



**CENTRO UNIVERSITÁRIO INGÁ - UNINGÁ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO GERAL DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

FELIPE AGOSTINI

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO OZÔNIO

MARINGÁ

2019

PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO GERAL DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA

FELIPE AGOSTINI

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO OZÔNIO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Maria Salvatore de Freitas

MARINGÁ

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me acompanharam nesta jornada difícil, mas extremamente recompensante:

À minha esposa Michele Turra Agostini, por ter sempre me apoiado, ter sempre estado ao meu lado. Seu apoio em todos os momentos difíceis foi simplesmente essencial para que eu conseguisse ter dado mais este passo profissional. Te amo.

Ao meu filho Davi, você é a minha luz! Tudo isto é para você meu anjo.

Aos meus pais, Nair e Fiore, que sempre estiveram presentes, sempre disponíveis a ajudar de qualquer forma necessária. Vocês são demais!!

Aos meus irmãos Anderson e Marcelo, meus anjos da guarda, este trabalho é de vocês também.

Aos colegas de mestrado, Bruno, Icris, Paula, Ellen, Carol, Hugo, Alexandre e Tito, obrigado por todos os momentos em que precisei de vocês, e todos prontamente me “abraçaram”. Não esquecerei vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Benedito de Oliveira, reitor do Centro Universitário Ingá UNINGÁ;

Ao Dr. Roberto Cezar de Oliveira, presidente da mantenedora;

À Profa. Maria Albertina Ferreira do Nascimento, pró-reitora de Ensino do Centro Universitário Ingá UNINGÁ;

À Profa. Dra. Suzimara dos Reis Gea Osório, coordenadora do curso de graduação em Odontologia do Centro Universitário Ingá UNINGÁ;

À Profa. Dra. Karina Maria Salvatore de Freitas, coordenadora do Mestrado em Odontologia do Centro Universitário Ingá UNINGÁ. Meu mais sincero agradecimento por ter dedicado seu tempo para me ajudar a resolver todos os percalços encontrados no caminho, e por provar que em momentos difíceis, devemos erguer a cabeça e trabalhar mais duro ainda, que tudo se resolve.

Aos professores Rodrigo Hermont Cançado e Fabrício Pinelli Valarelli, muito obrigado pela dedicação em passar adiante seu conhecimento de forma aberta e transparente, nos estimulando a buscar nossos sonhos, por mais difíceis que eles sejam.

Ao professor José Ricardo Mariano, por ter acreditado em minha pesquisa desde o primeiro momento, e me estimulado a participar de congressos para divulgar este estudo.

À professora Mariana Aparecida Lopez-Ortiz, obrigado pelas horas em que passamos fazendo amostras e por ter acreditado na Ozonioterapia. Você foi essencial para a realização deste trabalho.

À minha colega ozonioterapeuta Melissa Faccini, colaboradora deste projeto. Obrigado por ter tirado seu tempo com a família para me ajudar a realizar esta pesquisa e escrever esta dissertação. Muito obrigado!

Aos meus colegas Alexandre Algarve e Francisco Fitarelli, por terem me convencido a participar deste mestrado, por terem me feito sair de minha zona de conforto, e terem descoberto junto comigo este mundo maravilhoso da pesquisa. Abraço irmãos.

Aos professores Carlos Goes Nogales e Sérgio Bruzadelli Macedo por terem me apresentado o mundo da Ozonioterapia, e tê-lo defendido com unhas e dentes.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o potencial antimicrobiano do Ozônio, nas formas de gás e água ozonizada, em diferentes concentrações e em diferentes tempos de exposição, contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. **Material e Métodos:** O experimento foi realizado separadamente para cada microrganismo: *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Para cada bactéria, foram utilizadas dez placas de petri: 5 placas nas quais as bactérias foram inoculadas após o contato com a água ozonizada e 5 com gás ozônio. Cada uma das placas recebeu os microrganismos. 5 tiveram o contato com a água ozonizada e 5 com o gás ozônio. Cada uma das placas foi dividida em seis partes, contendo três concentrações do ozônio (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL), e os diferentes tempos de exposição (1 e 2 minutos). Também foi feita uma placa de controle, com cinco divisões, que recebeu bactérias que não tiveram contato com nenhum tipo de produto (controle positivo). Além disso, uma placa, dividida de forma semelhante, recebeu bactérias, com exposição à clorexidina a 2%, com 5 divisões (controle negativo). Os grupos foram comparados de acordo com a quantidade de UFCs formadas em cada combinação tempo/tratamento. Realizou-se uma comparação estatística entre as concentrações, o tempo de exposição e o tipo de aplicação de ozônio, utilizando-se os testes ANOVA multifatorial, ANOVA a um critério, teste de Tukey e teste t independente para a comparação intergrupos. **Resultados:** Para o microrganismo *Staphylococcus aureus*, houve diferença estatisticamente significativa apenas com relação à concentração de ozônio, sendo que as concentrações de 40 e 60 µg/mL se mostraram mais eficazes na redução de UFCs do que a de 20 µg/mL. Para o microrganismo *Enterococcus faecalis*, houve diferença significativa entre o tipo de concentração e o tipo de aplicação do ozônio, sendo que as concentrações de 40 e 60 µg/mL se mostraram mais eficazes que a concentração de 20 µg/mL, e o gás se mostrou mais eficaz que a água. Para ambos os microrganismos, quando comparadas aos grupos controle, todas as concentrações de ozônio se mostraram eficazes na redução das bactérias de forma similar à clorexidina. **Conclusões:** O ozônio se mostrou eficaz na redução de bactérias tanto na forma de gás como na forma de água, em todas as concentrações e tempos testados. Quando comparadas entre si, as concentrações de 40 e 60 µg/mL

se mostraram mais eficazes que a concentração de 20 µg/mL. Para o microrganismo *Enterococcus faecalis*, o gás ozônio se mostrou mais eficaz que a água ozonizada.

Palavras-chave: Ozônio; Ação antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTION OF OZONE

Objective: To evaluate the antimicrobial potential of ozone, in ozonated water and gas forms, at different concentrations and at different exposure times, against strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. **Material and Methods:** The experiment was performed separately for each microorganism: *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. For each bacterium, ten petri dishes were used: 5 had contact with the ozonated water and 5 with the ozone gas. Each plate was divided into six parts, containing three concentrations of ozone (20 µg / mL, 40 µg / mL and 60 µg / mL), and the different exposure times (1 and 2 minutes) for each concentration. A control plate was also made for each bacterium, with five divisions, without receiving any type of product (positive control). In addition, one plaque was used for each bacterium, with exposure to chlorhexidine 2%, with 5 divisions. A statistical comparison was made between concentrations, time of exposure and type of ozone application, using the multivariate ANOVA test, one-way ANOVA, Tukey and independent t tests for intergroup comparisons. **Results:** For the microorganism *Staphylococcus aureus*, there was a statistically significant difference only with respect to the concentration of ozone, and the concentrations of 40 and 60 µg/mL were more effective than the 20 µg/mL. For the microorganism *Enterococcus faecalis*, there was a significant difference between the type of concentration and the type of ozone application, with concentrations of 40 and 60 µg/mL being more effective than the concentration of 20 µg/mL and the gas being more effective than water. For both microorganisms, when compared to the control groups, all concentrations of ozone were shown to be effective in reducing bacteria similarly to the chlorhexidine. **Conclusions:** Ozone was effective in reducing bacteria both in the form of gas and water at all concentrations and times tested. When compared among them, the concentrations of 40 and 60 µg/mL were more effective than the concentration of 20 µg/mL. For the microorganism *Enterococcus faecalis*, ozone gas was more effective than ozonated water.

Keywords: Ozone; Antimicrobial action; *Staphylococcus aureus*; *Enterococcus faecalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Placa com 6 divisões – Água Ozonizada	27
Figura 2	- Placa com 6 divisões – Gás Ozônio.....	28
Figura 3	- Placa com 5 divisões – Controle Positivo.....	28
Figura 4	- Placa com 5 divisões – Controle Negativo	29
Figura 5	- Gerador de Ozônio; Coluna para ozonização da água	30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados da comparação entre o tempo, tipo de aplicação e concentração, para o microrganismo *Staphylococcus aureus* (Anova multifatorial; tempo - 1 e 2 minutos, tipo de aplicação de ozônio – água e gás, e concentração - 20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL)..... 34
- Tabela 2 - Resultados da comparação entre 3 concentrações de ozônio (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey). 34
- Tabela 3 - Resultados da comparação entre as 3 concentrações de ozônio e o grupo controle positivo e grupo Clorexidina (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey). - 34
- Tabela 4 - Resultados da comparação entre o tempo, tipo de aplicação e concentração, para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (Anova multifatorial; tempo - 1 e 2 minutos, tipo de aplicação de ozônio – água e gás, e concentração - 20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL). 35
- Tabela 5 - Resultados da comparação entre as os tipos de aplicação de ozônio (água ou gás) (teste t independente). 35
- Tabela 6 - Resultados da comparação entre as 3 concentrações de ozônio (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey). 35
- Tabela 7 - Resultados da comparação entre as 3 concentrações de ozônio e o grupo controle positivo e grupo Clorexidina (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey). 36
-
-

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
mL	mililitros
µg/mL	microgramas / mililitros
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
O ₃	Ozônio
O ₂	Oxigênio
ppm	partes por milhão
mV	milivolts
N ₂ O ₂	dióxido de nitrogênio
HNO ₃	Ácido Nítrico
HaCat	Ceratinócito
L- 929	fibroblasto de rato
CO ₂	Gás Carbônico
DMEM	Dulbecco modification of Minimum Essential Media
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
L/min	Litros / minuto
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
µL	microlitros
mm	milímetros
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia / mililitros
mg/L	Miligramas / Litro
ONU	Organização das Nações Unidas
CH	Clorexidina
SH	Hipoclorito de Sódio
HeLa	Cultured Human Epithelial Cells

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Aspectos de Biossegurança.....	15
2.2	Características Gerais do Ozônio	17
2.2.1	Histórico.....	17
2.3	Ação Antimicrobiana do Ozônio.....	19
3	PROPOSIÇÃO.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1	Preparo do Inóculo.....	26
4.2	Plaqueamento.....	27
4.3	Preparo da Água Ozonizada.....	29
4.4	Teste da Ação do Gás Ozônio.....	31
4.5	Análise Estatística.....	31
5	RESULTADOS	33
6	DISCUSSÃO.....	38
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Todos os dias em nossa prática odontológica, entramos em contato com uma diversidade muito grande de bactérias. A cavidade bucal, por si só, representa um ecossistema com condições ideais para vários microrganismos e é considerada o local de maior concentração dos mesmos, expondo profissionais e pacientes aos riscos biológicos (DUTRA et al., 2008). As questões relativas ao controle de infecção de biossegurança passaram a ter novo enfoque, já que não eram vistas de forma tão crítica como são agora (WOO et al., 1992).

Na prática ortodôntica, tem-se aumentado a preocupação com o controle de infecções, após o aumento da incidência de doenças como AIDS, hepatites B e C (KNORST; FINIZOLA FILHO; SALGADO JÚNIOR, 1999), estando os ortodontistas classificados como a segunda incidência mais alta de hepatite B entre os profissionais da Odontologia (GANDINI JUNIOR et al., 1997; STARNBACH; BIDDLE, 1980). Para diminuir estes riscos, existem precauções para evitar a contaminação microbiana no ambiente do consultório odontológico. A clorexidina, por exemplo, é uma substância química que foi introduzida há muitos anos como antisséptico de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e negativas (DAVIES et al., 1954). Em odontologia, a solução alcóolica de clorexidina surgiu como desinfetante de campo cirúrgico e de canais radiculares (CAWSON; CURSON, 1959), sendo também utilizada para redução do número de bactérias da cavidade bucal (DENARDI, 1994; NOGALES et al., 2008).

Apesar de seu efeito antimicrobiano comprovado, tem-se aumentada a busca por substâncias biocompatíveis com a microbiota oral, alcançando o objetivo de eliminar possíveis infecções, e ao mesmo tempo, não ter redução na viabilidade celular. O efeito citotóxico de substâncias antimicrobianas, como a clorexidina 2 %, hipoclorito de sódio 0,2%, peróxido de hidrogênio 3% e o antibiótico metronidazol foi avaliado sobre células epiteliais orais humanas (BHY) e fibroblastos de gengiva (HGF-1), tendo como resultado alta toxicidade da clorexidina para as células BHY, e redução da viabilidade celular tanto na utilização do hipoclorito como do peróxido de hidrogênio (HUTH et al., 2006).

Em 1873, com a descoberta de sua capacidade de eliminar microrganismos, o ozônio (O_3) passou a ser aplicado para desinfecção no tratamento de água e resíduos em redes de esgoto (BOCCI, 2008). O ozônio é uma molécula triatômica, de estrutura cíclica com alto poder oxidativo. Quando utilizado para fins medicinais, consiste em uma mistura de oxigênio e ozônio puros na proporção de 0,05% a 5% de O_3 e 95% a 99,95% de O_2 (NOGALES et al., 2008).

No campo da Odontologia, o alemão Edward A. Fisch foi o primeiro dentista a usar o ozônio em 1950, na forma de água ozonizada, com finalidade antisséptica em cirurgias orais, no tratamento de feridas cirúrgicas, com o objetivo de aumentar o aporte de oxigênio; e no tratamento de alvéolos contaminados e tratamentos endodônticos (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2008; NOGALES et al., 2008).

Apesar das diversas propriedades do ozônio descritas na literatura, bem como suas indicações terapêuticas na odontologia, seu potencial antimicrobiano é o mais evidenciado. Sabe-se que o ozônio tem potencial antimicrobiano tanto nas formas de gás como na forma de água ozonizada (LYNCH, 2008), porém faltam comparativos entre diferentes concentrações e diferentes tempos de exposição, não ficando claro qual o tipo de aplicação é mais eficiente. Tendo em vista a necessidade de prevenção, controle e eliminação de agentes microbianos na prática odontológica diária, e o grande interesse em encontrar uma substância para desinfecção nos consultórios odontológicos que tenha atividade antimicrobiana de amplo espectro (BOCCI, 2005), e ausência de toxicidade (NAGAYOSHI et al., 2004), o presente estudo objetiva comparar a ação antimicrobiana do ozônio nas formas de gás e água contra cepas de bactérias comumente presentes na cavidade oral, buscando determinar qual o tipo de aplicação de ozônio e concentração é mais eficaz na eliminação da contaminação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA

De todos os sítios do corpo humano, a cavidade bucal é aquela que apresenta os maiores níveis e diversidade de microrganismos. As características anátomo-fisiológicas da boca são responsáveis por esta diversidade, uma vez que apresenta diferentes tipos de tecidos e estruturas que variam quanto à tensão de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, temperatura e exposição aos fatores imunológicos do hospedeiro (PETERSEN, 2003).

Os microrganismos colonizadores da cavidade bucal podem causar uma série de doenças infecciosas bucais, incluindo periodontites, cáries dentárias, acometimentos endodônticos, alveolite seca e amigdalite. Tem sido relatado na literatura relações entre bactérias bucais e um número crescente de doenças sistêmicas (SEYMOUR et al., 2007), incluindo doença cardiovascular (JOSHIPURA et al., 1996), acidente vascular cerebral (JOSHIPURA et al., 2003), parto prematuro (OFFENBACHER et al., 1998), diabetes (GENCO et al., 2005) e endocardite bacteriana (BERBARI; COCKERILL; STECKELBERG, 1997).

Na prática odontológica, tão importante quanto o conhecimento técnico científico, é a conscientização dos riscos de contaminação durante a atividade clínica. A Ortodontia é considerada uma especialidade negligente no que diz respeito ao controle de possíveis infecções, porque os ortodontistas ainda consideram esta especialidade pouco invasiva, onde a maioria dos pacientes são jovens, apresentando baixo risco de contaminação. Sabe-se que os microrganismos podem ser transmitidos através do contato direto com sangue, saliva, outros fluidos corporais e pela respiração; pelo contato indireto com instrumentos, equipamentos e superfícies contaminadas. Há muito tempo o desenvolvimento de métodos para o controle de transmissão de doenças vem sendo uma preocupação no meio científico. Na área odontológica foi na década de 80 que se deu maior atenção ao controle da infecção cruzada, tendo como objetivo a criação de regulamentações e exigências dos órgãos governamentais (MENEZES et al., 2006; WOO et al., 1992).

Os ortodontistas, por trabalharem com um maior número de crianças e adolescentes quando comparada a outras especialidades, são relapsos no controle de infecção cruzada, por pensarem que seus pacientes estão menos expostos a riscos. Esse fato vem contribuindo para que a Ortodontia se classifique como a segunda especialidade com mais casos de profissionais contaminados com hepatite B, perdendo somente para a Cirurgia Bucomaxilofacial (DUTRA et al., 2008; WOO et al., 1992). Este quadro somente será revertido com uma maior preocupação em relação ao ciclo de infecção cruzada no consultório, adotando medidas de esterilização e desinfecção adequadas para cada tipo de material, local ou procedimento realizado. Os consultórios odontológicos em especial, devido à crença de possuir baixo risco de contaminação, por seus procedimentos não necessariamente estarem em contato com áreas cruentas, como sangue, e por apresentarem caráter pouco invasivo, utilizam grande parte de instrumentos que promovem a formação de aerossóis, assim como a possibilidade de acidentes com perfurocortantes, colocando esta especialidade numa categoria de risco.

Estudos apontam que apenas um em cada cinco ortodontistas (20,7%) esclarece seus pacientes na primeira consulta sobre as medidas de biossegurança adotadas em suas clínicas. Esta medida, quando adotada, não apenas ajuda a reforçar a imagem da clínica, como contribui para a conscientização das pessoas sobre a importância e os meios de proteção contra infecções cruzadas (DUTRA et al., 2008). Apesar de caráter pouco invasivo, a utilização de jatos de ar e água em grande parte dos procedimentos, assim como a possibilidade de perfurações com os fios, coloca a especialidade, ao contrário do que se pensa, numa categoria de risco (MENEZES et al., 2006).

O ambiente odontológico é considerado potencialmente infectado em decorrência da presença de fluidos biológicos, tais como a saliva, o sangue e coleções purulentas. Assim, os profissionais que trabalham nesta área estão sujeitos a uma série de doenças contagiosas (KRIEGER; BUENO; GABARDO, 2010).

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO OZÔNIO

O ozônio (O_3) é um composto alotrópico do oxigênio (O_2), formado através de descargas elétricas sobre a molécula de oxigênio. Esta molécula se quebra, liberando átomos, onde se liga a outra molécula de oxigênio, formando o ozônio. Por ser extremamente oxidante e instável, ele retorna a sua forma molecular de oxigênio com facilidade, tornando-se na medicina um grande potencializador da cicatrização e reparação tecidual. Para uso na área da saúde precisa ser sintetizado através de geradores específicos. A maioria dos geradores com finalidade medicinal no mercado utiliza o efeito corona para a produção da mistura gasosa oxigênio – ozônio (BOCCI, 2005; SORIANO; PEREZ; BAQUES, 2000).

Na natureza é formado na camada externa da atmosfera através do bombardeamento do oxigênio pelos raios ultravioleta, originando a camada de ozônio. Chuvas com descargas elétricas e a poluição atmosférica são fontes de produção de ozônio, aumentando sua participação frente a outros gases. Na troposfera torna-se tóxico por conta da intolerância à inalação (NOGALES et al., 2008).

Em temperatura ambiente, o ozônio existe na forma de gás e sua coloração varia do incolor ao azulado, na dependência da concentração. Apresenta odor pungente e rapidamente detectável em concentrações baixas como 0,02 a 0,05 ppm. Devido ao seu alto poder de oxidação, o ozônio é altamente corrosivo para determinados materiais, tais como: ferro, alumínio e látex, e inerte para outros, tais como: aço inoxidável, titânio, cerâmicas, vidro e silicone (WEAVERS; WICKRAMANAYAKE, 2001).

Existem três formas de produção do ozônio: por luz ultravioleta, por eletrólise ou por descarga corona, a última sendo a forma de eleição para os geradores de ozônio com finalidades terapêuticas, pois é capaz de produzir alta taxa de ozônio (NOGALES; LAGE-MARQUES, 2010).

2.2.1 Histórico

Introdutor do ozônio, o químico alemão Christian Friedrich Schönbein trabalhava com eletrólise da água e durante o processo percebia um odor

característico, o qual nomeou “Ozon”, derivado do termo grego “Ozein” (aquele que emite cheiro). Inicialmente considerava o ozônio como um potente oxidante e também como um desinfetante (RUBIN, 2001).

Wehrli e Steinbart (WEHRLI; STEIMBART, 1954) foram os primeiros a expor o sangue humano ao oxigênio com irradiação ultravioleta. O médico alemão Albert Wolf utilizava o ozônio tópico para o tratamento de feridas em soldados, conseguindo excelentes resultados, além do que foi o primeiro médico a desenvolver uma técnica de expor o sangue diretamente à mistura gasosa composto por oxigênio-ozônio.

O primeiro cirurgião-dentista a utilizar o ozônio foi Edward Fisch, em 1950. Ele utilizou água ozonizada como antisséptico bucal ao realizar cirurgias orais, no tratamento de feridas cirúrgicas, buscando aumentar a oxigenação dos tecidos, e no tratamento de alvéolos e de canais radiculares contaminados (STUBINGER; SADER; FILIPPI, 2006).

A maioria dos geradores com finalidade medicinal presente no mercado utiliza o efeito corona para produção da mistura gasosa oxigênio-ozônio, uma vez que após o oxigênio puro (medicinal) passar por um gradiente de alta voltagem (5-13 mV), suas moléculas são dissociadas, o que permite a formação do gás ozônio a partir da união de moléculas e átomos de oxigênio. O uso de ar atmosférico como matéria prima para produção de ozônio medicinal é contraindicado pela formação de espécies tóxicas, tais como N_2O_2 (dióxido de nitrogênio) e HNO_3 (ácido nítrico), dentre outras. (FERNÁNDEZ et al., 2007).

O ozônio pode ser utilizado na Odontologia preventiva, tratamento de cáries, tratamentos endodônticos, tratamentos gengivais e em todos os atos cirúrgicos: periodontais, implantes, extrações, dentre outros (BAST; HAENEN; DOELMAN, 1991).

Em função da molécula triatômica ser muito instável e reativa, o ozônio não pode ser armazenado, devendo ser utilizado imediatamente a partir da geração. Em condições normais, a própria temperatura do ambiente em que se encontra tem grande influência em sua degradação (NOGALES; LAGE-MARQUES, 2010).

2.3 AÇÃO ANTIMICROBIANA DO OZÔNIO

O ozônio é capaz de produzir oxidação letal no citoplasma bacteriano, através de alterações nos ácidos graxos poli-insaturados da parede bacteriana, tornando-se microbicida, bactericida, fungicida e parasiticida. Sua biocompatibilidade permite que praticamente todas as pessoas possam utilizar seus benefícios e a eficiência da substância (BRUZADELLI-MACEDO et al., 2002).

Nagayoushi et al. (NAGAYOSHI et al., 2004) avaliaram a ação antimicrobiana da água ozonizada em túbulos dentinários contaminados com *Enterococcus faecalis*, comparando com o Hipoclorito de Sódio (NaCl). Observaram que quando se utilizou a água ozonizada na concentração de 4 µg/mL aliada a ultrassonificação, reduziu-se a contagem de UFC/mL, similar ao hipoclorito. Em nosso estudo, comparando-se apenas as 3 concentrações de ozônio houve diferença significativa da concentração de 20 µg/mL para com as concentrações de 40 µg/mL e 60 µg/mL, sendo eficiente nos dois tipos de aplicação e nos dois tempos de exposição.

A inativação de microrganismos pelo ozônio é atribuída, principalmente, à ruptura do envoltório celular e posterior dispersão dos constituintes citoplasmáticos, uma vez que esse gás apresenta alto potencial oxidativo. Essa capacidade do ozônio de inativar ou inibir o desenvolvimento dos microrganismos é fundamental, pois pode representar uma forma de controle de fungos potencialmente aflatoxigênicos e, conseqüentemente, de prevenção da síntese de aflatoxina (JORGE et al., 2005; PATIL et al., 2009).

Para avaliar a eficácia antimicrobiana da ozonioterapia em dentes contaminados com *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, Nogales et al. (NOGALES et al., 2016) utilizaram 180 dentes unirradiculares contaminados, divididos em grupos: Grupo I – controle; Grupo II – protocolo padrão (instrumentação endodôntica seriada até a lima K-file 25 + irrigação com 3 mL de hipoclorito de sódio 1% + EDTA 17% por três minutos preenchendo o canal radicular, após, 5 mL de solução salina); Grupo III – protocolo padrão + gás ozônio, 40µg/mL; Grupo IV – protocolo padrão + água ozonizada, 8µg/mL. Os resultados revelaram eficácia antimicrobiana do grupo IV, com UFC (Unidades Formadoras de Colônias) nulo, comprovando que a ozonioterapia melhorou a descontaminação dos canais radiculares *ex vivo* (NOGALES et al., 2016).

Para avaliar o potencial antimicrobiano do hipoclorito de sódio 2,5%, Clorexidina 2% e água ozonizada, contra cepas de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em canais radiculares mesio-linguais com curvatura severa de molares inferiores, foram contaminados 60 canais radiculares, e após randomicamente divididos em quatro grupos de acordo com a solução de irrigação: SH: hipoclorito de sódio 2,5%; CH: Clorexidina 2%; O₃: água ozonizada; Grupo controle: água bidestilada. Foi realizada a instrumentação dos canais com o sistema WaveOne Gold Primary. Resultados: todos os grupos mostraram redução significativa de biofilme após a irrigação (p<0,01). Após a instrumentação, Hipoclorito de Sódio (98,07%), Clorexidina (98,31%) e água ozonizada (98,02%), produziram uma redução significativa na contagem de bactérias comparado ao grupo controle (água bidestilada), (controle, 72,98%) (p<0,01), comprovando que a água ozonizada pode ser uma alternativa para redução microbiana, tendo resultados similares às outras soluções irrigadoras (PINHEIRO et al., 2018).

Também foi avaliado o potencial antimicrobiano e de cicatrização da terapia com ozônio. Células HaCaT (ceratinócito) e células L-929 (fibroblasto de rato) foram cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina – estreptomicina), mantido a 37°C, 5% CO₂. As células foram separadas com tripsina 0,25% e solução de EDTA 1mM. A atividade antimicrobiana foi testada contra cepas de *Candida Albicans* (ATCC 10231) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). As células HaCaT e L-929 foram cultivadas a uma densidade de 5x10³ em 96 placas de cultura e incubadas. Após, foram tratadas com diluições seriadas de solução salina tamponada com fosfato ozonizado (PBS) (8; 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 µg/mL), clorexidina 0,2% (controle positivo) ou somente o meio PBS (controle negativo). Para a ozonização do meio PBS a 8µg/mL, 1 L de PBS foi colocado em uma coluna de vidro, a um fluxo de ¼ L/min por um período de 10 minutos. O contato com as células foi por 5 minutos, e então a solução foi inoculada no meio de cultura. Clorexidina foi diluída diretamente no meio de cultura. Após 24 horas ou 48 horas, 10 µg/mL de solução MTT a uma concentração de 5µg/mL foi adicionada a cada poço de cultura, seguido de incubação por 4 horas a 37°C. Foi adicionado 100µL de isopropanol para dissolver os cristais de formazan. Clorexidina 0,2%, usada como controle positivo, resultou em uma redução estatisticamente considerável nas duas linhas de células (HaCaT – viabilidade 38% em 24 horas e 30%

em 48 horas; L929 – 15% em 24 horas e 28% em 48 horas respectivamente). HaCaT tratadas com solução salina ozonizada mostrou em 24 horas um aumento na viabilidade celular comparado ao grupo controle. A concentração de 8 µg/mL resultou no maior aumento na viabilidade celular, com um aumento de 134%. Nas outras concentrações (1, 2 e 4 µg/mL) não se notou resultados estatisticamente significativos. A atividade antimicrobiana do meio PBS ozonizado mostrou-se mais efetivo quando associado com clorexidina, tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Candida albicans* (BORGES et al., 2017).

Estudaram-se aplicações de terapias com ozônio contra bactérias resistentes. Esta resistência bacteriana está sendo discutida globalmente desde 2015, pela Assembléia Mundial de Saúde, envolvendo planos de ação da ONU juntamente com os grupos G7 e G20. Foram utilizados no estudo 13 cepas bacterianas (6 Gram positivas- *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *Corynebacterium striatum* e 7 Gram negativas *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*), com diferentes suscetibilidades a antibióticos e quimioterápicos, multirresistentes, isolados de diferentes pacientes hospitalizados. Antes do teste, cada cepa bacteriana foi cultivada duas vezes em meio TSA a 37°C por 24 horas para garantir a viabilidade celular. 1 mL de suspensão bacteriana a uma densidade de 1.5×10^8 UFCs foram ozonizadas a 40µg/mL (produzido com o gerador Multiossigen Medical 95 device) a uma temperatura de 20° a 22°C, enquanto a quantidade da mistura Oxigênio-Ozônio foi de 100cc, para que a concentração final de Ozônio fosse de 4000µg. O tempo de exposição foi de 40 minutos de acordo com a meia-vida do ozônio (20 minutos) dissolvido em água a um pH 7, a uma temperatura de 20°C. Foi contabilizado o número de células/mL no início do teste e o número de células sobreviventes após 40 minutos de contato com o meio de cultura ozonizado. Os resultados mostraram que o tratamento com Ozônio foi efetivo na eliminação das colônias bacterianas, e não gerou nenhuma resistência antimicrobiana. Mesmo em concentrações baixas, os antibióticos afetam as bactérias, resultando em um desenvolvimento de resistência antimicrobiana (GIULIANI et al., 2018).

Para avaliar a utilização do Ozônio em forma de água ozonizada para prevenção de infecção cruzada entre o consultório odontológico e o laboratório de prótese, através da desinfecção dos materiais de moldagem, 32 amostras de 1 cm de

diâmetro x 2mm de espessura de material de moldagem hidrocolóide, foram contaminados com *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 51299), e *Candida albicans* (PTCC 5027). Com exceção do grupo controle (n=2), as outras amostras foram imersas em água ozonizada por 5 e 10 minutos, com um fluxo de ozônio saindo do gerador a uma concentração de 200ppm/min. (5 amostras de cada grupo). Foi realizada a análise microbiológica para UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Como resultados, o número de UFC após a desinfecção com água ozonizada diminuiu significativamente (11,84%, 61,55% e 20,27% após 5 minutos e 11,03%, 14,50% e 16,99% após 10 minutos para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente. ($p < 0,001$), concluindo que a utilização da água ozonizada para desinfecção de materiais de moldagem por 10 minutos não levará a uma completa desinfecção, mas irá diminuir o número de microrganismos a um nível que pode prevenir a transmissão de infecções (SAVABI et al., 2018).

Em um estudo *in vitro*, com o objetivo de comparar a eficácia do gás ozônio e hipoclorito de sódio na desinfecção de materiais de moldagem em polivinil siloxano hidrofílico (silicone de adição leve) inoculados com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, 140 amostras de discos deste material foram expostos ao gás ozônio e ao hipoclorito de sódio por 30 minutos à temperatura ambiente. No grupo do ozônio, as amostras foram submetidas a um contato contínuo do gás a uma concentração de 12.8 mg/L, enquanto as espécies submetidas ao contato com hipoclorito de sódio, foram submersas em solução a 0.5%. O material exposto aos dois desinfetantes por 30 minutos demonstrou redução significativa no número de bactérias, mostrando que o tratamento de desinfecção com ozônio é um método promissor para materiais de moldagem em silicone de adição (CELEBI; BUYUKERKMEN; TORLAK, 2018).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana do ozônio, nas formas de gás e água ozonizada, em diferentes concentrações e tempos de exposição, contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O cálculo amostral foi feito baseado em um nível de significância alfa de 5% (0,05) e um beta de 20% (0,20) para atingir um poder de teste de 80% para detectar uma diferença média de 2×10^5 com desvio padrão de $1,04 \times 10^5$ para as unidades formadoras de colônias (NOGALES et al., 2016). Desta forma, o cálculo amostral resultou que há necessidade de uma amostra com $n=5$ em cada grupo.

4.1 PREPARO DO INÓCULO

Foram utilizadas cepas padrão ATCC de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), selecionadas do acervo de bactérias do laboratório de Microbiologia Clínica do Centro Universitário Ingá. Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar.

Inicialmente, cada bactéria foi descongelada e distribuída em placas de Petri contendo *Tryptic Soy Agar* (TSA) e em seguida incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Depois desse tempo, uma colônia de cada bactéria foi inoculada em 10mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) e incubada por 24 horas 37°C.

Depois de 24 horas, a concentração de bactérias foi ajustada utilizando a escala 0,5 de McFarland (LENNETTE et al., 1985), correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

4.2 PLAQUEAMENTO

Para cada bactéria, foram utilizadas dez placas de petri: 5 placas nas quais as bactérias foram inoculadas após o contato com a água ozonizada e 5 com gás ozônio. Cada uma das placas recebeu os microrganismos. 5 tiveram o contato com a água ozonizada e 5 com o gás ozônio. Cada uma das placas foi dividida em seis partes, contendo três concentrações do ozônio (20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$ e 60 $\mu\text{g/mL}$), e os diferentes tempos de exposição de 1 e 2 minutos. (Figs. 1 e 2). Também foi feita uma placa de controle, com cinco divisões, que recebeu bactérias que não tiveram contato com nenhum tipo de produto (controle positivo)(Fig. 3). Além disso, uma placa, dividida de forma semelhante, recebeu bactérias, com exposição à clorexidina a 2%, com 5 divisões (controle negativo)(Fig 4).

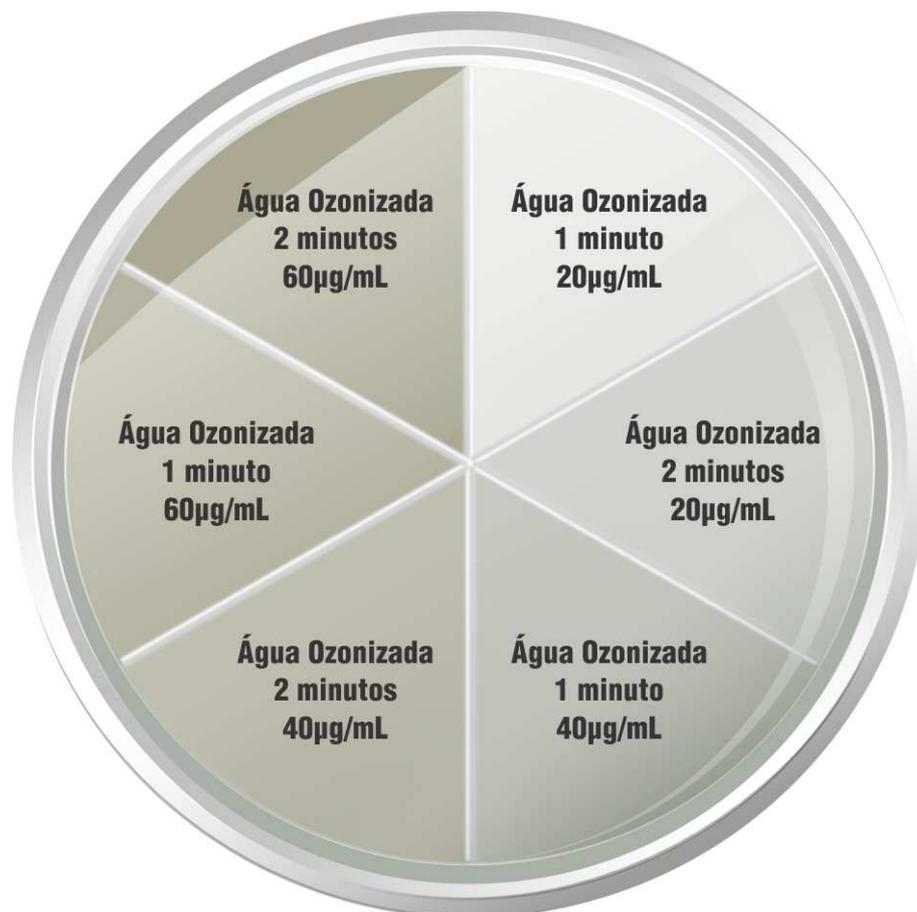


Figura 1. Placa com 6 divisões – Água Ozonizada

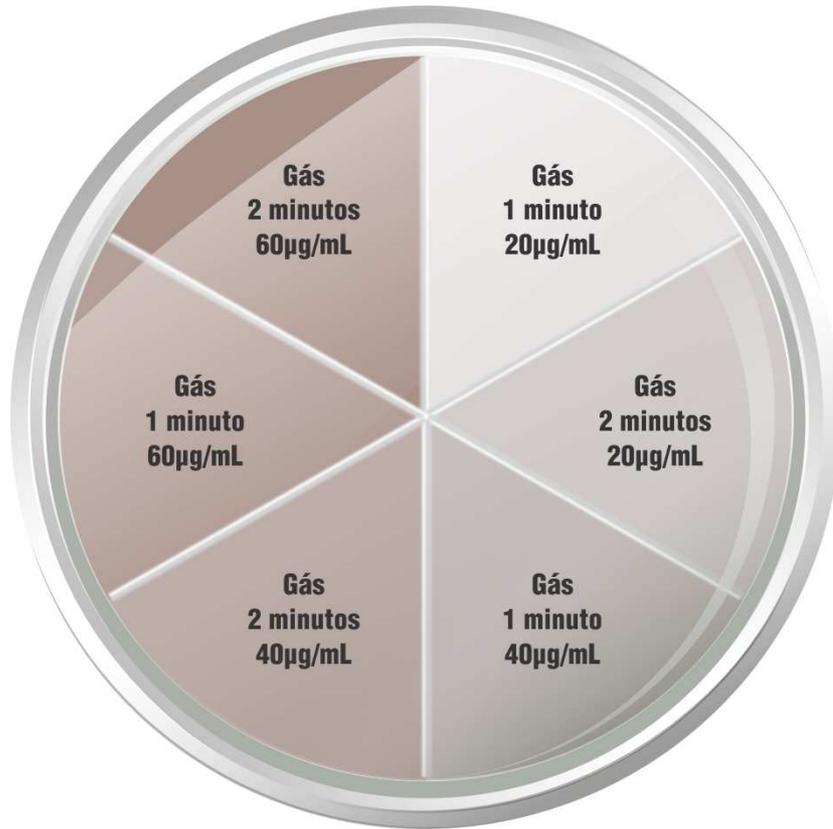


Figura 2. Placa com 6 divisões – Gás Ozônio

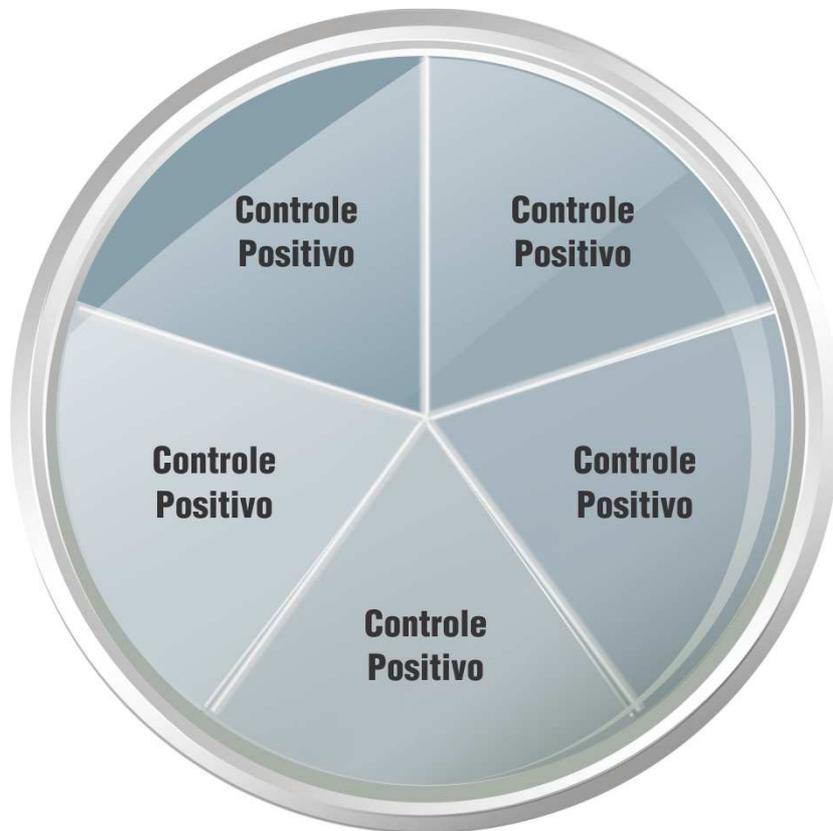


Figura 3. Placa com 5 divisões – Controle Positivo

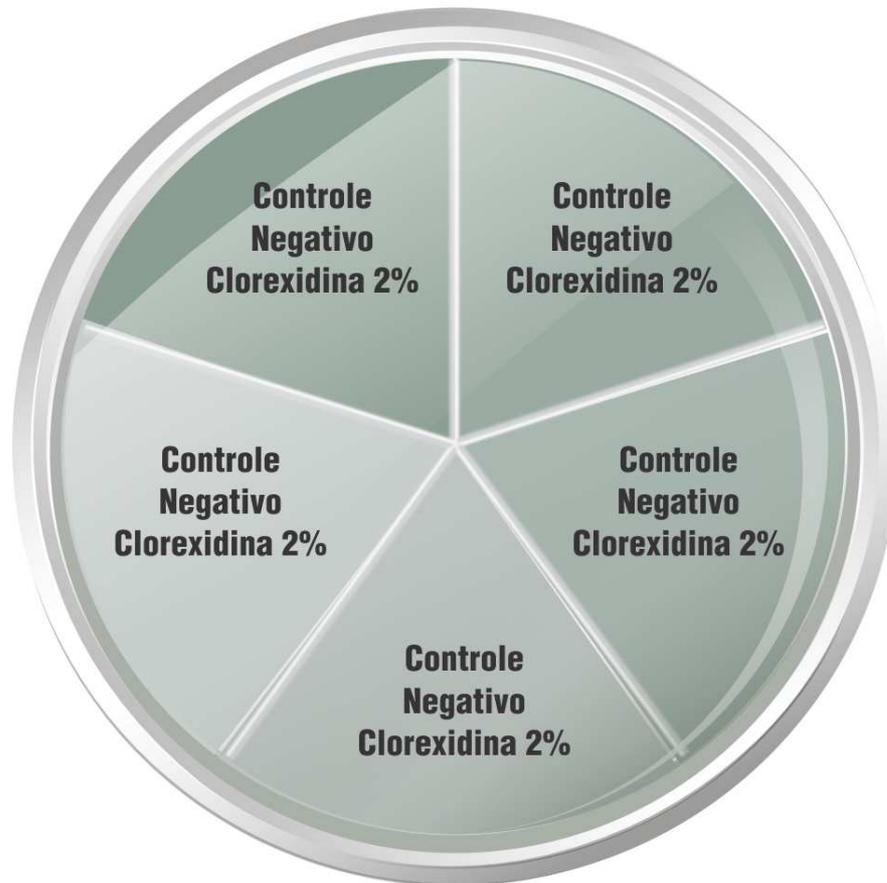


Figura 4. Placa com 5 divisões – Controle Negativo

4.3 PREPARO DA ÁGUA OZONIZADA

Foi utilizado um aparelho gerador de Ozônio particular (Philozon®, Santa Catarina, Brasil) para realizar os experimentos. Este apresenta autocalibração, com estabilização automática. O oxigênio medicinal utilizado (99,5% - White Martins – Rio de Janeiro, Brasil) têm fluxo regulado em 1 L/min.



Figura 5 - Gerador de Ozônio; Coluna para ozonização da água

A precisão na concentração de ozônio fornecida pelo aparelho é calibrada fotometricamente no laboratório do fabricante. As concentrações de produção do gás ozônio permitidas por este aparelho variam de 5 a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Utilizamos água bidestilada estéril, resfriada até o momento do uso (Eurofarma Laboratórios, São Paulo, Brasil), a qual foi depositada em uma coluna de vidro para realizar a diluição do ozônio na água. A quantidade de água ozonizada por experimento foi de 200 mL, por um período de tempo de 5 minutos cada amostra.

Nove (9) mL de cada grupo experimental foi transferido para um tubo de ensaio e então 1mL de cada suspensão bacteriana foi adicionado ao tubo. Para cada grupo foram realizados dois contatos, um de 1 minuto e um de 2 minutos. Após esse contato, diluições seriadas foram realizadas e as amostras foram plaqueadas em TSA, onde foram incubadas por 24 horas a 37°C. Depois disso a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada.

4.4 TESTE DA AÇÃO DO GÁS OZÔNIO

O gás foi obtido de forma fracionada, diretamente do gerador para uma seringa siliconada estéril (Terumo, Tokyo, Japão) de 10 mL. Foi descartado o excedente, ficando na seringa somente 1mL do gás. Em outra seringa, foi coletado 1 mL da suspensão bacteriana, e, através de uma ponta conectora, as seringas foram unidas, e foi realizada a homogeneização das substâncias, em um total de 10 movimentos de uma seringa para a outra, por amostra.

Para cada grupo foram realizados contatos por 1 e 2 minutos. Após o contato, diluições seriadas foram realizadas e as amostras plaqueadas em TSA onde foram incubadas por 24 horas a 37°C. Depois disso a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação intergrupos de cada bactéria com relação ao tempo de exposição, tipo de aplicação e concentração de ozônio foi realizada pelo teste ANOVA multifatorial. A comparação intergrupos entre as diferentes concentrações de ozônio com e sem os grupos controle foi realizada pelo teste ANOVA a um critério e teste de Tukey. A comparação intergrupos entre a água ozonizada ou gás foi realizada pelo teste t independente.

Os testes foram realizados com o programa Statistica for Windows (versão 7.0, Statsoft, Tulsa, Okla, EUA) e os dados foram considerados significantes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Para o teste com o microrganismo *Staphylococcus aureus*, houve diferença estatisticamente significativa somente para a concentração de ozônio (Tabela 1). Quando comparadas as 3 concentrações, a concentração de 20 µg/mL mostrou maior número de microrganismos do que as concentrações de 40 µg/mL e 60 µg/mL (Tabela 2). Quando as três concentrações foram comparadas com os grupos controle positivo e de clorexidina, todas as concentrações se apresentaram semelhante ao controle clorexidina e com uma diferença estatisticamente significativa com o controle positivo, mostrando um número significativamente menor de UFC/mL (Tabela 3).

Com relação ao microrganismo *Enterococcus faecalis*, houve diferença estatisticamente significativa para a concentração e o tipo de aplicação de ozônio (Tabela 4). O gás ozonizado foi mais efetivo no controle antimicrobiano do que a água ozonizada, para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (Tabela 5).

Com relação às concentrações de ozônio, a concentração de 20 µg/mL mostrou significativamente mais UFC/mL do que as concentrações de 40 µg/mL e 60 µg/mL (Tabela 6). Comparando-se as três concentrações com os grupos controle positivo e clorexidina, todas as concentrações foram semelhantes ao grupo controle clorexidina e mostraram significativamente menores números de UFC/mL do que o controle positivo (Tabela 7).

Tabela 1 – Resultados da comparação entre o tempo, tipo de aplicação e concentração, para o microrganismo *Staphylococcus aureus* (Anova multifatorial; tempo - 1 e 2 minutos, tipo de aplicação de ozônio – água e gás, e concentração - 20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL).

	SS	GL	MS	F	P
Intercepto	0,004	1	0,004	158,89	0,000*
Tempo	0,000	1	0,000	1,37	0,245
Tipo de aplicação	0,000	1	0,000	0,00	0,980
Concentração	0,008	2	0,004	155,30	0,000*
Erro	0,001	55	0,000		

* Estatisticamente significativa para $P < 0,05$

Tabela 2 – Resultados da comparação entre as 3 concentrações de ozônio para o microrganismo *Staphylococcus aureus* (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey).

	20µg/mL N=20	40µg/mL N=20	60µg/mL N=20	P
	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	0,02 x10 ⁶ (0,00) A	0,00 x10 ⁶ (0,00) B	0,00 x10 ⁶ (0,00) B	0,000*

* Estatisticamente significativa para $P < 0,05$

Letras diferentes indicam a presença de uma diferença estatisticamente significativa

Tabela 3- Resultados da comparação entre as 3 concentrações de ozônio e os grupos controle positivo e clorexidina, para o microrganismo *Staphylococcus aureus* (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey).

	20µg/mL N=20	40µg/mL N=20	60µg/mL N=20	Controle Positivo N=5	Controle Clorexidina N=5	P
	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	0,02 x10 ⁶ (0,00) A	0,00 x10 ⁶ (0,00) A	0,00 x10 ⁶ (0,00) A	8,20 x10 ⁶ (0,77) B	0,00 x10 ⁶ (0,00) A	0,000*

* Estatisticamente significativa para $P < 0,05$

Letras diferentes indicam a presença de uma diferença estatisticamente significativa

Tabela 4 - Resultados da comparação entre o tempo, tipo de aplicação e concentração, para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (Anova multifatorial; tempo - 1 e 2 minutos, tipo de aplicação de ozônio – água e gás, e concentração - 20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL).

	SS	GL	MS	F	P
Intercepto	0,988	1	0,988	36,32	0,000*
Tempo	0,001	1	0,001	0,07	0,789
Tipo de aplicação	0,694	1	0,694	25,53	0,000*
Concentração	1,747	2	0,873	32,11	0,000*
Erro	1,496	55	0,027		

* Estatisticamente significativa para P<0,05

Tabela 5 - Resultados da comparação entre os tipos de aplicação de ozônio (água ou gás) para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (teste t independente).

	ÁGUA N=30		GAS N=30		P
	Média	d.p.	Média	d.p.	
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFC/mL)	0,23 x10 ⁶	0,33	0,02 x10 ⁶	0,02	0,000*

* Estatisticamente significativa para P<0,05

Tabela 6 - Resultados da comparação entre as 3 concentrações de ozônio para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey).

	20 µg/mL N=20	40 µg/mL N=20	60 µg/mL N=20	P
	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFC/mL)	0,36 x10 ⁶ (0,33) A	0,01 x10 ⁶ (0,01) B	0,00 x10 ⁶ (0,00) B	0,000*

* Estatisticamente significativa para P<0,05

Letras diferentes indicam a presença de uma diferença estatisticamente significativa

Tabela 7 - Resultados da comparação entre as 3 concentrações de ozônio e os grupos controle positivo e clorexidina, para o microrganismo *Enterococcus faecalis* (ANOVA a um critério de seleção e teste de Tukey).

	20 µg/mL N=20	40 µg/mL N=20	60 µg/mL N=20	Controle Positivo N=5	Controle Clorexidina N=5	P
	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	Média (d.p.)	
<i>Entero- coccus faecalis</i> (UFC/mL)	0,36 x10 ⁶ (0,33) A	0,01 x10 ⁶ (0,01) A	0,00 x10 ⁶ (0,00) A	12,00 x10 ⁶ (6,12) B	0,00 x10 ⁶ (0,00) A	0,000*

* Estatisticamente significativa para P<0,05

Letras diferentes indicam a presença de uma diferença estatisticamente significativa

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Devido à alta toxicidade frente às células epiteliais orais dos bactericidas padrão (clorexidina, hipoclorito, peróxido de hidrogênio), e a escassez de substâncias que tenham um efeito antimicrobiano, e, ao mesmo tempo, permitam uma estabilidade na viabilidade celular, alcançando um efeito biológico e eficaz na redução de bactérias da microbiota oral, comparamos a ação do ozônio na forma de água ozonizada e de gás ozônio contra cepas bacterianas comumente encontradas na cavidade oral (HEMS et al., 2005), e os resultados mostraram que o ozônio se mostrou eficaz na eliminação de bactérias tanto na forma de gás como na forma de água, em todas as concentrações e tempos testados.

O ozônio vem sendo proposto como uma alternativa no processo de desinfecção, devido ao seu alto potencial antimicrobiano (BOCCI, 2005; GIULIANI et al., 2018; NOGALES et al., 2016; PINHEIRO et al., 2018; WEAVERS; WICKRAMANAYAKE, 2001).

O ozônio é capaz de produzir uma oxidação letal no citoplasma bacteriano, através de alterações nos ácidos graxos poli-insaturados da parede bacteriana, tornando-se microbicida, bactericida, fungicida e parasiticida. Sua biocompatibilidade permite que praticamente todas as pessoas possam utilizar seus benefícios e a eficiência da substância (BRUZADELLI-MACEDO et al., 2002).

O ozônio está sendo o foco de discussão na odontologia por ser uma possível alternativa aos antissépticos padrão. Seu alto poder antimicrobiano, sem o desenvolvimento de resistência medicamentosa foi demonstrado na purificação de água e preservação de alimentos (PARASKEVA; GRAHAM, 2002; RESTAINO et al., 1995; UNAL; KIM; YOUSEF, 2001).

A seleção destes dois microrganismos específicos (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) para o estudo tem relação com a sensibilidade aos antimicrobianos por bactérias gram positivas. A resistência dos microrganismos é motivo de grande preocupação na área médica. No Brasil, na atualidade, os estafilococos, incluindo o *S. aureus*, mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina

e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade, não sendo mais indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas, mesmo que benignas e mesmo que procedam do ambiente extra-hospitalar. Os enterococos são habitantes da microbiota do trato digestivo humano e da microbiota bucal, e, mesmo apresentando baixa patogenicidade, são causa de infecções urinárias e intra-abdominais, endocardite e sepse, comportando-se, muitas vezes, como um agente oportunista em infecções hospitalares (DUARTE; VERAS; MARTINS, 1994; HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998; PERRY; JONES; GOULD, 1999; SADER, 1998; SANTOS FILHO; FREITAS; SIQUEIRA JR, 1994).

Investigações recentes tem reportado efeitos antimicrobianos em patógenos orais após exposição tanto ao gás ozônio como à água ozonizada (BAYSAN; LYNCH, 2004; BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000; KOMANAPALLI; LAU, 1998; NAGAYOSHI et al., 2004), por isso selecionou-se estas duas formas de utilização para avaliação e comparação no presente estudo. Alguns resultados indicam o poder antimicrobiano da água ozonizada, e afirmam que a utilização do ozônio diluído em água é vantajoso pois há manutenção da potência oxidante do ozônio, sendo seu manuseio mais fácil e seguro se comparado à forma gasosa (NAGAYOSHI et al., 2004). Diversos estudos avaliaram a água ozonizada (PINHEIRO et al., 2018; SAVABI et al., 2018) e o gás ozonizado (CELEBI; BUYUKERKEMEN; TORLAK, 2018) separadamente ou com outras substâncias antimicrobianas e desinfetantes, mas a comparação entre ambos nas mesmas concentrações é limitada (NOGALES et al., 2016).

Na literatura, encontram-se variações muito grandes no tempo de exposição ao ozônio. Savabi et al. (SAVABI et al., 2018) avaliaram a desinfecção com água ozonizada por 5 e 10 minutos em material de moldagem. Velano et al. (VELANO et al., 2001) utilizaram um período de exposição ao ozônio de 20 minutos, utilizando um gerador de ozônio a partir de raios ultravioleta.

Como o ozônio é altamente instável, ele reage imediatamente. Baysan, Whiley e Lynch (BAYSAN; WHILEY; LYNCH, 2000) relataram que a aplicação de ozônio por 10 ou 20 segundos foi efetivo para eliminar a grande maioria dos microrganismos testados in vitro. Na presente pesquisa, foi escolhido os tempos de 1 e 2 minutos pela praticidade. Alguns estudos testaram a aplicação do ozônio por 30 e até 60 minutos

(BRINK et al., 2008; CELEBI; BUYUKERKMEK; TORLAK, 2018), tempo muito grande, que inviabiliza sua utilização clínica posteriormente.

Foram testadas diversas concentrações de ozônio, visto que o ideal é a utilização da menor concentração que ofereça o melhor potencial antimicrobiano. O excesso ou a alta concentração de ozônio pode ser prejudicial ao organismo, e devido ao seu alto potencial oxidante, pode apresentar toxicidade biológica (HALLIWELL; CROSS, 1994).

Clinicamente, seria mais viável a utilização da água ozonizada ao invés do gás por causa da inalação. Após inalação, o ozônio reage com antioxidantes e ácidos poli-insaturados do fluído dos alvéolos pulmonares, enquanto a reação tardia formada são produtos de peroxidação lipídica, que são absorvidos sistemicamente (PRYOR; DAS; CHURCH, 1991). O efeito do ozônio no trato respiratório foi previamente estudado tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Diversos estudos demonstraram que exposições agudas ao O₃ estão associadas com hiper-responsividade das vias aéreas aumentada e função pulmonar prejudicada. É caracterizada por alterações patológicas concentradas nas vias aéreas inferiores, incluindo edema, dano celular epitelial e acúmulo de mediadores inflamatórios (foi observado em quase todas as espécies estudadas expostas ao ozônio) (GILMOUR; SELGRADE, 1993).

Para a aplicação clínica do gás ozônio, para não permitir o contato com o trato respiratório, é necessária uma aplicação em um veículo (água, sangue, etc). Pode-se também aplicar de forma infiltrativa ou utilizando-se moldeiras de silicone que não permitem o extravasamento do gás, tornando a utilização do ozônio neste tipo de aplicação uma forma segura e mais barata, pois evita-se o desperdício, sendo coletado somente a quantidade exata a ser utilizada.

Com relação ao microrganismo *Staphylococcus aureus*, houve diferença estatisticamente significativa para a concentração do ozônio, tanto no tipo de aplicação água ozonizada como em forma de gás, sendo que a concentração de 20 µg/mL mostrou maior contagem de UFC/mL ao final do experimento quando comparada às concentrações de 40 µg/mL e 60 µg/mL (Tabelas 1 e 2). O tempo de exposição, tanto ao gás como a água ozonizada não mostrou diferença estatisticamente significativa neste estudo (Tabela 1). Giuliani et al. (GIULIANI et al., 2018) utilizaram uma

metodologia com somente um tempo de exposição (40 minutos), tendo comprovado também a ação antimicrobiana do ozônio contra o *Staphylococcus aureus*.

Em um estudo recente, Nogales et al. (NOGALES et al., 2016) avaliaram a ação antimicrobiana do gás ozônio em concentração de 40 µg/mL e de água ozonizada a 8 µg/mL, contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomona aeruginosa*, encontrando redução da contagem das UFC na exposição ao gás e a água ozonizada.

Quando comparadas as três concentrações com os grupos controle positivo e clorexidina, mesmo a concentração de 20 µg/mL mostrou uma ação antimicrobiana eficaz (Tabela 3), comprovando redução no número de UFC/mL mesmo em baixas concentrações de ozônio, como já foi avaliado em outros estudos (NAGAYOSHI et al., 2004; NOGALES et al., 2014; NOGALES et al., 2016; NOGALES; LAGE-MARQUES, 2010; PINHEIRO et al., 2018).

As 3 concentrações de ozônio mostraram-se semelhantes ao grupo controle negativo (clorexidina 2%), que é um dos desinfetantes mais utilizados na prática odontológica, sendo considerado com padrão ouro (CAWSON; CURSON, 1959; DAVIES et al., 1954).

Com relação ao microrganismo *Enterococcus faecalis*, o potencial antimicrobiano do ozônio foi avaliado considerando os critérios tempo de exposição (1 e 2 minutos), tipo de ozônio (água e gás) e concentração (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL), e não houve diferença estatisticamente significativa para o tempo de exposição, mas sim para o tipo de aplicação de ozônio e para a concentração (Tabela 5).

Ao compararmos os tipos de aplicação de ozônio o gás se mostrou mais eficaz quando comparado à água ozonizada (Tabela 6). Hems et al. (HEMS et al., 2005) aplicaram o ozônio na forma de água e gás em biofilmes contaminados com *Enterococcus faecalis*, e utilizaram uma metodologia diferente da utilizada no presente estudo. Foi ozonizada a água por períodos de tempo diferentes (5, 10, 20, 30 e 60 segundos), tendo uma concentração de ozônio final baixa (0,68 mg/L), sendo posteriormente aplicada em placas de vidro e também em biofilme bacteriano. Como resultado, apresentou redução de UFC/mL no *Enterococcus faecalis* plaqueado, mas

pouco efeito bactericida quando em biofilme. Outros autores também compararam a ação do ozônio na forma de gás e água contra cepas de *E. faecalis* em canais radiculares (NOGALES et al., 2016). O gás foi aplicado na concentração de 40 µg/mL por 30 segundos dentro do canal. A água ozonizada foi utilizada na concentração de 8 µg/mL, aplicando-se 10 mL dentro do canal após a preparação padrão do mesmo. Tanto o gás quanto a água ozonizada se mostraram eficazes, reduzindo a contagem de UFC/mL.

Ao compararmos as 3 concentrações de ozônio nas placas do microrganismo *Enterococcus faecalis*, houve diferença significativa entre a concentração de 20 µg/mL e as concentrações de 40µg/mL e 60µg/mL, sendo a concentração de 20 µg/mL menos eficaz na redução de UFC/mL (Tabela 6).

Como resultado da comparação entre as 3 concentrações de ozônio e os grupos controle positivo e clorexidina, as 3 concentrações e o grupo clorexidina foram semelhantes e apresentaram uma diferença estatisticamente significativa para o grupo controle positivo (Tabela 7), indicando a eficácia antimicrobiana do ozônio em todas as concentrações testadas contra este microrganismo.

Após resultados obtidos ao utilizar a água ozonizada em concentrações de 2 a 4 µg/mL e aplicadas por 20 segundos em culturas bacterianas, obtiveram-se resultados nos quais a aplicação da água ozonizada foi efetiva tanto na eliminação de microrganismos bucais Gram positivos como Gram negativos. Utilizar o ozônio diluído em água é vantajoso no sentido de manutenção da potência oxidante do ozônio, sendo seu manuseio mais fácil e seguro se comparado à forma gasosa (NAGAYOSHI et al., 2004).

Mesmo tendo bastante literatura em trabalhos *in vitro* no campo da Odontologia utilizando a Ozonioterapia (BORGES et al., 2017; GIULIANI et al., 2018; NAGAYOSHI et al., 2004; NOGALES et al., 2016), a falta de ensaios clínicos e padronização na metodologia de avaliação dificultam a implementação de protocolos de tratamento nas mais diversas especialidades.

Atualmente a ozonioterapia vem sendo amplamente utilizada em diversos países da Europa, América central, Ásia e Estados Unidos. Em alguns países, como Cuba e Rússia, o tratamento com ozônio é oferecido à população na rede pública de

atendimento para as mais diversas patologias, comprovando que a utilização do Ozônio como uma terapia complementar na prática diária não só é viável, como está próximo da concretização, devido aos resultados positivos apresentados. É uma aplicação de fácil manejo, custo baixo e, se seguido o protocolo mundial (Declaração de Madrid, 2015), muito segura.

O presente estudo comprovou a eficácia tanto do gás e da água ozonizada, em diversas concentrações e tempos de exposição. Foi demonstrado neste trabalho que a forma mais prática de utilização em meio oral é na forma de água ozonizada, com exposição de 1 minuto, na concentração de 20 µg/mL, tornando sua aplicação fácil, possível e eficaz. Em casos de periodontite ou alguma infecção, talvez as concentrações de 40 e 60 µg/mL sejam mais indicadas.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O ozônio se mostrou eficaz na eliminação de bactérias tanto na forma de gás como na forma de água, em todas as concentrações e tempos testados.

Quando comparadas entre si, as concentrações de 40 e 60 µg/mL se mostraram mais eficazes que a concentração de 20 µg/mL para ambos os microrganismos. Para o microrganismo *Enterococcus faecalis*, o gás se mostrou mais eficaz que a água ozonizada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK, H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. **J Dent**, v.36, n.2, p.104-16, 2008.

BAST, A.; HAENEN, G.R.; DOELMAN, C.J. Oxidants and antioxidants: state of the art. **Am J Med**, v.91, n.3C, p.2S-13S, 1991.

BAYSAN, A.; LYNCH, E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. **Am J Dent**, v.17, n.1, p.56-60, 2004.

BAYSAN, A.; WHILEY, R.A.; LYNCH, E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. **Caries Res**, v.34, n.6, p.498-501, 2000.

BERBARI, E.F.; COCKERILL, F.R., 3RD; STECKELBERG, J.M. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. **Mayo Clin Proc**, v.72, n.6, p.532-42, 1997.

BOCCI, V. Ozone. A New Medical Drug. Italy: Springer; 2005.

BOCCI, V.A. Why orthodox medicine has not yet taken advantage of ozone therapy. **Arch Med Res**, v.39, n.2, p.259-60, 2008.

BORGES, G.A. et al. In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **J Craniomaxillofac Surg**, v.45, n.3, p.364-70, 2017.

BRINK, C.B. et al. Studies on cellular resilience and adaptation following acute and repetitive exposure to ozone in cultured human epithelial (HeLa) cells. **Redox Rep**, v.13, n.2, p.87-100, 2008.

BRUZADELLI-MACEDO, S. et al. Mandibule-Ozone therapy for osteomyelitis: literature review and case report. **Int J Drug Therapy**, v.19, p.77-81, 2002.

CAWSON, R.A.; CURSON, I. The effectiveness of some antiseptics on the Oral Mucous Membrane. **Brit Dent J**, v.106, p.208-11, 1959.

CELEBI, H.; BUYUKERKMEK, E.B.; TORLAK, E. Disinfection of polyvinyl siloxane impression material by gaseous ozone. **J Prosthet Dent**, v.120, n.1, p.138-43, 2018.

DAVIES, G.E. et al. Laboratory Investigation of a new antibacterial agent of high potency. **Brit J Pharmacol**, v.9, n.2, p.192-6, 1954.

DENARDI, B.B. O uso da clorexidina na prática odontológica. **Revista da APCD**, p.1279-85, 1994.

DUARTE, D.; VERAS, M.A.; MARTINS, J.A., editors. Perfil evolutivo da resistência do *Staphylococcus aureus* - experiência do Hospital Adventista Silvestre. Programa Oficial e Resumo de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro de Infectologia; 1994; Porto Alegre.

DUTRA, S.R. et al. Esterilização em Ortodontia: eficácia do esterilizador com esferas de vidro. **Dental Press J Orthod**, v.13, n.4, p.60-6, 2008.

FERNÁNDEZ, O.S.L. et al. Ozone Oxidative preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. **Transplant International**, 2007.

GANDINI JUNIOR, L.G. et al. Controle da infecção cruzada em Ortodontia: Parte 1: Hepatite B, desinfecção e aparatologia pessoal. **Dental Press J Orthod**, v.2, n.2, p.77-82, 1997.

GENCO, R.J. et al. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. **J Periodontol**, v.76, n.11 Suppl, p.2075-84, 2005.

GILMOUR, M.I.; SELGRADE, M.K. A comparison of the pulmonary defenses against streptococcal infection in rats and mice following O₃ exposure: differences in disease susceptibility and neutrophil recruitment. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.123, n.2, p.211-8, 1993.

GIULIANI, G. et al. Microbiological aspects of ozone: bactericidal activity and antibiotic/antimicrobial resistance in bacterial strains treated with ozone. **Ozone Therapy**, v.3, n.3, p.7971, 2018.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect**, v.102 Suppl 10, p.5-12, 1994.

HEMS, R.S. et al. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J**, v.38, n.1, p.22-9, 2005.

HUTH, K.C. et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. **Eur J Oral Sci**, v.114, n.5, p.435-40, 2006.

HUYCKE, M.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerg Infect Dis**, v.4, n.2, p.239-49, 1998.

JORGE, A.O.C. et al. Desinfecção de superfície em odontologia: avaliação do álcool gel 70° INPM, lenços embebidos em solução de clorexidina e spray de cloreto de benzalcônio. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v.53, n.2, p.85-164, 2005.

JOSHIPURA, K.J. et al. Periodontal disease, tooth loss, and incidence of ischemic stroke. **Stroke**, v.34, n.1, p.47-52, 2003.

JOSHIPURA, K.J. et al. Poor oral health and coronary heart disease. **J Dent Res**, v.75, n.9, p.1631-6, 1996.

KNORST, M.E.; FINIZOLA FILHO, A.; SALGADO JÚNIOR, L.P. Desinfecção em ortodontia: estudo de um método alternativo utilizando o lenço Bacti Buster StePac LA em alicates ortodônticos e em superfície do mobiliário contra o vírus da Hepatite B e a bactéria *S. aureus* meticilino-resistente. **J Bras Ortodon Ortop facial**, v.4, p.265-70, 1999.

KOMANAPALLI, I.R.; LAU, B.H. Inactivation of bacteriophage lambda, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.49, n.6, p.766-9, 1998.

KRIEGER, D.; BUENO, R.; GABARDO, M.C.L. Perspectivas de biossegurança em odontologia. **Rev. Gestão Saúde**, v.1, p.1-10, 2010.

LENNETTE, E.H. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1985.

LYNCH, E. Evidence-based efficacy of ozone for root canal irrigation. **J Esthet Restor Dent**, v.20, n.5, p.287-93, 2008.

MENEZES, L.M. et al. Protocolo básico de biossegurança na clínica ortodôntica. **R Clin Ortodon Dental Press**, v.5, p.68-76, 2006.

NAGAYOSHI, M. et al. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. **Oral Microbiol Immunol**, v.19, n.4, p.240-6, 2004.

NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **J Endod**, v.30, n.11, p.778-81, 2004.

NOGALES, C.G. et al. Ozone therapy in medicine and dentistry. **J Contemp Dent Pract**, v.9, n.4, p.75-84, 2008.

NOGALES, C.G. et al. Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* - in vitro study. **Revista Espanhola de Ozonioterapia** v.4, p.9-15, 2014.

NOGALES, C.G. et al. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological - ex vivo study and cytotoxicity analyses. **J Appl Oral Sci**, v.24, n.6, p.607-13, 2016.

NOGALES, C.G.; LAGE-MARQUES, J.L. Ozonioterapia: grande potencial para o controle da infecção. In: FERRARI, P.H.; BOMBANA, A.C., editors. A infecção endodôntica e sua resolução. São Paulo: Editora Santos; 2010

OFFENBACHER, S. et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. **Ann Periodontol**, v.3, n.1, p.233-50, 1998.

PARASKEVA, P.; GRAHAM, N.J. Ozonation of municipal wastewater effluents. **Water Environ Res**, v.74, n.6, p.569-81, 2002.

PATIL, S. et al. Extrinsic control parameters for ozone inactivation of *Escherichia coli* using a bubble column. **J Appl Microbiol**, v.107, n.3, p.830-7, 2009.

PERRY, J.D.; JONES, A.L.; GOULD, F.K. Glycopeptide tolerance in bacteria causing endocarditis. **J Antimicrob Chemother**, v.44, n.1, p.121-4, 1999.

PETERSEN, P.E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dent Oral Epidemiol**, v.31 Suppl 1, p.3-23, 2003.

PINHEIRO, S.L. 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**, v.12, n.1, p.94-9, 2018.

PRYOR, W.A.; DAS, B.; CHURCH, D.F. The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity. **Chem Res Toxicol**, v.4, n.3, p.341-8, 1991.

RESTAINO, L. et al. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v.61, n.9, p.3471-5, 1995.

RUBIN, M.B. The History of Ozone. The Schönbeim Period, 1839-1868. **Bull Hist Chem**, v.26, n.1, p.40-56, 2001.

SADER, H. Resistência bacteriana. Fascículo 1 ed. São Paulo: Laboratórios Pfizer; 1998.

SANTOS FILHO, L.; FREITAS, F.I.S.; SIQUEIRA JR, J.P. Evolution of drug-resistance in *Staphylococcus aureus* from a brazilian university hospital. **Folha Medica (Br)** v.108, p.101-3, 1994.

SAVABI, O. et al. Prevention of Cross-contamination Risk by Disinfection of Irreversible Hydrocolloid Impression Materials with Ozonated Water. **Int J Prev Med**, v.9, p.37, 2018.

SEYMOUR, G.J. et al. Relationship between periodontal infections and systemic disease. **Clin Microbiol Infect**, v.13 Suppl 4, p.3-10, 2007.

SORIANO, M.C.D.; PEREZ, S.C.; BAQUES, M.I.C. Eletroestética profissional aplicada teoria y practica para utilización de corrientes en estética. Sorisa - Espanha. 2000:120-3.

STARNBACH, H.; BIDDLE, P. A pragmatic approach to asepsis in the orthodontic office. **Angle Orthod**, v.50, n.1, p.63-6, 1980.

STUBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. **Quintessence Int**, v.37, n.5, p.353-9, 2006.

UNAL, R.; KIM, J.G.; YOUSEF, A.E. Inactivation of *Escherichia coli* O1 57:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Lactobacillus leichmannii* by combinations of ozone and pulsed electric field. **J Food Prot**, v.64, n.6, p.777-82, 2001.

VELANO, H.E. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesqui Odontol Bras**, v.15, n.1, p.18-22, 2001.

WEAVERS, L.K.; WICKRAMANAYAKE, G.B. Disinfection and sterilization using ozone. In: BLOCK, S.S., editor. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001

WEHRLI, F.; STEIMBART, H. Erfahrungen mit der Haematogenen Oxydations-Therapie **Ars Medici**, v.10, p.44-51, 1954.

WOO, J. et al. Compliance with infection control procedures among California orthodontists. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.102, p.68-75, 1992.
