

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**Mestrado em Odontologia**

**Flávia Ribeiro Gomes González**

**Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da água ozonizada recém produzida e congelada em diferentes temperaturas frente ao biofilme de *Enterococcus Faecalis***

São Paulo  
2023

**Flávia Ribeiro Gomes González**

**Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da água ozonizada recém produzida e congelada em diferentes temperaturas frente ao biofilme de *Enterococcus Faecalis***

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Santo Amaro – UNISA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob a orientação da Profa. Dra. Luana de Campos.

São Paulo

2023

G652a

González, Flávia Ribeiro Gomes.

Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana da água ozonizada recém produzida e congelada em diferentes temperaturas frente ao biofilme de Enterococcus Faecalis / Flávia Ribeiro Gomes González. – 2023.

40 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Luana de Campos.

Dissertação. (Mestrado em Odontologia) - Universidade Santo Amaro, 2023.

Bibliografia incluída.

1. Ozônio. 2. Ozonioterapia. 3. Enterococcus Faecalis. I. Campos, Luana de. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 363.7

González FRG. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana da água ozonizada recém produzida e congelada em diferentes temperaturas frente ao biofilme de *Enterococcus Faecalis* [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Santo Amaro – UNISA. 2023.

São Paulo, ..... de ..... de 2023.

### **Banca Examinadora**

1) Prof.(a). Dr(a). Luana de Campos

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

2) Prof.(a). Dr(a). Márcia Hiromi Tanaka

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

3) Prof.(a). Dr(a). Renata Cristiane da Silva

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico esse trabalho aos meus pais Luís Carlos (in memoriam) e Arlete que me proporcionaram o meu maior bem, a vida, e eu vivo em homenagem a vocês.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por me proporcionar essa experiência enriquecedora que foi esse mestrado. Que eu possa desenvolver e aperfeiçoar com sabedoria tudo que aprendi nesse processo.*

*Agradeço ao Professor Wilson Sendyk pela oportunidade de aprender, conhecer e conviver com ele próprio e com sua equipe, mestres e doutores que me trouxeram um grande aprendizado, não apenas por palavras, mas pela conduta admirável tanto como profissionais quanto como seres humanos.*

*Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Luana de Campos, responsável pela condução impecável e incansável deste trabalho. Graças à sua habilidade, inteligência, organização e eficiência a realização desse estudo foi possível.*

*Agradeço à Prof. Dra. Márcia Hiromi Tanaka que com sua gentileza, doçura e conhecimento me orientou e conduziu durante todo o desenvolvimento laboratorial da pesquisa sempre com um sorriso gentil, bem como à Prof. Dra. Heloísa Fonseca Marão cujo auxílio e participação foram muito importantes para o bom andamento da pesquisa.*

*Agradeço à equipe do laboratório: os técnicos Fernando e Juscelino chefiada pela Prof. Dra. Marina Tiemi que com uma paciência invejável se mostrou disposta a auxiliar e esclarecer eventuais dúvidas e procedimentos.*

*Agradeço ao pessoal da secretaria, a Marcinha e ao Guilherme pela forma respeitosa e eficaz com que sempre me atenderam.*

*Deixo um agradecimento ao Sr. Wilfredo da empresa Ozone & Life pela atenção, auxílio e disponibilidade em auxiliar a pesquisa de forma imparcial e prestativa.*

*Ao meu querido Alexandre Hyppolito, parceiro e amigo, cuja dissertação caminhou junto com a minha. Você ajudou a tornar os dias de pesquisa mais divertidos e dinâmicos, auxiliou a pesquisa tornando o trabalho mais leve e divertido e reafirmou a importância de se ter um amigo leal ao longo da vida.*

*Agradeço aos meus colegas de turma que tornaram esse mestrado inesquecível. Não imaginei encontrar pessoas tão incríveis. Vocês tornaram esse processo em algo memorável. Levo todos vocês no meu coração.*

*Agradeço ao meu marido Wilson e aos meus filhos Vitor e Daniel cujo apoio e compreensão permitiram a realização de um sonho. Eu só consegui atingir meu objetivo graças a todo apoio, colaboração, amor e acolhimento que tiveram comigo, por isso deixo aqui o meu agradecimento a vocês por todo amor que me dedicam. Amo vocês.*

*E finalmente, agradeço a todos aqueles que me auxiliaram de forma direta ou indireta em todo esse processo. Ninguém consegue atingir um objetivo sozinho e a minha rede de apoio segue sendo sensacional. Que Deus retribua a todos em meu nome se eu própria não tiver a oportunidade de retribuir.*

*Que assim seja!*

## RESUMO

O uso da ozonioterapia tem sido uma prática crescente nas diversas áreas da saúde, principalmente devido sua promissora ação imunomoduladora e antimicrobiana. No entanto, por se tratar de uma molécula instável, um dos maiores desafios no trabalho com a ozonioterapia é o tempo clínico e o armazenamento, uma vez que sua eficácia apresenta uma curva de redução imediatamente após sua produção. Buscando encontrar uma forma eficaz de armazenar o ozônio preservando suas propriedades desejáveis, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de água ozonizada recém-produzida (fresca) e congelada em diferentes temperaturas sobre o biofilme de *Enterococcus faecalis*. Para isso, o estudo incluiu 4 grupos experimentais, os quais foram divididos de acordo com o tratamento, da seguinte forma: grupo **Controle**, incluindo água bidestilada estéril (n=9); grupo **3µg**, incluindo água ozonizada fresca na concentração de 3 µg/ml (n=9); grupo **3µg -20°C**, incluindo água ozonizada na concentração de 3 µg/ml armazenada em freezer a -20°C (n=9); e grupo **3µg -80°C**, incluindo água ozonizada na concentração de 3 µg/ml armazenada em freezer a -80°C (n=9). Como resultado, não houve diferença estatística entre os grupos **Controle** e **3µg**. Dentre os grupos que incluíram tratamento OT, o grupo **3µg -80°C** foi o único estatisticamente eficaz na redução bacteriana (p<0,05), enquanto o grupo **3µg -20°C** apresentou o maior crescimento bacteriano (p<0,05). Conclui-se que o armazenamento de água ozonizada na concentração de 3 µg/ml em freezer a -80°C parece contribuir para a estabilidade da solução e ser eficaz na redução do biofilme de *Enterococcus faecalis*, porém mais estudos devem ser conduzidos, para que haja maior refinamento na compreensão e confirmação dos dados para uma possível aplicabilidade clínica.

**Palavras-chave:** Ozônio, Ozonioterapia, Biofilme, *Enterococcus Faecalis*, Descontaminação.

## ABSTRACT

The use of ozone therapy has been a growing practice in several medical areas, mainly by its promisor immunomodulatory and antimicrobial action. However, as it is an unstable molecule, the biggest challenges to using the ozone therapy are clinical time and storage, since its effectiveness shows a reduction curve immediately after production. Seeking to find an effective way to store ozone while preserving its desirable properties, this aimed to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of newly produced (fresh) ozonized water and frozen at different temperatures on the *Enterococcus faecalis* biofilm. Therefore, the study included 4 groups, which were divided according to treatment: **Control** group, including sterile double-distilled water (n=9); group **3µg**, including ozonized fresh water at a concentration of 3 µg/ml (n=9); group **3µg -20°C**, including ozonized water at a concentration of 3 µg/ml stored in a freezer at -20°C (n=9); and group **3µg -80°C**, including ozonized water at a concentration of 3 µg/ml stored in a freezer at -80°C (n=9). As a result, there was no statistical difference between the **Control** and **3µg** groups. Among the groups that included OT treatment, the **3µg -80°C** group was the only one that was statistically effective in bacterial reduction (p<0.05), while the **3µg -20°C** showed the highest bacterial growth (p<0,05). We concluded that the ozonated water at a concentration of 3 µg/ml storage in a freezer at -80°C appears to contribute to the stability of the solution and be effective in reducing *Enterococcus faecalis* biofilm colonies, however, additional studies should be performed, for better understanding and possible clinical applicability.

**Keywords:** Ozone, Ozone Therapy, Biofilm, *Enterococcus Faecalis*, Decontamination.

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Média de UFC/ml de <i>Enterococcus faecalis</i> dos diferentes grupos experimentais .....	24
--	----

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Representação gráfica das diferentes média de UFC/ml do *E. faecalis*,  
para os respectivos grupos experimentais ..... 25

## Lista de Figuras

Figura 1: Formação do ozônio (O <sub>3</sub> ) a partir da molécula de oxigênio (O <sub>2</sub> ) .....	11
Figura 2: Organização inicial dos materiais .....	17
Figura 3: Placas com os poços após o período de incubação de 24 h .....	18
Figura 4: Gerador de ozônio, conectado ao cilindro de oxigênio medicinal com regulador de fluxo e coluna de vidro utilizados para ozonizar a água .....	19
Figura 5: Fotômetro e kit colorimétrico utilizado na pesquisa .....	20
Figura 6: Microtubos identificados para diluição seriada .....	21
Figura 7: Plaqueamento pela técnica de gotas .....	22
Figura 8: Placas, em duplicata, organizadas para a contagem de UFC.....	23

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1	Ozonioterapia .....	10
2.1.1	Histórico da ozonioterapia .....	10
2.1.2	Formas de utilização .....	12
2.2	Enterococcus Faecalis .....	13
2.3	Biofilme de Enterococcus faecalis e ozonioterapia .....	14
3	<b>OBJETIVO</b> .....	16
3.1	Objetivo geral .....	16
3.2	Objetivo específico .....	16
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
4.1	Cepas, condições de crescimento e preparo do biofilme .....	17
4.2	Grupos experimentais e protocolo de produção e armazenamento da água ozonizada .....	18
4.3	Avaliação do efeito antimicrobiano da água ozonizada sobre biofilme de <i>E. faecalis</i> .....	21
4.3.1	Tratamento e diluição das amostras .....	21
4.3.2	Plaqueamento e contagem de colônias .....	22
4.4	Análise dos resultados .....	23
5	<b>RESULTADOS</b> .....	24
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30

## 1 INTRODUÇÃO

O ozônio ( $O_3$ ), descoberto em 1840, é uma molécula tri atômica amplamente utilizada na indústria por sua ação desinfetante, devido à sua potente capacidade oxidante. De acordo com a literatura, devido seu potencial antimicrobiano, desde 2005 ele vem sendo utilizado em vários locais do mundo para desinfecção da água e para o controle de uma ampla variedade de patógenos humanos, entre eles bactérias, vírus, fungos e protozoários, sem produzir resistência; ganhando rapidamente aplicações clínicas nas diferentes áreas da saúde (1).

Sua capacidade antimicrobiana é devido à alta instabilidade desta molécula que se decompõe rapidamente produzindo moléculas de oxigênio ( $O_2$ ) e um radical livre responsável pela ação oxidante ( $O^-$ ) (2). Tal característica, em contrapartida, se torna um desafio quando seu armazenamento é necessário. De acordo com a literatura, a meia-vida do  $O_3$  em solução aquosa a  $20^\circ C$  é geralmente considerada como sendo de 20 a 30 minutos (3), e a solução deve ser preferencialmente utilizada dentro de 5-10 minutos após a produção para garantir sua ação em microrganismos (4), não havendo evidências sobre a possibilidade de armazenamento da solução ainda que em baixas temperaturas.

Em decorrência do seu potencial desinfetante somado à sua biocompatibilidade e estímulo no processo de regeneração tecidual (5), podemos acompanhar um crescente número de trabalhos sobre a ozonioterapia (OT), tornando-a uma importante terapia adjuvante em tratamentos de saúde. Sua principal forma de utilização na odontologia é através da água ozonizada cuja ação tem sido estudada, principalmente, na irrigação de bolsas periodontais (6), em canais radiculares (7) osteonecroses, (8) peri-implantite e halitose (9). No entanto, ainda são poucos os trabalhos que avaliam a ação da OT em biofilmes bacterianos, uma estrutura formada por uma variedade de microrganismos conhecidamente responsável por agravar e tornar recorrentes infecções comuns na cavidade oral e no organismo como um todo (10,11).

Dada a sua complexidade, o controle e descontaminação de biofilmes bacterianos permanece um dos grandes desafios na clínica odontológica, principalmente frente a crescente identificação de resistência bacteriana (12,13).

Dentre as bactérias de maior relevância, a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) apresenta características altamente adaptativas: são anaeróbios facultativos alternando rapidamente para aeróbios na presença de oxigênio, toleram grandes variação de temperatura e de pH (14), podem sobreviver a uma temperatura de 60° C durante 30 minutos e podem permanecer em condutos radiculares e até mesmo no osso alveolar após extração dentária, podendo inclusive contribuir na perda de fixação do implante (15). Apesar de já terem sido testados diferentes tipos de antimicrobianos na eliminação do *E. faecalis*, o tempo de ação ou concentração dos agentes antimicrobianos ainda são altos, tendo a segurança questionada em função da neurotoxicidade e citotoxicidade (14,15).

Ainda que existam estudos promissores sobre o uso da OT no controle de infecções, eles ainda são poucos e inconclusivos (16,17), possivelmente por se tratar de um método terapêutico cujo uso, bem como as pesquisas, ainda está se popularizando.

Sendo assim, este trabalho foi pioneiro na busca por evidências mais robustas sobre o efeito antimicrobiano da água ozonizada recém produzida e congelada em diferentes temperaturas frente ao biofilme de *E. faecalis*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ozonioterapia

#### 2.1.1 *Histórico da Ozonioterapia*

O gás ozônio ( $O_3$ ) foi descoberto em meados do século XIX e vem sendo estudado pela medicina desde a primeira guerra mundial, onde foi bastante utilizado para gangrenas, queimaduras, fístulas e feridas contaminadas de soldados alemães (1). Desde então, seu uso fundamenta-se em processos oxidativos que alteram a integridade de bactérias, fungos, vírus e protozoários, através da oxidação dos fosfolípidios e lipoproteínas, sem induzir resistência microbiana (18).

Atualmente, seus efeitos no sistema imunológico celular e humoral também têm ganhado destaque por serem responsáveis pela proliferação de células imunocompetentes e síntese de imunoglobulinas, interleucinas, leucotrienos e prostaglandinas. Logo, o  $O_3$  parece também ativar a função dos macrófagos e aumentar a sensibilidade dos microrganismos à fagocitose. Por fim, dados mais recentes da literatura reportam a interação do  $O_3$  com células do sangue e elementos do sistema circulatório, o que pode resultar em benéficos no metabolismo do oxigênio, energia celular, sistema de defesa e microcirculação (19). Nesse sentido, seu uso tem se propagado em diferentes tratamentos para analgesia, regeneração tecidual, infecções e inflamações (16,20); já sendo regulamentado em treze países, dos quais Estados Unidos, Espanha, Rússia, Cuba, Portugal, Grécia fazem parte (21). No Brasil, seu uso está regulamentado na odontologia desde 2015 e foi autorizada em 2023 para uso médico pela Lei 14.648/23 (22).

O primeiro dentista a usar a OT foi o Dr. Fisch (1899–1966) com a finalidade de tratar um abscesso no médico alemão Dr. Erwin Payr (1871–1946) que, notando a ação de controle da infecção em si próprio, tornou-se um entusiasta no assunto. Ele passou a incluir OT em seus próprios procedimentos cirúrgicos e reportou seus resultados no 59º Congresso da Sociedade Cirúrgica Alemã em Berlim em 1935 (1).

A OT utiliza uma mistura composta por dois diferentes gases: o oxigênio puro ( $O_2$ ) na proporção 95-99,99% e o ozônio ( $O_3$ ) representando 0,1 a 5% (23). Ele é

produzido na natureza quando descargas elétricas ou radiação ultravioleta atuam nas moléculas de oxigênio (Figura 1). A ligação formada é frágil e se dissocia facilmente tornando-o um composto altamente reativo e instável.

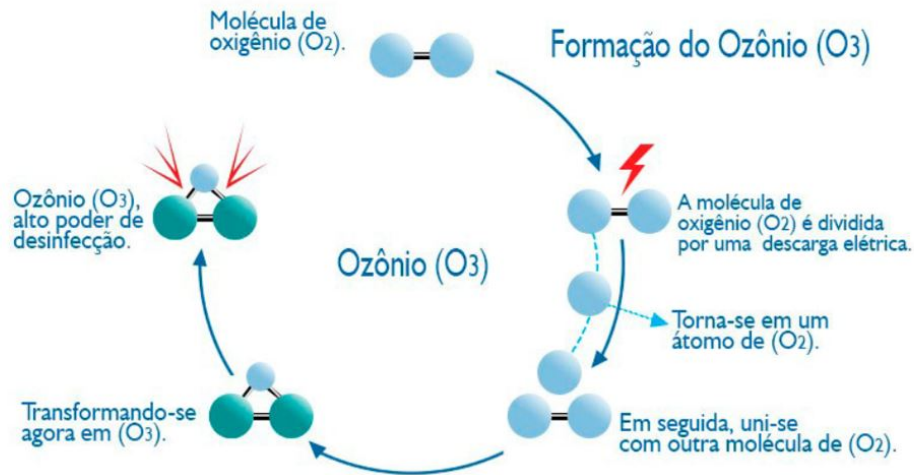


Figura 1: Formação do ozônio ( $O_3$ ) a partir da molécula de oxigênio ( $O_2$ ).

Fonte: Dr. Lair Ribeiro, 2013.

Tais características fizeram com que a OT fosse rapidamente incluída nas aplicações clínicas em odontologia, onde tem se mostrado disruptiva contra bactérias cariogênicas, além de contribuir na elevação do pH e favorecer a remineralização dental, contribuir na descontaminação das diferentes lesões infectadas (virais, fúngicas e bacterianas) e doença periodontal, facilitando o reparo tecidual (24).

Recentemente, Kronic et al. (25) concluíram que o efeito antibacteriano do ozônio nas bactérias residuais em lesão de cárie foi comparável à da clorexidina à 2%. Além disso, os autores apontam que ao tratar lesões cariosas profundas com uma técnica de remoção de cárie seletiva, o ozônio mostrou-se promissor como um desinfetante cavitário, sendo biocompatível e eficiente.

### **2.1.2 Formas de utilização**

Existem três formas principais para a utilização da OT: através do gás, da água e do óleo. A concentração de  $O_3$  no gás é maior do que a da água, que por sua vez, é maior do que a do óleo; enquanto a instabilidade segue o caminho inverso: óleo, água e gás. Na prática clínica discute-se a viabilidade de cada uma delas; onde tanto o gás quanto a água devem ser produzidos no momento do uso e, de acordo com a literatura, a partir de 10 minutos da colocação do gás na seringa, 10% do ozônio gerado já foi perdido. Com relação à água ozonizada, sua preservação é maior que o gás, deve ser mantida sobre refrigeração ( $20^{\circ}C$ ), podendo apresentar meia-vida de até 30 min, não havendo evidências sobre a possibilidade de armazenamento da solução (3,21). Em relação ao óleo, não existe ozônio em sua composição, apenas subprodutos que possuem as mesmas propriedades do ozônio em uma concentração menor, seu tempo de duração é o mais extenso pois mantém suas propriedades por até 2 anos desde que mantido sob refrigeração (1).

Independente da forma de utilização, a OT possui um efeito hormético, ou seja, é dose dependente. Em altas concentrações ele possui ação antimicrobiana, sendo eficaz contra microrganismos em geral. Para que o ozônio possa ter esse efeito antimicrobiano, é necessário que tenha contato físico com a película - membrana ou cápsula - do microrganismo. Ele se liga quimicamente com os ácidos graxos poli-insaturados que a compõe, provocando orifícios nesta película e, por esses orifícios, o conteúdo existente em seu interior acaba por extravasar levando o microrganismo à morte. Esse mecanismo de ação não desenvolve resistência bacteriana (1,21).

Em baixas concentrações o ozônio promove um stress oxidativo leve e transitório, modulando as reações do metabolismo, acelerando os processos de regeneração e auxiliando na regulação do sistema imune (21).

Nesse contexto, sua utilização deve ser realizada dentro de uma janela terapêutica, onde as concentrações e doses são consideradas seguras e eficazes. Para o uso sistêmico, as concentrações de  $O_3$  variam de  $1\mu g/ml$  até  $50\mu g/ml$ ; valores atualmente recomendados e definidos na 3ª Declaração de Madrid, um documento atualizado, redigido e aprovado na reunião internacional das Escolas de Ozonioterapia do mundo, realizada na Real Academia Nacional de medicina em Madrid no ano de 2020. Esta janela foi determinada após uma análise de mais de 3000 publicações

científicas de diversos países encontradas no site da *International Scientific Committee of Ozone Therapy (ISCO3)* (21).

Em revisão sistemática sobre o uso da OT em odontologia, pesquisadores canadenses pontuam que, enquanto estudos laboratoriais sugerem grande potencial do ozônio nas diferentes especialidades odontológicas, os estudos clínicos permanecem escassos e com baixo nível de evidência (19). Em concordância, recente revisão de literatura ressalta que a OT tem demonstrado potencial promissor como terapia alternativa ou complementar em diversas condições médicas; no entanto, as investigações clínicas em odontologia não tem correspondido com o mesmo potencial (24). Em ambas as publicações, os autores pontuam a necessidade de mais trabalhos científicos na área, em todas as especialidades odontológicas, especialmente no controle de bactérias resistentes, para que conclusões mais assertivas sejam levantadas.

## **2.2 *Enterococcus faecalis***

Microrganismos persistentes ou provenientes da cavidade oral são capazes de originar uma organização ecológica denominado biofilme, o qual pode prejudicar o sucesso do tratamento odontológico. Apesar das infecções odontogênicas serem de origem poli microbiana, o *E. faecalis* é a espécie bacteriana mais frequentemente isolada, principalmente em endodontia, presente na maioria dos canais com necessidade de retratamento endodôntico (26).

O gênero *Enterococcus* abrange diversas espécies, incluindo a *E. faecalis*, e compõe um grupo de bactérias gram-positivas, anaeróbias facultativas, que liberam metabólitos tóxicos e podem estar presentes em diversas doenças na cavidade bucal, tais como cárie, infecções endodônticas recorrentes e periodontite (27), a qual tem sido associada à casos de bacteremia, sepse e à endocardite bacteriana (28–30). Do ponto de vista microbiológico, os *Enterococcus* apresentam poucas exigências para o seu crescimento, são anaeróbios facultativos, possuem capacidade de crescer em temperatura de 10 a 45 °C, pH 9,6 em 6,5% de solução salina, e de sobreviver a 60 °C por 30 minutos (31).

O *E. faecalis*, sendo comum em infecções radiculares e muitas vezes não eliminado pelo tratamento endodôntico, pode resistir não somente no conduto

radicular, mas também no tecido ósseo circundante. Esta espécie pode inclusive permanecer no osso após a extração dentária e contaminar o implante após sua colocação no sítio infectado. De acordo com a literatura, tal colonização pode contribuir para a perda de fixação do implante ou perda óssea marginal. Além disso, é sabido que essa colonização, apesar de multibacteriana, a *E. faecalis* pode ser detectada e contribuir para o desenvolvimento da peri-implantite (15).

Embora *E. faecalis* não seja considerado um periodontopatógeno, esta espécie também tem sido mais frequentemente detectada em amostras subgengivais com periodontite do que em indivíduos periodontalmente saudáveis, sugerindo que as condições locais na periodontite podem favorecer sua colonização (14). Logo, é uma bactéria com importante impacto nas diferentes especialidades odontológicas e merece a nossa atenção.

### **2.3 Biofilme de *Enterococcus faecalis* e ozonioterapia**

Na prática clínica, diferentes tipos de agentes antimicrobianos vêm sendo usados na tentativa de eliminar a *E. faecalis*. O uso do hidróxido de cálcio por exemplo, já não oferece resultados satisfatórios, tendo sua resistência ao microrganismo identificada em decorrência ao efetivo sistema de bombeamento de prótons que mantém os níveis de pH citoplasmático ótimos, dificultando o tratamento endodôntico (27). Foram feitas tentativas de aumentar o poder bactericida do hidróxido de cálcio ao adicionar medicamentos como o monoclorafenol canforado e iodeto de potássio 2%, mostrando potencial de eliminação da bactéria, porém com a necessidade de permanecer em contato com a superfície dentária por 15 minutos, sendo clinicamente inviável como medicação intracanal. Além disso, a clorexidina, apesar de sabidamente apresentar boa eficácia contra a *E. faecalis*; seu efeito é diretamente dependente da concentração (15).

Em contrapartida, quando avaliamos o uso da OT, ainda são poucos e inconclusivos os estudos encontrados na literatura (32). O ozônio aquoso (ou água ozonizada), por exemplo, tem sido usado como irrigante convencional, como alternativa ao uso de produtos químicos de irrigação para tratamento endodôntico (33), assim como no tratamento de doenças periodontais (6).

Recentemente, Kushwah e colaboradores, em um estudo *in vitro*, compararam o uso da água ozonizada (24 µg/ml) com o laser de diodo de alta potência (980 nm) e solução de hipoclorito de sódio (3%) em cultura de *E. faecalis*. Como resultado, em ordem decrescente, identificaram que as amostras tratadas com água ozonizada foram as que apresentaram maiores concentrações do microrganismo, seguido do hipoclorito de sódio, laser e associação laser e água ozonizada, portanto, o procedimento menos eficaz foi o uso da água ozonizada, no entanto, ao ser associada ao uso do laser, apresentou os melhores resultados para a descontaminação (34).

Em outro estudo (35), o ozônio aquoso apresentou efeito antimicrobiano quase equivalente como hipoclorito de sódio a 2,5% quando usado como irrigante para tratamento endodôntico. Ao contrário, pesquisadores europeus avaliaram a potência da ação do ozônio no biofilme de *E. faecalis* e identificaram que seu efeito antibacteriano foi inferior ao hipoclorito de sódio (32).

Stoll e colaboradores (36) investigaram, *in vitro*, o efeito do gás ozônio em canais radiculares humanos inoculados com *E. faecalis*. Sua eficácia foi avaliada e comparada ao cloreto de sódio (controle negativo), peróxido de hidrogênio 3%, digluconato de clorexidina (CLX) 0,2%, NaOCl 1,5% e NaOCl 3% (controle positivo). Após o preparo químico-mecânico foi realizada a aplicação do gás ozônio e dos demais irrigantes tradicionais. Todos os grupos testados apresentaram redução do número de microrganismos comparados ao controle negativo sendo que o NaOCl 3% apresentou significativamente a menor concentração bacteriana. Os autores concluíram que o gás ozônio pode ser considerado um substituto para a desinfecção dos canais radiculares nos casos em que o NaOCl não está indicado.

Em revisão sistemática que analisa o uso da OT em odontologia, os autores pontuam importantes limitações da técnica, principalmente em decorrência da falta de trabalhos científicos mais bem delineados; no entanto demonstram que os resultados obtidos através de um ensaio clínico randomizado sugerem que não há diferença estatística entre o uso do ozônio e outras terapias utilizadas para a desinfecção dos canais radiculares (37).

Frente a esses estudos, é possível observar informações conflitantes, incompletas e inconclusivas na literatura sobre a ação da ozonioterapia no controle do biofilme e sobre a estabilidade das soluções de água ozonizada.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da água ozonizada recém produzida e congelada em diferentes temperaturas sobre biofilme bacteriano de *E. faecalis*.

#### 3.2 Objetivo específico

- Avaliar a atividade antimicrobiana da água ozonizada, na concentração de 3µg/ml, recém produzida sobre o biofilme de *E. faecalis*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da água ozonizada, na concentração de 3µg/ml, armazenada a -20°C e -80°C sobre o biofilme de *E. faecalis*.

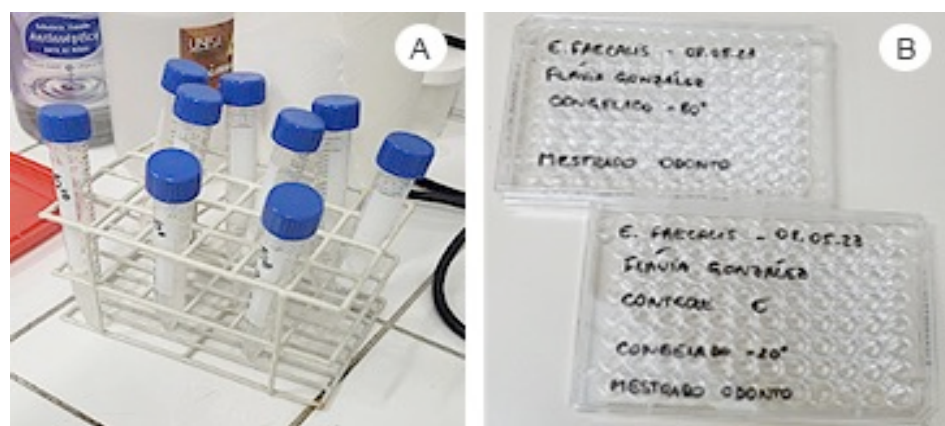
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Centro de Pesquisas da Unisa (Unisa Research Center – URC). Ressaltamos que, na primeira etapa do experimento, os espécimes e todos os demais materiais utilizados no experimento foram esterilizados a fim de evitar contaminação do experimento e isolamento de *E. faecalis*. Todo o experimento foi conduzido em câmara de fluxo laminar com seu interior previamente descontaminado com álcool 70%.

### 4.1 Cepas, condições de crescimento e preparo do biofilme

Foi utilizada a cepa padrão de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) cultivada em ágar Brain Heart Infusion (BHI) incubada a 37° por 24 horas.

Após esse período, o inóculo de *E. faecalis* foi realizado em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) até atingir a concentração final de  $10^7$  UFC/ml, com densidade óptica de  $1,278 \pm 0,05$  no comprimento de onda 760 nm no espectrofotômetro (20 Genesys™, da marca Thermo Spectronic, NY-EUA). Em seguida, as amostras foram diluídas até a concentração de  $10^6$  UFC/ml em caldo infusão BHI (COD. K25 – 1400 KASVI) (Figura 2A).



**Figura 2:** Organização inicial dos materiais. (A) Tubos Falcon, devidamente identificados e organizados em estante, contendo as diferentes diluições do inóculo em soro e caldo. (B)

Placas de 96 poços identificadas.

Fonte: O Autor (2023).

A partir da padronização do inóculo, foram pipetados 200 µl da diluição de *E. faecalis*, em cada poço da placa de 96 poços estéreis (Ref. 12-096 KASVI) (Figura 2B). A partir de então, as placas foram levadas novamente para a incubadora, onde permaneceram por 24 h a 37°C para obtenção do biofilme aderido (Figura 3).

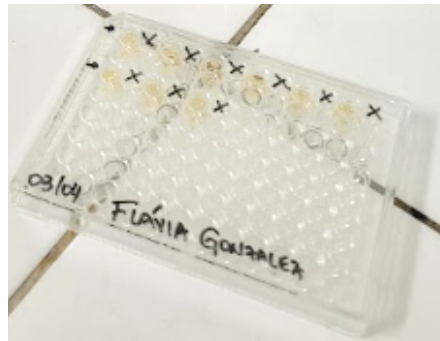


Figura 3: Placas com os poços após o período de incubação de 24 h.

Fonte: O Autor (2023).

#### **4.2 Grupos experimentais e protocolo de produção e armazenamento da água ozonizada**

Para avaliação do efeito da água ozonizada no biofilme foram designados 4 grupos experimentais, como descrito a seguir: grupo **Controle**, incluindo água bidestilada estéril (n=9); grupo **3µg**, incluindo água ozonizada na concentração de 3µg/ml recém produzida (n=9); grupo **3µg -20°C**, incluindo água ozonizada na concentração de 3µg/ml armazenada em freezer a -20° C (n=9); e grupo **3µg -80°C**, incluindo água ozonizada na concentração de 3µg/ml armazenada em freezer a -80° C (n=9). O experimento foi feito em triplicata.

Para o grupo Controle, utilizamos a água bidestilada estéril (Fresenius, SP, Brasil) refrigerada a 20°C. Para todos os demais grupos, os quais incluíram o tratamento com água ozonizada, o mesmo protocolo de produção foi realizado.

As amostras água ozonizada utilizadas no experimento foram produzidas utilizando um gerador de ozônio da empresa Ozone & Life (São José dos Campos, SP – Brasil), modelo O&L 1.5L RM nº de série 151180228. Uma mangueira de silicone unia o gerador a um Regulador de fluxo de oxigênio – empresa Ozone & Life (São

José dos Campos, SP – Brasil) nº 641230353 acoplado ao Cilindro de 3 L de oxigênio medicinal puro da empresa Oxigênio São Paulo (São Paulo – SP – Brasil) (Figura 4).



Figura 4: Gerador de ozônio (Ozone & Life), conectado ao cilindro de oxigênio medicinal com regulador de fluxo e coluna de vidro utilizados para ozonizar a água.

Fonte: O Autor (2023).

O ozônio produzido pelo gerador, de acordo com as recomendações do fabricante, foi direcionado a uma coluna de ozonização de água (Philozon, Balneário Camboriú – SC – Brasil) com dimensões de 850 mm e capacidade para 1 L de água acoplada ao gerador de ozônio. A coluna foi preenchida em seu volume total com água bidestilada estéril refrigerada a 16°C, mantida sob refrigeração até o momento do uso. A partir de então, o ozônio produzido pelo equipamento foi enviado diretamente à coluna de ozonização por meio da mangueira e foi dissolvido na água através da utilização de um difusor de cerâmica. O excesso de ozônio que chega ao topo da torre é direcionado a um destruidor evitando sua dispersão no meio ambiente.

O equipamento permaneceu fornecendo um fluxo contínuo de ozônio durante 5 minutos, para a obtenção da água ozonizada na concentração de 3 µg/ml, a qual foi confirmada por meio do kit colorimétrico com fotômetro dedicado SAM (Single Analyte Meters) Ozônio (I – 2019), com faixa de sensibilidade de 0,01 a 5,00 µg/ml (CHEMetrics, Midland, EUA) (Figura 4). Para tal, foram coletados 5 ml da água

ozonizada diluídos em 20 ml de água destilada pura, obtendo o volume total de 25 ml; desta forma a solução ficou dentro do nível de detecção do aparelho.

A partir de então, foram adicionadas 5 gotas da solução ativadora (A-7400) que, sendo à base de iodeto de potássio, reage produzindo uma solução de coloração rósea, sendo possível realizar sua leitura e confirmar a concentração do ozônio, onde o resultado determinado no display do equipamento foi multiplicado por 5, de acordo com a recomendação do fabricante (Figura 5).

Ressaltamos, ainda, que todos os equipamentos foram previamente revisados, calibrados e validados pelos próprios devidos fabricantes.



Figura 5: (A) Fotômetro e kit colorimétrico utilizado na pesquisa. (B) Confirmação da concentração do ozônio na água.

Fonte: O Autor (2023).

A partir da confirmação da concentração, parte da água ozonizada recém produzida foi imediatamente utilizada no experimento (grupo **3 $\mu$ g**). O restante da água foi alíquotada (6 ml) em microtubos de centrifugação com tampa previamente esterilizados. Ao todo, 6 microtubos contendo 1 ml de água ozonizada cada, foram divididos e identificados de acordo com a forma de armazenamento. Três microtubos foram armazenados em freezer a  $-20^{\circ}$  C e os outros 3 microtubos armazenados em freezer a  $-80^{\circ}$  C, ambos respeitaram o período de 30 dias congelados até o momento do uso no experimento.

### 4.3 Avaliação do efeito antimicrobiano da água ozonizada sobre biofilme de *E. faecalis*

#### 4.3.1 Tratamento e diluição das amostras

Após respeitar o período de incubação das placas, os espécimes foram levados à câmara de fluxo laminar e dispostos em superfície estéril, onde o caldo foi removido e o biofilme foi cuidadosamente lavado com 200 µL de solução salina fisiológica. Em seguida, 200 µL de água ozonizada foi depositada sobre o biofilme aderido no fundo do poço onde permaneceu agindo por 1 minuto.

O poço foi lavado novamente com 200 µL de solução salina, a fim de remover resquícios de água ozonizada. Na sequência, o mesmo volume de soro foi novamente acrescentado em cada um dos poços e o biofilme foi removido mecanicamente com a ponteira da pipeta. O conteúdo dos poços foi transferido para microtubos previamente esterilizados contendo 900 µL de solução salina estéril, e serviram de matriz para uma diluição seriada de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . O microtubo da “diluição 1” recebeu 100 µL da solução matriz; o microtubo da “diluição 2” recebeu 100 µL da “diluição 1”; a “diluição 3” recebeu 100 µL da “diluição 2” repetindo esse mesmo processo até chegar à “diluição 5” (Figura 6).

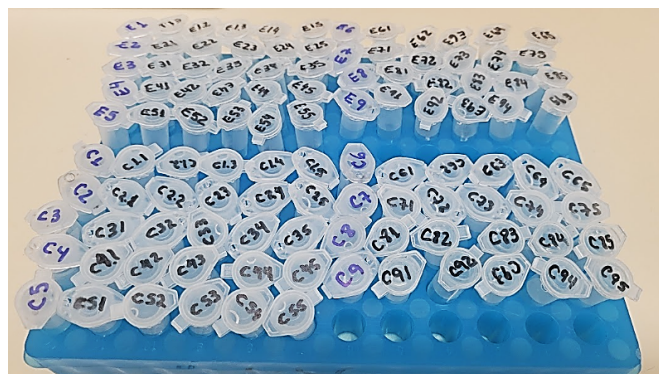


Figura 6: Microtubos identificados para diluição seriada.

Fonte: O Autor (2023).

Para os grupos **3µg -20°C** e **3 µg -80°C**, as amostras foram utilizadas após completo descongelamento, o qual ocorreu após permanecerem por 10 minutos em temperatura ambiente. Para o grupo Controle, como já descrito acima, não foi utilizada a água ozonizada, mas sim a água bidestilada, respeitando a mesma sequência e tempos experimentais dos demais grupos.

#### **4.3.2 Plaqueamento e contagem de colônias**

Alíquotas de 10 µL das diluições seriadas foram transferidas para as placas de petri (90 x 15mm Kasvi – cod K30-9015RI) contendo como meio de cultura o Ágar Bile Esculina Azida (enterococosele modificado) (Cód. 200020 – Biologic), previamente identificadas de acordo com o grupo experimental e diluição. Na sequência, as placas foram inclinadas em um ângulo de aproximadamente 45°, de forma com que a gota percorresse a placa deixando um rastro vertical sobre o meio de cultura (Figura 7). As placas permaneceram sobre a bancada, em temperatura ambiente, por 15 a 20 minutos e então, invertidas e incubadas a 37° C por 24 horas.

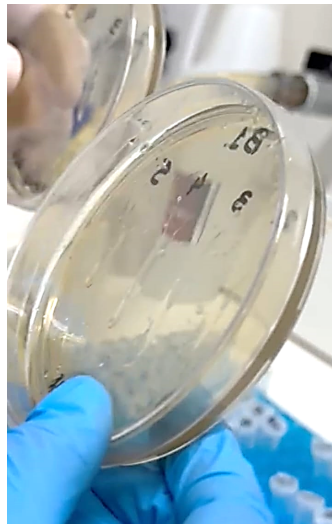


Figura 7: Plaqueamento pela técnica de gotas.

Fonte: O Autor (2023).

Passado esse período, as placas foram removidas da estufa (Figura 8), fotografadas e as colônias contadas em todas as diluições que apresentaram valores entre 3 e 33 unidades formadoras de colônias (UFC).

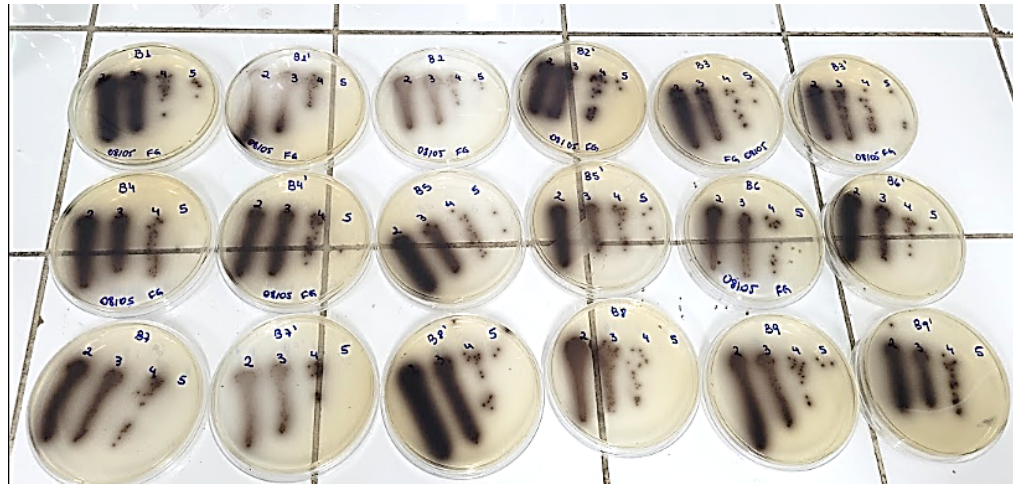


Figura 8: Placas, em duplicata, organizadas para a contagem de UFC.

Fonte: O Autor (2023).

#### 4.4 Análise dos resultados

Ao término dos experimentos microbiológicos, os dados obtidos foram tabulados em planilha Excel (Microsoft Corporation, EUA), e o valor final de contagem UFC por ml foi calculado a partir da média do número de colônias, em duplicata, considerando o valor da diluição.

Os dados foram então submetidos a análise estatística através do software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Foram utilizados os testes de normalidade e homocedasticidade, Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados não normais foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O nível de significância considerado para todos os testes foi de 5%.

## 5 RESULTADOS

Todos os resultados foram baseados nas médias de UFC/ml de todas as coletas e amostras, para os diferentes grupos experimentais.

O grupo **Controle** mostrou uma média de crescimento de  $1,19 \times 10^7$ , enquanto o grupo **3 $\mu$ g** apresentou  $2,62 \times 10^7$ , não havendo diferença estatística entre os grupos. No entanto, os demais grupos experimentais foram estatisticamente diferentes do grupo **controle**, onde o grupo **3 $\mu$ g-20°C** apresentou  $1,88 \times 10^7$  ( $p=0,008$ ) e o grupo **3 $\mu$ g-80°C** apresentou  $0,74 \times 10^7$  ( $p=0,03$ ), onde o grupo **3 $\mu$ g-20°C** se mostrou menos eficaz que o controle e o grupo **3 $\mu$ g-80°C** mais eficaz (Tabela 1 e Gráfico 1).

Tabela 1: Média de UFC/ml do E. faecalis nos diferentes grupos experimentais.

<b>Grupos amostras</b>	<b>Controle</b>	<b>3 <math>\mu</math>g</b>	<b>3<math>\mu</math>g -20°c</b>	<b>3<math>\mu</math>g -80°c</b>
1	4.583.333,33	6.666.666,67	17.500.000	5.833.333,33
2	12.916.666,7	7.500.000	21.250.000	6.666.666,67
3	22.916.666,7	41.666.666,7	15.000.000	15.833.333,3
4	10.416.666,7	50.000.000	33.333.333,3	8.750.000
5	7.083.333,33	37.500.000	19.583.333,3	5.833.333,33
6	12.916.666,7	10.833.333,3	12.083.333,3	6.666.666,67
7	12.083.333,3	29.166.666,7	20.000.000	6.666.666,67
8	13.333.333,3	18.750.000	15.000.000	5.833.333,33
9	11.666.666,7	34.166.666,7	15.833.333,3	4.583.333,33
<b>MÉDIA (DP)</b>	<b>11.990.740,74</b> <b>(<math>\pm 5.055.154,9</math>)</b>	<b>26.250.000</b> <b>(<math>\pm 15.923.536,9</math>)</b>	<b>18.842.592,59</b> <b>(<math>\pm 6.161.800,5</math>)</b>	<b>7.407.407,41*</b> <b>(<math>\pm 3.351.369,1</math>)</b>

\*Diferença estatística ( $p < 0,05$ ). DP, desvio padrão. Fonte: O Autor (2023).

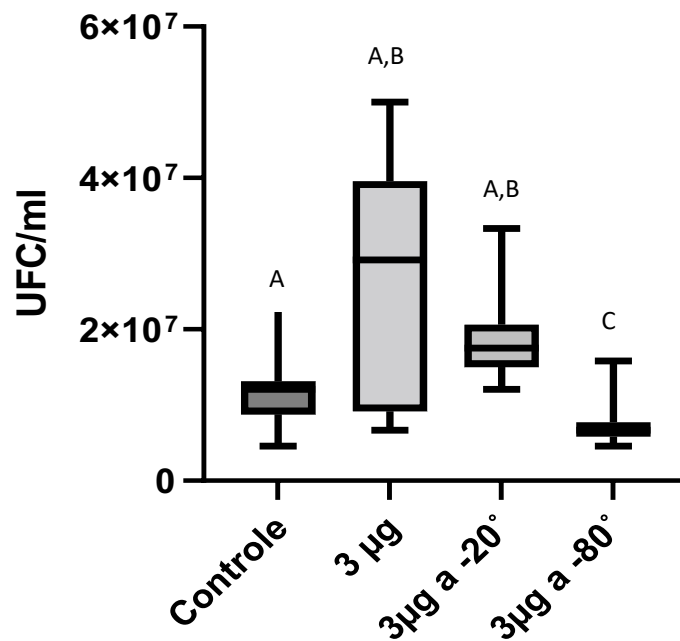


Gráfico 1: Representação gráfica das diferentes média de UFC/ml do *E. faecalis*, para os respectivos grupos experimentais. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Fonte: O Autor (2023).

Ao comparar o grupo **3 µg-20°C** com o grupo **3 µg**, não encontramos diferença estatística ( $p=0,47$ ). No entanto, o grupo **3 µg-80°C** foi o que apresentou a maior atividade antimicrobiana entre os grupos experimentais, sendo estatisticamente diferente de todos os demais grupos **3 µg** ( $p=0,0013$ ) e **3 µg -20°C** ( $p=0,0003$ ).

## 6 DISCUSSÃO

A eliminação do biofilme bacteriano de *E. faecalis* é um desafio em função da sua complexidade estrutural, capacidade de se estabelecer em superfícies de difícil acesso e resistência aos agentes antimicrobianos. Terapias alternativas ou coadjuvantes vêm sendo propostas com o objetivo de complementar ou até substituir os tratamentos convencionais e, neste contexto, a OT vem sendo estudada em diferentes concentrações e formas de apresentação (19).

No presente estudo, a atividade antibacteriana da água ozonizada foi testada em biofilme de *E. faecalis*, sendo válido ressaltar que a complexidade de inativação de biofilmes bacterianos tende a ser maior quando comparada a formas planctônicas. No entanto, o uso do biofilme tem sido considerado útil e conveniente para avaliar novos agentes antimicrobianos (32).

Ao testarmos a água ozonizada na concentração de 3 µg/ml, avaliada em diferentes temperaturas de armazenamento, observamos que tais variações parecem não possibilitar a eliminação completa do biofilme de *E. faecalis*. No entanto, o **3µg - 80°C**, o qual contempla o armazenamento em freezer -80°C, se mostrou promissor ao apresentar maior redução bacteriana.

Achados recentes de literatura tem nos levados a entender que a temperatura da água pode interferir na validade do produto. Em um estudo de conclusão de curso (38), pesquisadores brasileiros identificaram que a manutenção da água ozonizada em temperatura próxima a 0°C foi capaz de manter a solução estável por 2 horas. Apesar de ainda parecer um tempo restrito, os autores pontuam um ganho satisfatório, uma vez que em temperatura ambiente sua estabilidade se mantém em até 30 minutos. Ao estudar diferentes formas de armazenamento do gás de ozônio, Nakajima et al. (39,40), também identificou que baixas temperaturas (a partir de - 8°C) parecem eficazes (41).

Além do tempo e temperatura de armazenamento, a concentração da água ozonizada é igualmente importante para que a solução seja capaz de desencadear respostas celulares e microbiológicas, exercendo seu efeito terapêutico (33). Ao analisarmos a concentração da água ozonizada utilizada em nosso experimento, nossos resultados vão de acordo aos apresentados por Estrela et al. (42), os quais

também avaliaram o efeito da água ozonizada em baixa concentração em cultura de *E. faecalis* e não identificaram efeito antibacteriano com a solução.

Com uma metodologia semelhante, Borges et al. avaliaram o efeito antimicrobiano de diferentes concentrações de ozônio (0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 8 µg/ml) em diferentes microrganismos plactônicos (*Candida Albicans* e *Staphylococcus aureus*), porém nenhuma das concentrações testadas apresentou potencial antimicrobiano (17).

Outro grupo de pesquisadores, ao avaliar o efeito da água ozonizada em baixa concentração (0,01 µg/ml) em cultura de *Candida Albicans* e *Streptococos mutans*, *Sadatullah* associou a ação mecânica durante o enxágue com a água ozonizada e observou eficácia do ozônio em fungos e bactéria sem alcançar sua eliminação total. Discute-se, ainda, que possivelmente a ação mecânica do enxágue utilizado sobre as superfícies contaminadas tenha contribuído na eficácia nos resultados (36).

Em geral, os estudos *in vitro* apresentam resultados conflitantes sobre a eficácia da OT na eliminação de microrganismos, incluindo o *E. faecalis*. Enquanto trabalho citados acima e autores como Hems et al. (43) observaram que a água ozonizada apresenta efeito antimicrobiano inferior ao hipoclorito de sódio em cultura de *E. faecalis*; outros grupos de pesquisadores, incluindo Nagayoshi et al. (35), Hubbezoglu et al. (44) e Pinheiro et al. (45) demonstraram que a água ozonizada pode apresentar uma capacidade de eliminação de microrganismos similar ao hipoclorito de sódio.

Pesquisadores brasileiros, ao avaliarem o efeito antimicrobiano da água ozonizada (0,5 µg/ml, 2,4 µg/ml, e 4,4 µg/ml) em diferentes tempos de ação (1, 5 e 10 min) em *Salmonela heidelberg*, observaram que a concentração mais alta de ozônio na solução apresentou maior ação inibitória ao crescimento da cepa bacteriana(46). Nesse sentido, Agostini et al. avaliaram concentrações ainda mais altas do ozônio em solução aquosa (20µg/ml, 40 µg/ml e 60 µg/ml) em biofilme de *E. faecalis* e observaram que todas as concentrações foram eficazes no controle microbiano, independente do tempo de ação, reforçando a teoria que elevadas concentrações possuem eficácia (47). Ainda assim, dados da literatura permanecem inconclusivos na determinação da dose mínima e tempo de ação ideais para alcançarmos efetivo efeito antimicrobiano.

Os resultados encontrados no presente estudo se mostram promissores para o uso da água ozonizada armazenada em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  na redução de colônias de *E. faecalis*. Ainda que seja um estudo *in vitro*, nossos achados devem contribuir no direcionamento de estudos *in vivo*, em animais e seres humanos, até que seja possível sua utilização na prática clínica.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e considerando as limitações do estudo, podemos concluir que:

1. A água ozonizada na concentração de 3 µg/ml recém produzida e armazenada em freezer -20°C não foram efetivas para a redução no número de colônias de *E. faecalis*;
2. O armazenamento da água ozonizada na concentração de 3 µg/ml em freezer -80°C foi eficaz na redução de colônias de *E. faecalis*.

## REFERÊNCIAS

1. Bocci V. OZONE A New Medical Drug. Springer Science & Business Media; 2005. 336 p.
2. Azuma K, Mori T, Kawamoto K, Kuroda K, Tsuka T, Imagawa T, et al. Anti-inflammatory effects of ozonated water in an experimental mouse model. *Biomed Rep.* setembro de 2014;2(5):671–4.
3. Seki M, Ishikawa T, Terada H, Nashimoto M. Microbicidal Effects of Stored Aqueous Ozone Solution Generated by Nano-bubble Technology. *Vivo Athens Greece.* 2017;31(4):579–83.
4. Tomiyasu H, Fukutomi H, Gordon G. Kinetics and mechanism of ozone decomposition in basic aqueous solution. *Inorg Chem.* 1º de setembro de 1985;24(19):2962–6.
5. Vieira VSJG, da Rosa ÂR, Montagner PG, de Campos FUF, Teixeira LN, Aura JM, et al. Effect of ozone therapy on the modulation of inflammation and on new bone formation in critical defects of rat calvaria filled with autogenous graft. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 21 de setembro de 2022;S2468-7855(22)00281-6.
6. Rajeshwaran N, Malaiappan S. Assessment of Bacterial Micro Colonies Present in Tissue Samples Obtained Using Ozonated Water as an Irrigating Agent from Patients with Periodontitis. *J Pharm Res Int.* 26 de agosto de 2020;90–7.
7. Mohammadi Z, Shalavi S, Soltani MK, Asgary S. A review of the properties and applications of ozone in endodontics: an update. *Iran Endod J.* 2013;8(2):40–3.
8. Di Fede O, Canepa F, Panzarella V, Mauceri R, Del Gaizo C, Bedogni A, et al. The Treatment of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ): A Systematic Review with a Pooled Analysis of Only Surgery versus Combined Protocols. *Int J Environ Res Public Health.* 10 de agosto de 2021;18(16):8432.
9. Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith NL, et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res.* setembro de 2019;9(3):163–7.
10. Daw K, Baghdayan AS, Awasthi S, Shankar N. Biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol.* julho de 2012;65(2):270–82.
11. Gondil VS, Subhadra B. Biofilms and their role on diseases. *BMC Microbiol.* 31 de julho de 2023;23(1):203.
12. Taji A, Heidari H, Ebrahim-Saraie HS, Sarvari J, Motamedifar M. High prevalence of vancomycin and high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolates. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 1º de junho de 2019;66(2):203–17.

13. Gök ŞM, Türk Dağı H, Kara F, Arslan U, Fındık D. [Investigation of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Clinical Samples]. *Mikrobiyol Bul.* janeiro de 2020;54(1):26–39.
14. Chidambar CK, Shankar SM, Raghu P, Gururaj SB, Bushan KS. Detection of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilms of healthy, gingivitis, and chronic periodontitis subjects. *J Indian Soc Periodontol.* 2019;23(5):416–8.
15. Flanagan D. *Enterococcus faecalis* and Dental Implants. *J Oral Implantol.* fevereiro de 2017;43(1):8–11.
16. Oldoini G, Frabattista GR, Saragoni M, Cosola S, Giammarinaro E, Genovesi AM, et al. Ozone Therapy for Oral Palatal Ulcer in a Leukaemic Patient. *Eur J Case Rep Intern Med.* 14 de janeiro de 2020;7(2):001406.
17. Borges GÁ, Elias ST, da Silva SMM, Magalhães PO, Macedo SB, Ribeiro APD, et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. *J Cranio-Maxillo-fac Surg Off Publ Eur Assoc Cranio-Maxillo-fac Surg.* março de 2017;45(3):364–70.
18. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* janeiro de 2011;2(1):66–70.
19. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent.* fevereiro de 2008;36(2):104–16.
20. Pchepiorka R, Moreira MS, Lascane NADS, Catalani LH, Allegrini Jr S, De Lima NB, et al. Effect of ozone therapy on wound healing in the buccal mucosa of rats. *Arch Oral Biol.* novembro de 2020;119:104889.
21. FQ. Madrid Declaration on Ozone Therapy (3rd edition) ISCO3 [Internet]. ISCO 3. [citado 5 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://isco3.org/madrid-declaration-on-ozone-therapy-3rd-edition-isco3/>
22. Silva, Luiz Inácio Lula da. Lei Autoriza a ozonioterapia no território nacional - LEI Nº 14.648 DE 04 DE AGOSTO DE 2023. 14.648.
23. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* fevereiro de 2004;13(1):3–11.
24. El Meligy OA, Elemam NM, Talaat IM. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry: A Review of the Literature. *Dent J.* agosto de 2023;11(8):187.
25. Krunić J, Stojanović N, Đukić L, Roganović J, Popović B, Simić I, et al. Clinical antibacterial effectiveness and biocompatibility of gaseous ozone after incomplete caries removal. *Clin Oral Investig.* fevereiro de 2019;23(2):785–92.
26. Almeida J de, Santos GV, Orsi MT, Cechella BC, Bernardi AV, Felipe WT. Tratamento do biofilme intracanal de *Enterococcus faecalis* com suspensões de diferentes nanopartículas e irrigantes convencionais. *Arq Em Odontol.* março de 2015;51(1):32–8.

27. Paradella TC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Rev Odontol UNESP*. 2007;163–8.
28. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. janeiro de 1998;31(1):1–7.
29. Sridhar S, Wang F, Wilson TG, Palmer K, Valderrama P, Rodrigues DC. The role of bacterial biofilm and mechanical forces in modulating dental implant failures. *J Mech Behav Biomed Mater*. abril de 2019;92:118–27.
30. Heidari H, Hasanpour S, Ebrahim-Saraie HS, Motamedifar M. High Incidence of Virulence Factors Among Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates in Southwestern Iran. *Infect Chemother*. março de 2017;49(1):51–6.
31. Skowron K, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Gryń G, Śrutek M, Gospodarek-Komkowska E. Efficacy of radiant catalytic ionization to reduce bacterial populations in air and on different surfaces. *Sci Total Environ*. 1º de janeiro de 2018;610–611:111–20.
32. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. janeiro de 2005;38(1):22–9.
33. Nogales CG, Ferreira MB, Montemor AF, Rodrigues MF de A, Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological - ex vivo study and cytotoxicity analyses. *J Appl Oral Sci Rev FOB*. dezembro de 2016;24(6):607–13.
34. Kushwah J, Mishra R, Bhadauria V. Antibacterial Efficacy of Sodium Hypochlorite, Ozonated Water, and 980 nm Diode Laser Used for Disinfection of Root Canal against *Enterococcus faecalis*: A Microbiological Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2020;13(6):694–9.
35. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*. novembro de 2004;30(11):778–81.
36. Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study. *Quintessence Int Berl Ger* 1985. março de 2008;39(3):231–6.
37. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. *Int Endod J*. 2020;53(3):317–32.
38. Pigossi K de S. Efeito de diferentes tempos de ozonização e temperaturas sobre a viabilidade de água ozonizada para fins terapêuticos em odontologia. 2019 [citado 17 de setembro de 2023]; Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/238880>

39. Nakajima T, Kudo T, Ohmura R, Takeya S, Mori YH. Molecular storage of ozone in a clathrate hydrate: an attempt at preserving ozone at high concentrations. *PLoS One*. 2012;7(11):e48563.
40. Nakajima T, Akatsu S, Ohmura R, Takeya S, Mori YH. Molecular storage of ozone in a clathrate hydrate formed from an O<sub>3</sub>+O<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub> gas mixture. *Angew Chem Int Ed Engl*. 24 de outubro de 2011;50(44):10340–3.
41. Follmann P. Estudo Teórico da Interação “Host-Guest” em Modelos de Clatratos [Dissertação (Mestrado em físico-química)]. [Florianópolis - SC]: Universidade Federal de Santa Catarina; 2015.
42. Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J*. fevereiro de 2007;40(2):85–93.
43. Huth K, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K, et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci*. 1º de junho de 2011;119:204–10.
44. Hubbezoglu I, Zan R, Tunc T, Sumer Z. Antibacterial Efficacy of Aqueous Ozone in Root Canals Infected by *Enterococcus faecalis*. *Jundishapur J Microbiol*. julho de 2014;7(7):e11411.
45. Pinheiro SL, Silva CC da, Silva LA da, Cicotti MP, Bueno CE da S, Fontana CE, et al. Antimicrobial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, and ozonated water as irrigants in mesiobuccal root canals with severe curvature of mandibular molars. *Eur J Dent*. 2018;12(1):94–9.
46. de Paula Nascente E, Rauecker ÚN, Teles AV, do Amor Divino LD, Chagas SR, Elias LM, et al. Inactivation of Multidrug-Resistant *Salmonella Heidelberg* Isolated from Pigs by Ozonated Water under Different Conditions. *Ozone Sci Eng*. 4 de julho de 2022;44(4):363–71.
47. Agostini F, Faccini M, Fitarelli F, Ortiz MAL, Salmeron S, Oliveira RCG, et al. In Vitro Comparison of Antibacterial Effect of Ozonated Water and Ozonated Gas. *Ozone Sci Eng*. 4 de julho de 2021;43(4):394–400.