 segundos + 2 aplic. de 120 segundos 12 horas após	2 minutos
12	10	2 aplicações de 120 seg (em SF 0,9%) – (grupo controle-negativo)	1,5 minuto

Fonte: *Dados da pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005*

Em todos os grupos, foi realizado o aquecimento do frasco, em banho-maria (50°C) imediatamente após a aplicação do N₂ líquido. Em seguida, realizou-se a inoculação em meio sólido ágar-BHI, também por semeadura em superfície.

3.4.6. Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/μL)

O número total de colônias foi estimado, mediante regra de três simples, baseando-se pelo número de unidades formadoras de colônias na área central, a partir de uma circunferência de 1,5 cm de diâmetro (d), no centro da placa de Petri, cujo diâmetro (D) media 9,0 cm (fig. 7).

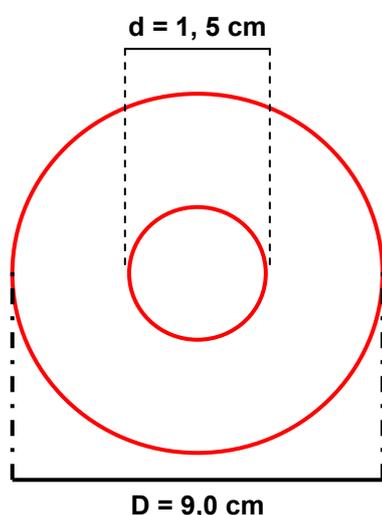


Fig. 7 – Representação do procedimento de contagem do número de UFC/μL, para a estimativa do número de colônias de *E. faecalis* na superfície do meio ágar-BHI.

3.4.7. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística, mediante testes paramétricos⁹ ANOVA, Tukey-HSD e Games-Howell, sendo esses dois últimos para comparações múltiplas.

⁹ Software SPSS 13.0 for Windows, licenciado para o Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCPR.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do crescimento de *E. faecalis* em meio líquido

Após 24 h de incubação, foi realizada a avaliação do crescimento bacteriano em caldo BHI, por meio de espectrofotometria. Os resultados foram expressos em valores de absorbância para cada tubo e estão apresentados na tabela 4.

TABELA 4 – Distribuição dos valores de absorbância para *E. faecalis* em caldo BHI, após 24 h de incubação a 36°C. Análise por espectrofotometria.

Nº	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
1	1,422	1,439	1,448	1,436	1,434	0
2	1,433	1,417	1,406	1,371	1,435	0
3	1,474	1,453	1,429	1,376	1,367	0
4	1,425	1,429	1,325	1,419	1,428	0
5	1,451	1,373	1,414	1,433	1,43	0
6	1,446	1,383	1,396	1,419	1,344	0
7	1,445	1,386	1,385	1,419	1,434	0
8	1,474	1,458	1,435	1,419	1,426	0
9	1,456	1,456	1,425	1,422	1,345	0
10	1,428	1,474	1,325	1,436	1,434	0
11	1,439	1,456	1,305	1,373	1,354	0
12	1,427	1,422	1,398	1,376	1,344	0
13	1,433	1,402	1,428	1,371	1,34	0
14	1,458	1,433	1,456	1,322	1,434	0
15	1,447	1,458	1,433	1,337	1,435	0
16	1,446	1,474	1,425	1,322	1,367	0
17	1,433	1,396	1,435	1,371	1,364	0
18	1,466	1,401	1,438	1,376	1,358	0
19	1,474	1,458	1,425	1,385	1,344	0
20	1,455	1,433	1,458	1,329	1,443	0
21	1,433	1,425	1,414	1,325	1,445	0
22	1,458	1,437	1,474	1,374	1,398	0
23	1,456	1,458	1,396	1,376	1,367	0
24	1,433	1,474	1,414	1,378	1,428	0
25	1,433	1,496	1,429	1,345	1,435	0
26	1,458	1,456	1,406	1,356	1,428	0
27	1,457	1,458	1,419	1,419	1,405	0
28	1,458	1,575	1,448	1,346	1,355	0
29	1,593	1,474	1,428	1,348	1,339	0
30	1,476	1,373	1,423	1,419	1,328	0

Fonte: Dados da pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS, 2005.

Os resultados da tabela 4 foram obtidos a partir da comparação do grau de turbidez dos tubos da amostra (fig. 8) com os da escala de Mac Farland e os valores médios de absorvância estão representados na figura 9.



Fig. 8 – Resultados obtidos com o cultivo em meio líquido – caldo BHI: **A** – tubo do grupo controle-negativo (grupo 6); **B** – tubo do grupo controle-positivo (grupo 1); **C** – tubo do grupo experimental 5; **D** – tubo do grupo experimental 11.

Fig. 9 – Representação dos valores médios da absorvância, obtida por análise espectrofotométrica, segundo os grupos experimentais e controle-positivo.

Para o grupo 6, não houve alteração da turbidez, o que significa que não houve crescimento de bactérias.

Na tabela 5, foram apresentados os resultados da análise estatística descritiva, realizada a partir dos valores da espectrofotometria (expressos em absorbância) segundo os diferentes grupos de tratamento utilizados.

TABELA 5 – Análise estatística descritiva da absorbância obtida em análise espectrofotométrica, segundo os grupos.

GRUPOS	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	C.V.(%)
1	1,422	1,593	1,453	0,031	0,006	2,123
2	1,373	1,575	1,441	0,041	0,008	2,878
3	1,305	1,474	1,415	0,038	0,007	2,700
4	1,322	1,436	1,380	0,036	0,007	2,643
5	1,328	1,445	1,393	0,042	0,008	2,982

Fonte: *Análise estatística, PUCRS, 2005.*

C.V. – coeficiente de variabilidade

De acordo com os valores da tabela 5, pôde-se observar que os grupos apresentaram valores médios de absorbância muito próximos entre si. Assim sendo, todos os grupos foram considerados homogêneos com relação à turbidez, uma vez que o coeficiente de variação de *Pearson* foi menor que 30% (em torno de 3%), o que significa que os valores da amostra estão concentrados em torno da média. Analisando-se os diferentes grupos, observou-se que os valores médios diminuem gradativamente do grupo 1 em relação ao grupo 4, com discreto aumento do grupo 4 para o grupo 5 (fig. 9)

O teste de análise de variância (ANOVA) foi aplicado com a finalidade de verificar se os valores médios de turbidez diferiam entre os grupos e foi constatada uma diferença estatisticamente significativa.

Com o intuito de elucidar em quais grupos essa diferença estava presente, foram aplicados dois outros testes: o teste de comparações múltiplas de Tukey–HSD (admitindo variâncias homogêneas) e o teste de Games-Howell (admitindo variâncias heterogêneas), sendo que ambos conduziram aos mesmos resultados: O grupo controle positivo (Grupo 1) mostrou diferença significativa em relação aos grupos 3, 4 e 5. Quando se comparou a variável “número de ciclos”, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos 2 e 3, nem entre os grupos 4 e 5 ($p < 0,05$).

Quando foi analisada a variável “presença ou não de aquecimento”, foi observada diferença significativa entre os grupos 2 e 4, mas não entre os grupos 3 e 5.

Quando foram analisados os grupos controle-positivo e experimentais, não foi verificada diferença significativa apenas entre o grupo controle-positivo e o grupo 2 (1 ciclo sem aquecimento), demonstrando assim que este ciclo não alterou o crescimento bacteriano em meio líquido.

4.2. Avaliação do crescimento de *E. faecalis* em meio sólido

De acordo com o cultivo utilizando-se o meio sólido ágar-BHI, observou-se, após 24 h de incubação, a formação de colônias branco-amareladas pequenas e médias, as quais apresentaram-se de forma isolada e contínua, dependendo da concentração do inóculo (figs. 10 a 12).

Com base na estimativa das unidades formadoras de colônias (UFC), foram observados valores médios entre 1×10^3 a 3×10^3 colônias/ μL de células cultivadas (tabela 6).



Fig. 10 – Placa de Petri com as colônias de *E. faecalis* formadas na superfície do ágar-BHI (grupo controle-positivo)

Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*



Fig. 11 – Placa de Petri com as colônias de *E. faecalis* formadas na superfície do ágar-BHI (grupo experimental 5)
Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*



Fig. 12 – Placa de Petri com as colônias de *E. faecalis* formadas na superfície do ágar-BHI (grupo experimental 11)
Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*

TABELA 6 – Estimativa do número de colônias de *E. faecalis* (ATCC 19.433) presentes no meio ágar-BHI, após os diferentes protocolos de tratamento e cultivo a 36°C, por 24 h.

PLACAS	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6
1	2851	2114	2589	2425	2916	0
2	3031	2474	2572	2818	1589	0
3	2097	2261	2490	2425	1573	0
4	2327	2089	3228	2310	2343	0
5	2638	1360	2310	2490	3261	0
6	2671	2081	2753	2163	1622	0
7	3310	1344	1475	3424	2654	0
8	2716	2556	1950	3129	1720	0
9	2716	2032	1393	3080	2310	0
10	2716	2409	1098	3195	885	0
11	2769	2572	1999	2015	2703	0
12	3080	2589	1491	2572	1606	0
13	2277	2654	1786	2392	1671	0
14	2687	2179	2015	1835	2376	0
15	2540	2048	1933	2638	2327	0
16	2753	2589	2556	1671	1573	0
17	2818	2048	2441	2032	1671	0
18	2605	1786	2425	1884	1622	0
19	3048	1606	2654	1720	1802	0
20	2556	2228	1655	2048	2048	0
21	2671	1999	2048	1622	2310	0
22	2933	2261	1868	1458	1622	0
23	2425	1671	1737	1688	1655	0
24	2261	1851	2048	1606	2540	0
25	3080	1966	2277	2261	2294	0
26	2654	2474	2015	2376	2753	0
27	2769	2097	1868	2703	1606	0
28	2998	1524	1606	2556	1622	0
29	2884	2064	1868	2343	2015	0
30	2605	1737	1983	2605	1376	0

Fonte: Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.

Os resultados expressos na tabela 6 demonstram um número maior de colônias bacterianas formadas para o grupo 1 (grupo controle-positivo), em relação aos grupos experimentais, sendo o grupo 5 que apresentou menor número de colônias bacterianas.

Não houve crescimento de colônias bacterianas na amostra do grupo 6.

A tabela 7 mostra a análise estatística descritiva dos resultados encontrados para a avaliação do crescimento de *E. faecalis* em meio sólido ágar-BHI.

TABELA 7 – Análise estatística descritiva referente à estimativa do número de unidades formadoras de colônias, em meio ágar-BHI, segundo os grupos.

GRUPOS	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO	ERRO PADRÃO	C.V. (%)
1	2097,23	3309,69	2716,18	2716,00	271,15	49,50	9,983
2	1343,54	2654,31	2088,76	2084,92	365,52	66,73	17,500
3	1097,77	3227,77	2071,01	2007,11	465,93	85,06	22,498
4	1458,23	3424,38	2316,24	2359,38	511,88	93,45	22,100
5	884,77	3260,54	2002,20	1761,34	536,82	98,01	26,812

Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*

De acordo com o número de colônias observadas a partir do cultivo em meio sólido ágar-BHI, verificou-se uma variabilidade maior de crescimento bacteriano entre os grupos, em relação aos resultados obtidos a partir do crescimento em meio líquido. No entanto, nenhum grupo apresentou coeficiente de variação de *Pearson* maior que 30%. Isso demonstra que esses grupos também apresentaram uma distribuição homogênea. O grupo mais homogêneo foi o grupo 1, seguido do 2 e 4. O grupo menos homogêneo foi o de número 5, com coeficiente de variação próximo de 27%, com as medidas de 885 (mínima) e 3260 (máxima).

Pôde-se observar ainda que o número de colônias formadas em 24 h de incubação foi menor em todos os grupos experimentais, em relação ao grupo controle-positivo (grupo 1). Esses resultados foram representados na figura 13.

Utilizando-se o teste ANOVA, os resultados apontados mostraram haver diferença significativa entre os valores médios do número de colônias, segundo os grupos ($p < 0,01$).

Sendo assim, foram aplicados os testes de Tukey-HSD e de Games Howell e pôde-se observar que houve diferença significativa entre o grupo controle-positivo e os grupos experimentais. Entretanto, analisando-se apenas os grupos experimentais e levando em consideração a variável “número de ciclos”, não foi observada diferença significativa entre os grupos 2 e 3, nem entre os grupos 4 e 5.

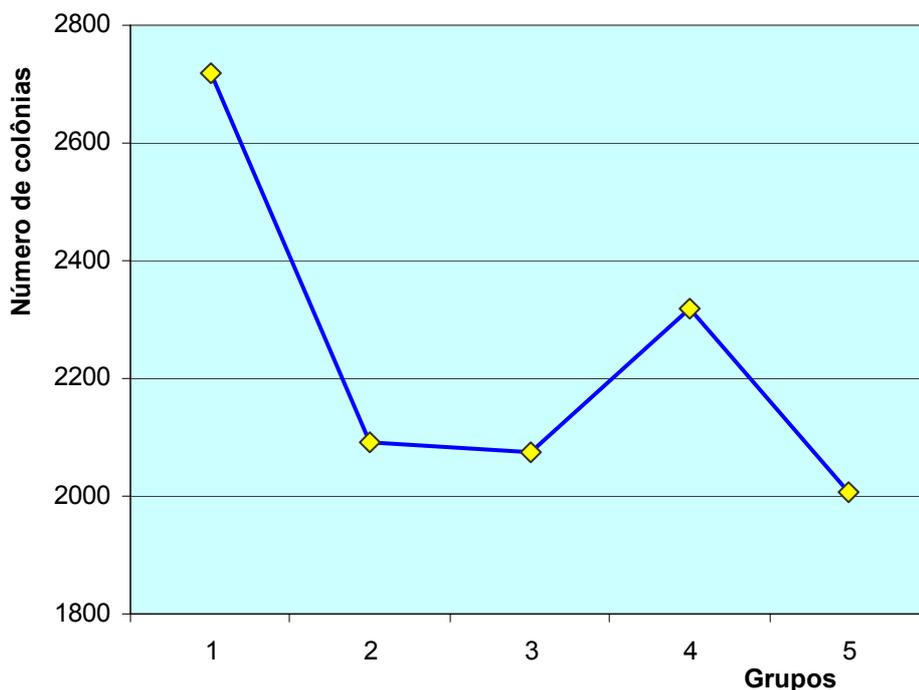


Fig. 13 – Representação do número médio de colônias bacterianas no meio de cultura ágar-BHI, após 24 h de incubação para os diferentes grupos testados.

Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*

Na análise da variável “presença ou não de aquecimento”, também não foi observada diferença significativa entre os grupos 2 e 4, nem entre os grupos 3 e 5.

A partir desses resultados, foi possível constatar menor população bacteriana no grupo 5 (2 ciclos com aquecimento), foram realizados novos cultivos em meio sólido, com novos protocolos de tratamento e os resultados estão apresentados na tabela 8.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 8, verificou-se que o número de colônias bacterianas formadas, a partir dos novos protocolos de tratamento idealizados, foi menor quando comparado com os protocolos anteriores (tabela 6). Esses dados estão esquematizados na figura 14.

TABELA 8 – Estimativa das unidades formadoras de colônias de *Enterococcus faecalis* (ATCC 19.433), a partir do cultivo em meio sólido – ágar-BHI.

PLACAS	GRUPO 7	GRUPO 8	GRUPO 9	GRUPO 10	GRUPO 11	GRUPO 12
1	114	63	73	96	82	0
2	156	117	151	86	72	0
3	208	53	165	175	70	0
4	185	57	95	210	48	0
5	228	144	145	138	47	0
6	150	24	94	134	123	0
7	251	106	130	110	141	0
8	132	108	175	92	149	0
9	175	175	161	132	164	0
10	189	170	171	82	57	0

Fonte: Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.

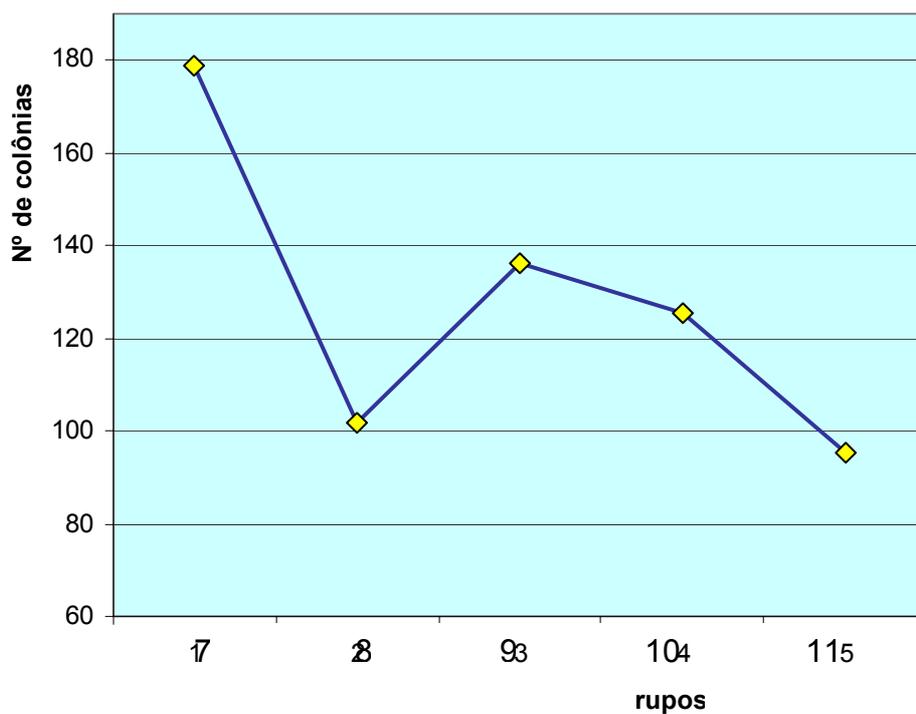


Fig. 14 – Representação dos valores médios do número de colônias formadas no meio ágar-BHI, segundo os novos grupos.

Fonte: Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.

A tabela 9 mostra a análise estatística descritiva dos resultados apresentados na tabela 8.

TABELA 9 – Análise estatística descritiva referente à estimativa do número de unidades formadoras de colônias, segundo os novos protocolos de tratamento.

GRUPOS	N	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO	C.V.(%)
7	10	114	251	178,8	180	42,66	23,86
8	10	24	175	101,7	107	51,67	50,80
9	10	73	175	136	148	36,47	26,81
10	10	82	210	125,5	121	41,56	33,12
11	10	47	164	95,3	77	44,54	46,74

Fonte: *Dados da Pesquisa, Programa de Pós-graduação, FO/PUCRS/2005.*

Por esses resultados, foi possível observar uma redução do número médio entre os grupos experimentais (grupos 8 a 11) quando comparadas com o grupo controle-positivo (grupo 7). Esses grupos apresentaram-se mais heterogêneos. O que apresentou maior variabilidade foi o grupo 8 (coeficiente de variação igual a 50,8%).

De todos os grupos, o que apresentou menor número de colônias foi o 11.

Mediante análise estatística, o teste de Kolmogorov demonstrou que todos os grupos apresentaram uma distribuição normal ($p > 0,05$). No teste ANOVA, foi encontrada diferença significativa ($p < 0,01$) entre os valores médios do número de colônias, segundo os grupos.

Na intenção de verificar em quais grupos essa diferença estava presente, aplicou-se o teste de Tukey-HSD e foi encontrada diferença significativa apenas entre os grupos 8 e 9, e entre os grupos 7 e 11.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A aplicação do nitrogênio líquido vem ganhando força na última década em diversas áreas da Medicina e também na Odontologia. A forma de *spray* destaca-se na cirurgia bucal e maxilofacial pela possibilidade de se conseguir o resfriamento em maior profundidade no tecido ósseo. Na endodontia, não há relatos do uso do *spray* de nitrogênio líquido na terapêutica das lesões pulpares e periapicais.

Na literatura, poucos estudos demonstram o efeito da baixa temperatura em células procariontes. A maioria deles enfatiza o efeito do frio por congelamento de alimentos no sentido de protegê-los da ação de microrganismos, haja vista que a maioria das bactérias não prolifera em baixas temperaturas.

Alguns autores relatam o efeito da baixa temperatura como mecanismo de injúria bacteriana (RAY e SPECK, 1973; CALCOTT, LEE e MACLEOD, 1976).

A análise por espectrofotometria utilizada constitui-se num critério objetivo para aferição do grau de turbidez do cultivo em meio líquido, demonstrando com fidedignidade a concentração bacteriana, em comparação com a consagrada escala de Mac Farland.

Os resultados obtidos com o cultivo em meio líquido (caldo BHI) demonstraram diferentes graus de turbidez, demonstrando alteração no crescimento dos *E. faecalis*. Isso permitiu uma análise qualitativa do crescimento bacteriano.

Os valores encontrados pela espectrofotometria demonstram discreta redução dos valores de absorbância nos grupos experimentais, quando comparados com o grupo controle-positivo. Na primeira etapa experimental, os valores ficaram bastante concentrados em torno da média. Isso demonstra algum efeito do N₂ no crescimento das bactérias, em meio líquido. No entanto, essa discreta redução poderia denotar, em princípio, que a variação do número de ciclos de aplicação de *spray* de N₂ líquido ou a presença da variável “aquecimento” não tenha sido suficiente para destruir toda a população

bacteriana, mas poderia torná-las inviáveis, ou seja, as bactérias sofreriam uma injúria não-letal, conforme afirmam Ray e Speck (1973).

Embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais, houve uma redução gradativa da população bacteriana do grupo controle-positivo para os grupos experimentais (3, 4 e 5). Isso comprovou que 2 ciclos de congelamento/descongelamento produzem maior interferência no crescimento bacteriano *in vitro*, em relação ao ciclo utilizando-se somente 1 aplicação. Esses achados também encontram respaldo nos escritos de Ray e Speck (1973), quando relatam acreditar que a lise celular causada pelos cristais de gelo intracelulares poderia ser a causa da inviabilidade bacteriana. Esses resultados também concordam com os achados de Weister e Osterud (1945), com Whittaker (1975) e Gage (1979) de que a repetição de ciclos de congelamento assegura a máxima destruição celular. Nos estudos com microscopia eletrônica, esses autores demonstraram uma destruição total das células-alvo após 2 ciclos de congelamento/descongelamento consecutivos, embora seus estudos tenham demonstrado o efeito do nitrogênio em células eucariontes.

A utilização de aquecimento da suspensão em teste, para acelerar o descongelamento foi significativa para os grupos 2 e 4, o que também está de acordo com os Whittaker (1975), Gage (1979), Salmassy e Pogrel (1995), quando afirmam que é na fase do descongelamento que ocorre a maior destruição celular. Esses resultados também corroboram os relatos de Dubos (1937), que afirma que bactérias descongeladas em alta temperatura lisam-se rapidamente, talvez devido à ativação de algum mecanismo autolítico intracelular.

Smith e Frasier (1974) salientaram que não se deve acelerar o processo de descongelamento, pois quanto mais lento o descongelamento, maiores os efeitos danosos à célula. Entretanto, e acordo com os resultados obtidos, observou-se que o descongelamento mais rápido provocou uma redução efetiva no crescimento dos *E. faecalis*, potencializando o efeito do *spray* de N₂.

No grupo controle-negativo, não houve crescimento bacteriano, isto é, não houve alteração do grau de turbidez, resultando em absorbância igual a zero. Esses resultados foram comprovados com a análise do meio sólido, onde não foi encontrado crescimento de colônias bacterianas. Dessa forma, foi possível observar que o N₂ é um líquido praticamente isento de microrganismos e,

portanto, não interferiu na metodologia empregada, a ponto de “contaminar” a suspensão em teste, fazendo com que outras bactérias, presentes nos reservatórios do fabricante ou do distribuidor do N₂ líquido, ou até mesmo do ambiente na câmara de fluxo laminar pudessem crescer e colonizar o meio ágar-BHI e interferir no crescimento de *E. faecalis*.

O estudo em meio líquido permitiu uma avaliação qualitativa do crescimento, no entanto, a realização de cultivos em meio sólido justifica-se pela necessidade de se mensurar essa alteração demonstrada nos diferentes graus de turbidez. Dessa forma, a semeadura no meio sólido permitiu uma avaliação quantitativa, uma vez que foi possível contar o número de colônias formadas na superfície do ágar-BHI.

A avaliação do crescimento *E. faecalis* em meio sólido demonstrou resultados compatíveis com os observados para o cultivo em meio líquido (figs. 9 e 13).

O número médio de colônias formadas a partir do cultivo em meio sólido considerando-se os grupos experimentais foi sempre menor quando comparado com o grupo controle-positivo, com diferença significativa entre eles (tabela 7). Embora com comportamento diferente em função do meio de cultivo, líquido ou sólido, foi verificado que o N₂ reduziu a população de *E. faecalis* cultivados *in vitro*.

Ainda que as bactérias tenham comportamentos diferentes quando incubadas em meios com diferentes estados físicos, os resultados encontrados para o meio sólido foram bastante semelhantes àqueles do cultivo em meio líquido, com ausência de diferença significativa entre os grupos 2 e 3 e entre os grupos 4 e 5, quando se avaliou o número de ciclos. Esses resultados concordam com os achados de Ray e Speck (1973) que afirmam que mais ciclos de N₂ líquido são mais “letais” para bactérias.

Com a presença do aquecimento, não se observou diferença significativa entre os grupos 2 e 4 nem entre os grupos 3 e 5, diferentemente do que ocorreu no meio líquido, com diferença significativa para os grupos 2 e 4. Esses resultados demonstram um comportamento diferente das bactérias em função da forma de cultivo. O efeito da potencialização do N₂ líquido pelo descongelamento rápido (banho-maria) não foi o mesmo durante o crescimento

de *E. faecalis* em meio sólido, pois não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (tabelas 5 e 7).

É importante ressaltar que a presença dos enterococos e de mais nenhum outro microrganismo foi realizada pela confirmação microscópica. A avaliação do controle-positivo e dos grupos experimentais pelo método de coloração de Gram revelou a presença de cocos Gram-positivos.

Com o aumento de tempo de aplicação do N₂, pôde-se constatar uma redução significativa do número de colônias bacterianas formadas do grupo controle-positivo em relação aos grupos experimentais. A semelhança entre as figuras 13 e 14 reforça essa redução. O grupo 11 apresentou maior redução do número de colônias formadas, mostrando que um tempo de congelamento maior é mais prejudicial para as bactérias. No entanto, o tempo maior de aplicação do *spray* utilizado neste trabalho foi eficaz para reduzir o número de colônias formadas, mas não o suficiente para eliminar toda a população bacteriana, corroborando os achados de Ray e Speck, que salientam que o tempo maior de congelamento é mais prejudicial para as bactérias, podendo causar uma injúria não-letal, mas que as torna inviáveis.

Na avaliação dos resultados obtidos, é possível que o nitrogênio tenha exercido alguma “injúria” nas bactérias, diferentemente do que afirma Pelczar (1997): “temperaturas abaixo de zero não podem matar os microrganismos e, desta maneira, conseguem preservá-los por um longo tempo em materiais congelados”. No entanto, o fato de não ter sido possível avaliar, nesta pesquisa, a patogenicidade desses microrganismos, demonstra a necessidade de novos estudos. Por outro lado, os dados aqui encontrados devem ser comprovados, de forma a apontar qual é o real mecanismo de ação do nitrogênio nas bactérias.

Sabe-se que a parede celular é a grande responsável pela proteção às bactérias, no que diz respeito a variações de temperatura e pressão. Assim sendo, é importante que novos estudos sejam idealizados de forma que se possa comprovar que o ciclo congelamento/descongelamento cause efetivamente a desidratação bacteriana, seja pela remoção da água da célula, congelando-a extracelularmente, conforme relata Mazur (1970), ou pelo esmagamento e perfuração mecânica da célula pelos cristais de gelo formado durante o congelamento, segundo Weister e Osterud (1945), ou ainda pelo desequilíbrio

eletrolítico, devido a concentração aumentada de solutos, causada pelo congelamento da água intracelular (BARBOSA E SANVITTO, 1973).

O estudo *in vitro* talvez, seja limitado para se avaliar o real papel do N₂ líquido na destruição de bactérias, embora tenha demonstrado uma ação limitada na redução do crescimento, ao menos, para os *E. faecalis*. Todavia, conforme os resultados apresentados, verificou-se que diferentes ciclos de N₂, na forma de *spray*, parecem reduzir a população bacteriana estudada. Dessa forma, considerando o efeito importante do N₂ líquido no tratamento de lesões bucais, este potencial “agente bactericida/bacteriostático” deveria ser mais extensamente explorado. Os testes aqui realizados, *in vitro*, indicam que novos parâmetros devam ser avaliados, em conjunto com novos delineamentos experimentais, *in vivo*, de forma a verificar a ação do N₂ potencializada pelos fluidos orgânicos. Isso, pelo fato de que as bactérias cultivadas em laboratório estão potencialmente mais ávidas para o crescimento, uma vez que nos meios de cultivo, não existe a resposta imune do hospedeiro, conforme afirmam Barbosa e Sanvitto (1973), que contribuem para a erradicação dos agentes microbianos invasores.

Além disso, outras bactérias deverão ser testadas em novos estudos para confirmação dos resultados aqui apresentados.

É possível até mesmo que o nitrogênio não cause a lise bacteriana, mas possa interferir em alguma fase de seu metabolismo, impedindo o seu crescimento. Nesse caso, poderia ser atribuída uma função bacteriostática do N₂, ou a chamada “inviabilidade bacteriana”, de acordo com Ray e Speck (1973) e Calcott, Lee e MacLeod (1976).

Com o avanço dos recursos tecnológicos, faz-se necessária a busca de novos modelos e protocolos terapêuticos das enfermidades pulpares e periodontais, de forma a minimizar o desconforto e o trauma cirúrgico e maximizar a eficácia e o sucesso. Acreditamos que as futuras pesquisas, *in vivo*, possam demonstrar o real mecanismo de ação do N₂ líquido, aplicado na forma de *spray*, a ponto de tornar as bactérias inviáveis. Esses estudos, entretanto, devem contemplar descrições detalhadas do aspecto microscópico da dentina, cemento, e do processo de reparação do osso alveolar e ligamento periodontal após o uso dessa técnica no interior de canais radiculares.

Utilizando a crioterapia local pelo sistema fechado, Tal, Koslovsky e Pitaru (1991), comprovaram regeneração dos tecidos periodontais após aplicação

do N₂ em osso alveolar de cães. Também não foi encontrada reabsorção nem anquilose nos locais operados. Esses achados nos leva a acreditar numa futura aplicação clínica do *spray* de N₂ líquido nos campos da Endodontia, Periodontia, além de outros.

Sem que possam ser sobrepujadas as formas convencionais e consagradas de tratamento dos canais radiculares, seria no mínimo, imaginável e especulativo acreditar que um resfriamento curto e rápido, desde que comprovada e relevada sua morbidade, serviria como forma (neo)adjuvante do preparo biomecânico na terapêutica dos canais radiculares ou até mesmo das cirurgias pararendodônticas, sobretudo naqueles casos de infecções refratárias e insucessos nos tratamentos endodônticos, onde os *E. faecalis* se fazem presentes em 47% (MOLANDER, 1998), 62,96% (PECIULIENE et al., 2000), até mesmo 76% (GOMES et al, 1995) dos casos.

Ressalta-se ainda que alguns microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em uma fase latente, com uma baixa atividade metabólica por um período, e mudanças das condições ambientais, podem ativar o seu crescimento (MOLANDER et al., 1998). Por outro lado, a ação do nitrogênio líquido, quer isoladamente ou associado a drogas antimicrobianas, poderia causar uma injúria significativa nesses microrganismos, ao atingir regiões mais internas da dentina (LOVE, 2001) e no chamado sistema de canais radiculares, sobretudo no delta apical, onde sabemos que a irrigação sangüínea é restrita (FIGDOR et al, 2003) e a possibilidade de insucesso não pode ser relevada (SUNDQVIST et. al, 1998).

E finalizando, é importante a realização de pesquisas com recursos da Biologia Molecular, de métodos bioquímicos e até mesmo da Microscopia Eletrônica, de forma a investigar a estrutura da parede bacteriana, quando submetida ao resfriamento brusco e rápido como ocorre com o *spray* de N₂ líquido.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que:

1. a queda brusca de temperatura provocada pelo *spray* de N₂ líquido interferiu no crescimento de *Enterococcus faecalis*, em meios de cultura líquido e sólido, à base de ágar-BHI, reduzindo parcialmente a população bacteriana.
2. o protocolo de aplicação do *spray* de N₂ líquido que promoveu maior redução da população bacteriana de *Enterococcus faecalis* foi o do grupo 11 (2 aplicações de N₂ líquido de 120 segundos, com 2 minutos de descongelamento com repetição 12 h após).
3. o ciclo de congelamento e descongelamento, natural ou por aquecimento do frasco, reduziu a população bacteriana, mas não o suficiente para se atribuir ao N₂ líquido, um “efeito bactericida”.
4. quanto maior o número e o tempo das aplicações do N₂ líquido, menor o crescimento de *Enterococcus faecalis*, nas diferentes formas de cultivo avaliadas.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS*¹⁰

BARBOSA, J. F.; SANVITTO, L. C. Crioterapia Local (Criocirurgia) – Denominação e Histórico. **Boletim de Oncologia**, v.3, n.3-4, p.29-34, 1973.

BELTRÃO, R. G. **Análise clínica dos efeitos do nitrogênio líquido aplicado com hastes de algodão em lábio e palato de coelhos**. 2003. 130f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BIER, O. Técnicas Bacteriológicas. In: **Microbiologia e Imunologia**. 30^a ed. São Paulo: Melhoramentos, p. 931, 1990.

BORGES, H. O. I. **Uso clínico de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de hiperplasia bucal**. 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BRADLEY, P. F. Modern trends in cryosurgery of bone in the maxillofacial region. **Int J Oral Surg**, v.7, n.4, p.405-415, 1978.

BRADLEY P. F, Fisher A. D. The cryosurgery of bone. An experimental and clinical assessment. **Br J Oral Surg**, v.13, n.2, p.111-127, 1975.

CALCOTT, P.H., LEE, S.K., MACLEOD, R.A. The effect of cooling and warming rates on the survival of a variety of bacteria. **Can J Microbiol**. V. 22, n.1, p. 106-109, 1976.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase-experimentais de pesquisa**. São Paulo: EDUSP, 138p.

CURI, M. M. et al. Management of solid ameloblastoma of the jaws with liquid nitrogen spray cryosurgery. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.84, n.4, p.339-344, 1997.

DAHLÉN, G. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol**, v.15, n.5, p.309-312, 2000.

DUMONT F, MARECHAL PA, GERVAIS P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196 degrees C. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, n.2, p.1330-1335, 2006.

¹⁰ Referências de acordo com as normas NBR 6023 da ABNT, Agosto 2002.

ENGSTRÖM B, FROSTELL G. Experiences of bacteriological root canal control. **Acta Odontol Scand**, v.22, p.43-69, 1964.

FACKLAM, R.; SAHM, D.A.; TEIXEIRA, L.M. – Enterococcus. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (ed) - **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington, American Society for Microbiology, 1999. p. 297-305.

FIGDOR D., DAVIES J.K., SUNDQVIST G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, n.4, 234-239, 2003.

GAGE, A. A. et al. Freezing bone without excision: an experimental study of bone-cells destruction and manner of regrowth in dogs. **JAMA**, v.196, p.90-94, 1966.

GAGE, A. A.; MEENAGHAN, M.; NATIELLA, J. Sensivity of pigmented mucosa and skin to freezing injury. **Criobiology**, v.6, n.4, p.347-353, 1979.

GOMES, B. P. F. A. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immun**, v.19, p.71-76, 2004.

HAAPASALO, M., ORSTAVIK, D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, v.66, n.8, p.1375-1379, 1987 Aug;66(8):1375-9.

HAYDEN, M. K., HARRIS, A. A. Confronting antibiotic resistance in enterococcal infections. **Contemp Intern Med**, v.6, n.9, p.7-17, 1994.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Criobiologia>. Acesso em 20 mar. 2006.

LEOPARD, P.J. Cryosurgery, and its application to oral surgery. **Br J Oral Surg**, v.13, n.2, p.128-152, 1975

MAGRO FILHO, O. et al. Mixoma de maxila. **RGO**, v.42, n.3, p.153-155, 1994.

MALAWER, M.M et al. Cryosurgery in the treatment of giant cell tumor. A long-term followup study. **Clin Orthop Relat Res**, v. 359, p. 176-188, 1999.

MARTINS DA SILVA, F. **Estudo das características histológicas do processo de reparo após aplicação de nitrogênio líquido em tecido ósseo em mandíbulas de coelho**. 2003. 70f. Tese (Doutorado em Odontologia – área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

MAZUR, P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity of the survival of frozen and thawed cells. **Criobiology**, 2, 181, 1966.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems, **Science**, 168, 939, 1970.

MOELLERING, R.C. JR. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clin Infect Dis**, v.14, n.6, p.1173-1176, 1992.

MOLANDER A, et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 31, n.1, p.1-7, 1998.

MORONI, P. et al. Crioterapia em ameloblastomas. **Odontólogo Moderno**, v.9, n.11-12, p.28-38, 1982.

MORRISON et. al, Inter-hospital spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **J Hosp Infect**, v. 36, n.1, p.77-78, 1997.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin Microbiol Rev**, v.3,n.1, p.46-65, 1990.

PAZELLI, L. C.; FREITAS, A. C. ITO, I. Y. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes decíduos de humanos com necrose pulpar e lesão periapical crônica. **Pesq Odontol Bras**, v..17, n.4, p.367-371. out./dez. 2003.

PECIULIENE, V. et al. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **J Endod**, v.26, n.10, p.593-595, 2000.

PECIULIENE V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int Endod J**. v.34, n.6, p.429-434, 2001.

PELCZAR, M. J. et al. Cultivo e Crescimento de Microorganismos. In: **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**, 2v, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, p.166-187, 1997.

PELCZAR, M. J. et al. Controle de Microorganismos: Fundamentos e Agentes Físicos. In: **Microbiologia – Conceitos e Aplicações**, 2v, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, p.190-209, 1997.

PINHEIRO, E. T. et al. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immun**, v.18, p.100-103, 2003.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v.36, p.1-11, 2003.

PINHEIRO, E. T. et al. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v.37, p.756-763, 2004.

POGREL, M. A. The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions. **J Oral Maxillofac Surg**, v.51, n.3, p.269-273, 1993.

POGREL, M. A. The management of lesions of the jaws with liquid nitrogen cryotherapy. **J. Calif Dent Assoc**, v. 23, n. 12, p. 54-7, 1995.

POGREL, M. A. et al. A study of thermographic assessment of liquid nitrogen cryotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.81, n.4, p.396-401, 1996.

RAY, B.; SPECK, M.L. Freeze-injury in bacteria. **CRC Crit Rev Clin Lab Sci** v. 4, n.2, p.161-213, 1973.

READE, P. C. Cryosurgery in clinical dental practice, **Int Dental J**, v.29, n.1, p.1-11, 1979.

SIQUEIRA, J. F. Jr et al. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. **J Endod**, v. 30, n.9, p. 638-643, 2004.

SALMASSY, D.A.; POGREL, M.A.. Liquid nitrogen cryosurgery and immediate bone grafting in the management of aggressive primary jaw lesions. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 53, n. 7, p. 784-90, 1995.

SANTOS, A. M. B. **Análise morfológica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos**. 2002. 140f. Tese (Doutorado em Odontologia – área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SCORTEGAGNA, A. **Análise microscópica de enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos submetida à crioterapia com nitrogênio líquido**. 2002. 108p. Tese (Doutorado em Odontologia – área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) – Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SHEPARD B. D., GILMORE M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes Infect**, v.4, n.2, p.215-224, 2002.

SPECK, M. L; COWMAN, R. A. Symposium on the restoration of sublethally impaired bacterial cells in food. II. Injury and recovery of frozen microorganisms. **J. Milk Food Technol**. 34,548, 1971.

SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. **J Endod**, v.18, n.9, p.427-430, 1992.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, n.1, p.86-93, 1998.

SWENSON, J.M.; HINDLER, J.A.; PETERSON, L.R. – **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington, American Society for Microbiology, 1999. p.1356-1367.

TAL, H. Cryosurgical treatment of hemangiomas of the lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon**, v.73, n.6, p.650-654, 1992.

TAL H.; KOSLOVSKY, A., PITARU, S. Healing of sites within the dog periodontal ligament after application of cold to the periodontal attachment apparatus. **J Clin Periodontol**, v.18, p.543-547, 1991.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

WEISER, R. S., OSTERUD, C. M. Studies on the Death of Bacteria at Low Temperatures: I. The Influence of the Intensity of the Freezing Temperature, Repeated Fluctuations of Temperature, and the Period of Exposure to Freezing Temperatures on the Mortality of *Escherichia coli*. **Bacteriol**, v.50, n.4, p.413-439, 1945.

WHITTAKER, D. K. Mechanism of tissue destruction following cryosurgery. **Ann R Coll Surg Engl**, v.66, p.313-318, 1984

YEH, C. J. Simple cryosurgical treatment for oral lesions. **Int J Oral Oral Maxillofac Surg**, v. 29, n.3, p.212-216, 2000

YEH, C. J. Simple cryosurgical treatment for oral lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon**, v.90, n.1, p.12-13, 2000.

ANEXO A

TERMO DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA
PUCRS

*Comissão Científica e de Ética
Faculdade de Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 05 de setembro de 2005

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0081/05

Intitulado: *Análise do efeito do spray de nitrogênio líquido em culturas de bactérias enterococcus faecalis - estudo in vitro*

do(a) aluno(a): *Paulo Sérgio Batista*

Programa de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

do curso de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

Nível: *Doutorado*

Orientado pelo(a): *Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 02 de setembro de 2005.


Prof. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ANEXO B



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA

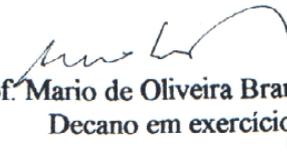
Curitiba, 08 de Agosto de 2005.

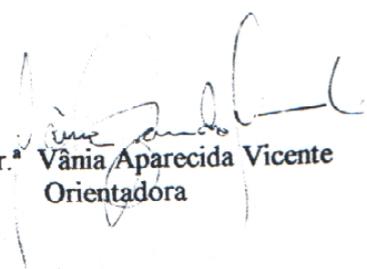
DECLARAÇÃO

Declaro, para os fins que se fizerem necessários, que Paulo Sérgio Batista, aluno integrante do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS – área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial – irá desenvolver todos os procedimentos metodológicos de seu projeto de pesquisa no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob minha supervisão.

O projeto de pesquisa "**ANÁLISE DO EFEITO DO SPRAY DE NITROGÊNIO LÍQUIDO EM CULTURAS DE BACTÉRIAS ENTEROCOCCUS FAECALIS – ESTUDO IN VITRO**" tem como orientador o Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, sendo parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Odontologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Por ser a expressão da verdade, firmo a presente.


Visto: Prof. Mario de Oliveira Branco Filho
Decano em exercício


Prof.ª Dr.ª Vânia Aparecida Vicente
Orientadora

ANEXO C**ESPECTROFOTÔMETRO DIGITAL UTILIZADO*****Thermo Spectronic – Genesys 10 uv***

ANEXO D

REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO EMPREGADO PARA A APLICAÇÃO DO
SPRAY DE N₂ LÍQUIDO NO FRASCO CONTENDO O INÓCULO.



ANEXO E

APARELHO AGITADOR DE TUBOS TIPO VÓRTEX



ANEXO F**REPRESENTAÇÃO DA TÉCNICA DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE
(DISTRIBUIÇÃO DO INÓCULO COM ALÇA DE DRIGALSKI)**