

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO OZONO EM BACTÉRIAS CARIOGÉNICAS

Trabalho submetido por
Marta Filipa de Oliveira Jardim Rocha dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ESTUDO *IN VITRO* DO EFEITO ANTIBACTERIANO DO OZONO EM BACTÉRIAS CARIOGÉNICAS

Trabalho submetido por
Marta Filipa de Oliveira Jardim Rocha dos Santos
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Joana Vasconcelos e Cruz

e coorientado por
Prof.^a Doutora Helena Barroso

Outubro de 2023

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Doutora Joana Vasconcelos e Cruz, por toda a ajuda e dedicação prestadas e por ter sempre acreditado no nosso projeto de investigação. Fico bastante grata pela confiança que teve em mim e pelo rigor, método de trabalho e conhecimento científico que me transmitiu.

À minha coorientadora, Prof.^a Doutora Helena Barroso, que aceitou coorientar este trabalho sem hesitação e esteve sempre disponível para me guiar e esclarecer todas as dúvidas, tornando-se um grande pilar para a realização desta investigação.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, a toda a equipa docente e ao Prof. Doutor José João Mendes, por todas as oportunidades que me proporcionaram e me guiaram na minha evolução enquanto pessoa e futura médica dentista.

A todos os técnicos de laboratório, sobretudo à Daniela Rente, Daniela Guerreiro, Natacha e Susana, obrigada por todo o empenho e simpatia.

Ao Prof. Doutor Luís Proença e ao Prof. Doutor António Delgado, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À 2M Pharma, que durante meses fizeram todos os possíveis para me disponibilizar o material que era imprescindível para as experiências que fiz.

Às minhas amigas, que estiveram presentes durante toda esta jornada e me fizeram sentir em casa. Com um especial carinho à minha colega de box, Flávia, que desde sempre foi o meu porto seguro e me ajudou imenso a ultrapassar os momentos mais difíceis.

Ao meu namorado, David, por todo o apoio incondicional, cumplicidade e paciência ao longo destes anos. Não existem palavras suficientes que expressem os meus sentimentos.

Por fim, à minha família, particularmente aos meus pais, por me instruírem desde cedo os valores morais necessários para tentar o meu melhor todos os dias e nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada, sem vocês nada disto teria sido possível.

Este estudo deu origem à escrita do artigo *“Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacteria and its potential prejudicial effect on dentin bond strength”*, com os respetivos autores: Marta Santos, Flávia Leandro, Prof.^a Doutora Helena Barroso, Prof. Doutor António Delgado, Prof. Doutor Luís Proença, Prof. Doutor Mário Polido e Prof.^a Doutora Joana Vasconcelos e Cruz. Este artigo está em processo de submissão à revista *Pharmaceutics*, na edição especial *“Biomaterials and Agents: Pharmaceutical and Biomedical Applications in Dental Research”*.

Os resultados preliminares deste estudo também foram apresentados no 6º Congresso Internacional do CiiEM *“Immediate and future challenges to foster One Health”* (5-7 julho 2023 no Instituto Universitário Egas Moniz, Portugal), tendo como título *“In vitro study of the antibacterial effect of ozone on cariogenic bacteria”* e como autores: Marta Santos, Flávia Leandro, Prof.^a Doutora Joana Vasconcelos e Cruz, Prof. Doutor Mário Polido, Prof. Doutor António Delgado e Prof.^a Doutora Helena Barroso (Anexo 1).

Resumo

Objetivos: Avaliar *in vitro* a capacidade antibacteriana do ozono em bactérias cariogénicas e comparar diferentes métodos de aplicação, com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de um protocolo clínico universal.

Materiais e Métodos: Suspensões de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, *Lactobacillus casei* ATCC 393 e *Actinomyces naeslundii* DSM 43013 foram expostas a 40 µg/mL de ozono gasoso puro, assim como a 60 e 80 µg/mL de água ozonizada durante 40 e 80 segundos. Adicionalmente, foram também testadas combinações dos dois métodos anteriormente referidos. Foram realizados um grupo de controlo negativo sem ozono (branco) e um grupo de controlo positivo (clorexidina 2%). Após a ação do ozono/clorexidina, as suspensões foram inoculadas em meio de cultura específico e colocadas na estufa a 37°C/48h. Os resultados foram determinados pela contagem do número de UFC (unidades formadoras de colónias) nos meios inoculados.

Resultados: Observou-se uma redução do número de UFC após 40 e 80 segundos de exposição ao ozono em todos os microrganismos testados, existindo reduções bacterianas entre 10^6 e 10^1 . Devido à heterogeneidade de resultados entre ensaios e replicados, não foi possível comparar corretamente a eficácia antibacteriana entre bactérias e entre diferentes métodos e tempos de aplicação.

Conclusão: O ozono apresenta uma capacidade antibacteriana contra todas as bactérias cariogénicas estudadas. Contudo, foram verificadas algumas oscilações nos resultados, que podem ser justificadas pela técnica *in vitro* utilizada e o pH da água. Deste modo, apesar da inequívoca ação antibacteriana do ozono, são necessárias investigações futuras de forma a estabelecer um protocolo reprodutível e estável de aplicação deste gás.

Palavras-chave: ozono; bactérias cariogénicas; cárie dentária; clorexidina.

Abstract

Objective: Evaluate *in vitro* the antibacterial capacity of ozone on cariogenic bacteria and compare different application methods, contributing to the development of a universal clinical protocol.

Materials & Methods: Suspensions of *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, *Lactobacillus casei* ATCC 393 and *Actinomyces naeslundii* DSM 43013 were exposed to 40 µg/mL of pure gaseous ozone, as well as 60 and 80 µg/mL of ozonized water for 40 and 80 seconds. In addition, combinations of the two methods mentioned above were also tested. A negative control group without ozone (blank) and a positive control group (2% chlorhexidine) were performed. After the action of ozone/chlorhexidine, the suspensions were inoculated into a specific culture medium and placed in an incubator at 37°C/48h. The results were determined by counting the number of CFU (colony-forming units) in the inoculated media.

Results: A reduction in the number of CFU was observed after 40 and 80 seconds of exposure to ozone for all the microorganisms tested, with bacterial reductions of between 10^6 and 10^1 . Due to the heterogeneity of results between tests and replicates, it was not possible to properly compare antibacterial efficacy between bacteria and between different methods and application times.

Conclusion: Ozone has an antibacterial capacity against all the cariogenic bacteria studied. However, there were some oscillations in the results, which can be explained by the *in vitro* technique used and the pH of the water. Therefore, despite ozone's unequivocal antibacterial action, future research is needed in order to establish a reproducible and stable protocol for applying this gas.

Keywords: ozone; dental caries; cariogenic bacteria; chlorhexidine.

Índice

I. INTRODUÇÃO.....	13
1. Microbioma oral.....	13
1.1 Fatores modificadores do microbioma oral	14
1.2 Interação com a saúde sistémica.....	14
1.3 Microrganismos cariogénicos.....	15
2. Cárie dentária.....	16
2.1 Prevenção.....	17
2.2 Agentes antibacterianos	18
3. Ozonoterapia na Medicina Dentária	20
3.1 História da ozonoterapia.....	20
3.2 Molécula de ozono.....	21
3.3 Propriedades biológicas do ozono	22
3.4 Indicações	24
3.5 Efeitos adversos.....	24
3.6 Métodos de aplicação de ozono	25
3.6.1 Ozono gasoso	25
3.6.2 Água ozonizada	25
3.6.3 Óleo ozonizado	26
3.7 Aplicações clínicas	26
3.7.1 Dentisteria Minimamente Invasiva.....	27
3.8 Precauções	27
4. Enquadramento.....	28
II. OBJETIVOS.....	29
1. Objetivo geral.....	29
2. Objetivos específicos	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
1. Local do estudo.....	31
2. Tipo de estudo	31
3. Microrganismos e condições de cultura.....	31
4. Preparação das suspensões bacterianas.....	33
5. Grupos de controlo	33
6. Aplicação de ozono.....	35
6.1 1ª Fase do estudo	35
6.2 2ª Fase do estudo	40
7. Contagem do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC).....	43

8. Análise estatística	43
III. RESULTADOS	45
IV. DISCUSSÃO	51
IV. CONCLUSÃO	59
1. Relevância clínica	59
V. PERSPETIVAS FUTURAS	61
VI. BIBLIOGRAFIA	65

Índice de Figuras

<i>Figura 1 - Diversidade do microbioma oral. Criado com BioRender.com.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2 - Evolução de uma lesão de cárie dentária. Criado com BioRender.com.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 3 - Formação da molécula de ozono. Criado com BioRender.com.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4 - Câmara de segurança biológica ninoSAFE class II (Nino Labinteriör, Jungsbacka, Sweden).....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 5 – Esquema representativo da preparação dos microrganismos e respetivos meios de cultura. Criado com BioRender.com.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 6 – Culturas de S. mutans (A), S. sobrinus (B), L. casei (C) e A. naeslundii (D) em meio sólido.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 7 - Esquema representativo da preparação das suspensões bacterianas. Criado com BioRender.com.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 8 - Esquema representativo do protocolo experimental do grupo de controlo negativo. Criado com BioRender.com.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 9 - Esquema representativo do protocolo experimental do grupo de controlo positivo. Criado com BioRender.com.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 10 - Gerador de ozono medicinal Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 11 - Sistemas de ozonização de água utilizados: A - Sistema borbulhador de água (SimplyO₃, Grand Ledge, USA); B - Coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil).</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12 - Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de ozono gasoso (1ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 13 – Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de água ozonizada (1ª fase do estudo). Criado com Biorender.com.</i>	<i>38</i>

<i>Figura 14 - Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de água ozonizada simultânea à aplicação de ozono gasoso (1ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 15 - Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de ozono gasoso (2ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 16 - Esquema representativo da aplicação de água ozonizada (2ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 17 - Esquema representativo da aplicação de água ozonizada e de ozono gasoso em momentos temporais diferentes (2ª fase do estudo). Criado com BioRender.com. ...</i>	<i>42</i>
<i>Figura 18 - Fórmula para cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Criado com BioRender.com.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 19 - Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em S. mutans no grupo O₃_GAS80'' (1ª fase).....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 20 - Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em S. mutans no grupo O₃_H₂O80'' (2ª fase).....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 21 – Exemplo da ação mecânica verificada nos ensaios do grupo O₃_GAS80'' em S.mutans (2ª fase).</i>	<i>47</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Protocolo experimental dos grupos de controle. Nota: Entre cada passo do protocolo, a solução é sempre agitada no vórtex, de modo a homogeneizar a mesma.</i>	<i>34</i>
<i>Tabela 2 - Protocolo experimental da aplicação de ozono gasoso.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 3 - Protocolo experimental da aplicação de água ozonizada.</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 4 – Protocolo experimental da aplicação de água ozonizada simultânea à aplicação de ozono gasoso.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 5 - Diferenças na metodologia entre a 1ª e 2ª fase do estudo.</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 6 – Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em S. mutans (1ª fase).</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 7 – Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em S. mutans (2ª fase).</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 8 - Média aritmética das contagens bacterianas (UFC/mL) dos grupos controle e experimentais da última experiência da 1ª fase do estudo.</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 9 - Média aritmética das contagens bacterianas (UFC/mL) dos grupos controle e experimentais da última experiência da 2ª fase do estudo.</i>	<i>48</i>

Lista de Abreviaturas e Siglas

” | Segundos

°C | Grau Celsius

A. naeslundii | *Actinomyces naeslundii*

A. viscosus | *Actinomyces viscosus*

ATCC | *American Type Culture Collection*

BHI | *Brain Heart Infusion*

CTRL_POS | Controlo positivo

CTRL_NEG | Controlo negativo

DSM | *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*

DTM | Disfunção da articulação temporomandibular

EPS | Matriz de substâncias poliméricas extracelulares

FDA | Food and Drug Administration

GN02 | *Gracilibacteria*

L. casei | *Lactobacillus casei*

L. fermentum | *Lactobacillus fermentum*

L. gasseri | *Lactobacillus gasseri*

L. paracasei | *Lactobacillus paracasei*

L. plantarum | *Lactobacillus plantarum*

L. rhamnosus | *Lactobacillus rhamnosus*

L. salivarius | *Lactobacillus salivarius*

MRS | *Man, Rogosa and Sharp agar*

O₂ | Oxigénio

O₃ | Ozono

O₃_GAS | Ozono gasoso

O₃_H₂O | Água ozonizada

pH | Potencial de hidrogénio

ppm | Partes por milhão

S. mutans | *Streptococcus mutans*

S. sobrinus | *Streptococcus sobrinus*

TM7 | *Saccharibacteria*

UFC | Unidades Formadoras de Colónias

UV | Ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

Atualmente tem-se verificado uma mudança de paradigma na atuação dos médicos dentistas, existindo uma grande preocupação em minimizar a necessidade de tratamentos restauradores, assim como em realizar tratamentos mais conservadores e biocompatíveis, focados na preservação do remanescente dentário (Libonati et al., 2019; Santos et al., 2020).

Deste modo, existe uma necessidade acrescida em controlar os fatores etiológicos envolvidos na progressão das lesões de cárie. Consequentemente, muitos agentes antibacterianos, tais como o ozono, têm sido utilizados com o objetivo de reduzir os níveis de microrganismos na placa dentária ou no remanescente dentário após a remoção do tecido cariado (Libonati et al., 2019; Mese et al., 2020; Santos et al., 2020). Torna-se assim de elevada importância estudar a eficácia destes agentes antibacterianos, testando novas técnicas e criando protocolos clínicos universais, sendo estes os principais focos de estudo desta tese de mestrado.

1. Microbioma oral

A cavidade oral humana é composta por um microbioma oral bastante diversificado, incluindo bactérias, fungos, vírus, arqueas e protozoários (Figura 1). As bactérias formam comunidades estruturalmente organizadas, com a terminologia de biofilme, incorporadas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Esta matriz fornece proteção, estabilidade mecânica e uma maior resistência à ação dos agentes antimicrobianos, sendo o biofilme mais difícil de remover (Chen et al., 2020; Pitts et al., 2017).

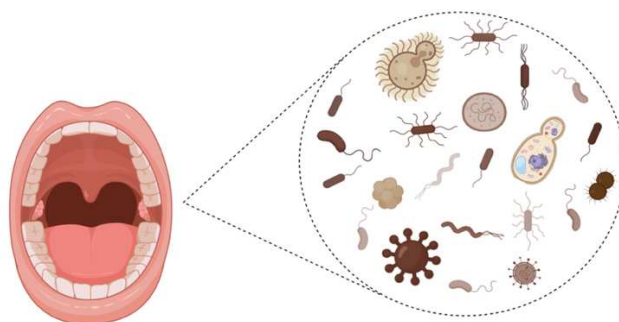


Figura 1 - Diversidade do microbioma oral. Criado com BioRender.com.

Estudos moleculares demonstraram que as bactérias orais mais abundantes pertencem a 12 filos bacterianos (nos quais foram identificadas cerca de 700 espécies de procariotas): *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Spirochaetes*, SR1, *Synergistetes*, *Saccharibacteria* (TM7) e *Gracilibacteria* (GN02) (Deo & Deshmukh, 2019). No entanto, a composição do microbioma oral difere de um local da cavidade oral para outro e é diferente entre indivíduos, refletindo de certa forma a dieta do hospedeiro e a sua resposta imunitária ao biofilme microbiano (Costalonga & Herzberg, 2014).

Os microrganismos orais comensais têm uma relação simbiótica com o hospedeiro, pois beneficiam de um *habitat* quente e nutritivo fornecido pelo hospedeiro e, em troca, atuam como uma barreira para microrganismos patogênicos e modulam o sistema imunitário (Costalonga & Herzberg, 2014; Lamont et al., 2018; Pitts et al., 2017). Os dentes, a saliva, a língua, a mucosa jugal, o sulco gengival, as amígdalas, o palato duro e o palato mole proporcionam um ambiente rico para estes microrganismos (Deo & Deshmukh, 2019).

1.1 Fatores modificadores do microbioma oral

As características do microbioma oral são influenciadas por fatores genéticos e ambientais, incluindo alterações hormonais, idade, dieta, má higiene oral, tabagismo, materiais dentários (restaurações, coroas, implantes e próteses dentárias), doenças sistêmicas ou medicamentos. Estes fatores influenciam negativamente a composição do microbioma oral para um estado disbiótico, originando o aparecimento de microrganismos patogênicos que causam doenças como a cárie dentária, doença periodontal, infecções endodônticas e candidíase oral, que consequentemente influenciam a saúde sistêmica (Bacali et al., 2022; Lamont et al., 2018; Philip et al., 2018).

1.2 Interação com a saúde sistêmica

A interação entre o microbioma oral e a saúde sistêmica está a ser amplamente estudada. A cavidade oral serve como uma porta para a disseminação de microrganismos patogênicos em locais extra-orais, causando uma inflamação sistêmica (Bacali et al., 2022; Sampaio-Maia et al., 2016). Estes microrganismos têm sido associados a várias doenças, tais como doenças cardiovasculares, endocardite bacteriana, diabetes *mellitus*,

parto prematuro, doenças autoimunes, osteoporose, doenças neurodegenerativas, pneumonia e cancro (Bacali et al., 2022; Krishnan et al., 2017; Sampaio-Maia et al., 2016).

1.3 Microrganismos cariogénicos

As principais bactérias associadas às lesões de cárie são, respetivamente, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.* e *Actinomyces spp.* Para além destas, *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Cornybacteria spp.*, *Fusobacteria spp.*, *Neisseria spp.*, *Prevotella spp.*, *Selenomonas spp.*, *Veillonella spp.*, *Propionibacterium spp.* e *Atopobium spp.* também se encontram relacionadas com a patogénese da cárie dentária (Chen et al., 2015; Cherukuri et al., 2020; Kianoush et al., 2014).

Neste sentido, a cárie dentária é uma doença mediada por um biofilme diversificado e não por um microrganismo específico (Philip et al., 2018). Por esse motivo, foram selecionadas quatro bactérias para este estudo: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*), *Lactobacillus casei* (*L. casei*) e *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*).

Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus*

Os microrganismos *Streptococcus* do grupo *mutans*, nomeadamente *S. mutans* e *S. sobrinus* são considerados os principais microrganismos cariogénicos. Ambos são bactérias Gram-positivo, anaeróbias facultativas e em forma de cocos, formando tipicamente cadeias ou pares quando observados ao microscópio (Lamont et al., 2018; Matsumoto-Nakano, 2018).

Estas bactérias são colonizadores primários e têm a capacidade de aderir às superfícies e fissuras das coroas dentárias e produzir ácidos orgânicos como subprodutos metabólicos. São altamente acidogénicas e acidúricas, principalmente numa dieta rica em sacarose (Chokshi et al., 2016; Matsumoto-Nakano, 2018). Para além disso, os estudos sugerem que também têm um papel na etiologia das cáries radiculares (Chokshi et al., 2016).

Lactobacillus casei

Lactobacillus são bactérias Gram-positivo, anaeróbias facultativas ou microaerófilas e em forma de bastonete. As estirpes mais identificadas em lesões de cárie no adulto e na criança são *L. casei/paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. salivarius* e *L. plantarum* (Huang et al., 2018; Wen et al., 2022).

Ao contrário de *Streptococcus* do grupo *mutans*, que estão mais relacionados ao início da cárie dentária, *Lactobacillus* estão mais envolvidos com a progressão da lesão, sendo encontrados em cáries de dentina mais extensas (Chokshi et al., 2016). No entanto, têm uma aderência fraca e por esse motivo, não estão implicados na formação da placa bacteriana, dependendo de outros microrganismos produtores de ácido (Jiang et al., 2014; Wen et al., 2022).

Actinomyces naeshlundii

As espécies bacterianas do gênero *Actinomyces* são Gram-positivo, anaeróbias facultativas e em forma de bastonete (Murray & Cassese, 2016). As principais estirpes envolvidas são *A. naeshlundii* e *A. viscosus*, sendo ambas colonizadores primários. Estas também contribuem para a iniciação e progressão da cárie dentária, especialmente da cárie radicular (Chokshi et al., 2016; Lamont et al., 2018).

2. Cárie dentária

A cárie dentária é uma das doenças crônicas mais prevalentes no mundo. Esta é uma doença multifatorial e progressiva, caracterizada pela desmineralização da matriz inorgânica do dente (Abranches et al., 2018; Pitts et al., 2017).

Inicialmente, a desmineralização ocorre na superfície dos cristais de hidroxiapatite do esmalte. A partir do momento que se perde quantidade mineral suficiente, a lesão de cárie inicial aparece clinicamente como uma lesão de *white spot*. Ao progredir, a porosidade da superfície aumenta e formam-se micro-cavitações no esmalte, até colapsar numa cavitação e atingir a dentina e posteriormente a polpa (Abranches et al., 2018; Pitts et al., 2017), tal como ilustrado na Figura 2.

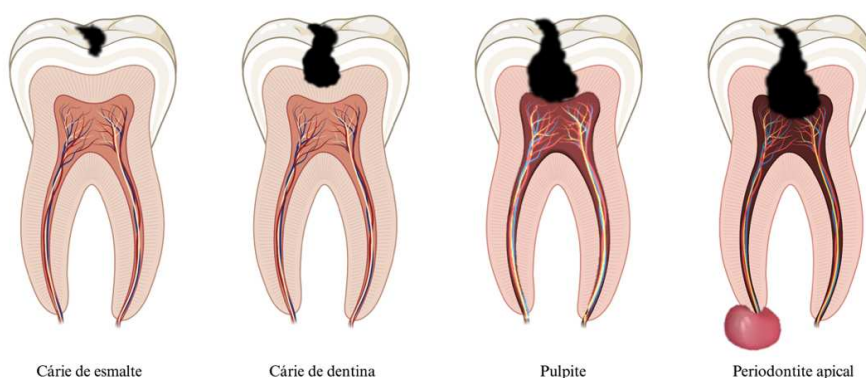


Figura 2 - Evolução de uma lesão de cárie dentária. Criado com BioRender.com.

Ao haver uma exposição regular de hidratos de carbono fermentáveis, ocorre a formação de subprodutos ácidos, predominantemente ácido láctico, resultantes da fermentação bacteriana dos hidratos de carbono, o que causa uma diminuição do pH local. Quando o pH desce abaixo do valor 5.5, considerado crítico, ocorre uma difusão de cálcio e fosfato (desmineralização). Por existirem condições repetidas de pH ácido, existe o favorecimento do crescimento e metabolismo de bactérias acidúricas e acidogênicas, tais como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii*, inibindo as bactérias que crescem preferencialmente em pH neutro (Arthur et al., 2014; Philip et al., 2018; Pitts et al., 2017, 2021).

2.1 Prevenção

Numa fase inicial, as lesões de cárie podem ser prevenidas, revertidas ou estabilizadas através da inibição direta e/ou indireta das bactérias implicadas. A inibição bacteriana direta verifica-se através da aplicação de agentes antibacterianos e a sua inibição indireta ocorre ao existir uma redução da quantidade e frequência de ingestão de hidratos de carbono fermentáveis (açúcar), uma correta higiene oral, com a estimulação de saliva, aplicação de selantes e, por fim, com a toma de pré-bióticos e probióticos, que favorecem o crescimento de bactérias orais comensais e restringem o crescimento de bactérias cariogênicas (Arthur et al., 2014; Krupa et al., 2022; Pitts et al., 2021).

2.2 Agentes antibacterianos

Existem diversos agentes antibacterianos amplamente estudados, tais como a clorexidina, o triclosan, o flúor e o xilitol.

Clorexidina

A clorexidina é uma biguanida catiónica com uma substantividade de até 12 horas, que aumenta a permeabilidade da membrana celular bacteriana, altera o equilíbrio osmótico e provoca danos celulares irreversíveis dependendo da sua concentração. Assim sendo, pode ser usada como agente bacteriostático ou bactericida consoante a sua indicação terapêutica (Deus & Ouanounou, 2022; Oporto et al., 2021).

Atualmente, é o agente mais eficaz contra *Streptococcus mutans* e tem uma grande capacidade bactericida contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Consequentemente, é bastante comercializada na forma de colutório, gel e verniz. No entanto, apresenta alguns efeitos adversos com a sua utilização a longo prazo, tais como pigmentação dentária, disgeusia e erosão da mucosa oral. Deste modo, não é recomendada a sua utilização por mais de um mês (Deus & Ouanounou, 2022; Oporto et al., 2021; Shah et al., 2022).

Flúor

O flúor apresenta um efeito antibacteriano contra microrganismos orais, incluindo *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius* (Ma et al., 2014). Este efeito deve-se à sua capacidade de inibir vias metabólicas principais, como a glicólise, através da inibição enzimática da enolase, catalase, fosfatases, etc (Han, 2021; Murashko et al., 2023). Posto isto, causa uma diminuição da síntese de ATP, o que prejudica ou inibe completamente o crescimento bacteriano. Para além disso, o flúor também aumenta a permeabilidade da membrana, ocorrendo uma maior absorção de prótons que induzem uma acidificação citoplasmática. Também promove a remineralização do esmalte e por estes motivos, a água fluoretada, os vernizes de flúor, os colutórios e os dentífricos fluoretados desempenham um papel bastante importante na prevenção da cárie dentária (Han, 2021; Murashko et al., 2023).

Contudo, a sua eficácia antibacteriana não é comparável à da clorexidina e a sua ingestão numa concentração elevada é tóxica para o trato gastrointestinal, provocando náuseas, vômitos e dor abdominal. A exposição crónica a este composto tem sido alvo de preocupações e controvérsias (Adkins & Brunst, 2021; Ma et al., 2014; Wassel & Khattab, 2017).

Alguns estudos têm caracterizado o flúor como um disruptor endócrino, verificando-se uma redução nos níveis séricos das hormonas sexuais e tiroideias, e como um agente neurotóxico, principalmente em crianças e adolescentes, no qual indicam que pode causar atrasos no desenvolvimento cognitivo e perturbações na concentração, memória e sono. No entanto, são necessárias mais investigações para determinar o verdadeiro risco destes efeitos em doses baixas de flúor e, simultaneamente, desenvolver agentes antibacterianos mais eficazes e com menos efeitos nefastos para o organismo (Adkins & Brunst, 2021; Grandjean, 2019; Johnston & Strobel, 2020; Skórka-Majewicz et al., 2020).

Triclosan

O triclosan é um bisfenol que inibe a síntese bacteriana de ácidos gordos e em microrganismos orais como *Streptococcus mutans*, inibe a via metabólica da glicose. Em concentrações mais elevadas, tem atividade bactericida ao atuar diretamente na membrana celular bacteriana (Forbes et al., 2016; Riley & Lamont, 2013).

A legislação europeia permite a utilização desta substância numa concentração máxima de 0.3%, considerada segura, sendo bastante utilizada em dentífricos (Infarmed, 2014). Contudo, o triclosan foi proibido em produtos de venda livre pela Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos em setembro de 2016, devido à falta de evidência científica sobre o seu efeito antibacteriano e pelo aparecimento de estudos que sugerem um efeito desregulador endócrino (Food and Drug Administration, 2016; Wang & Tian, 2015).

Desta forma, com a descoberta dos efeitos secundários dos agentes antibacterianos anteriormente referidos, estão a ser atualmente testados produtos mais naturais, com uma maior segurança, tais como o xilitol e o ozono (Almaz & Sönmez, 2015; Nayak et al., 2014).

Xilitol

O xilitol é um adoçante natural que, ao contrário de outros açúcares, não é fermentável por bactérias orais. Por esse motivo, ao interromper as vias de produção de energia, inibe o crescimento de determinadas espécies, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*. Reduz também a adesão destes microrganismos à superfície dentária e promove a remineralização dentária ao aumentar o fluxo salivar quando utilizado em forma de pastilha. Assim sendo, é indicado em dentífricos, colutórios e pastilhas elásticas (Hajiahmadi et al., 2021; Nasseripour et al., 2021).

Para pacientes com disfunção da articulação temporomandibular (DTM), devem ser utilizados rebuçados de xilitol, ao invés de pastilhas elásticas. No entanto, é necessário haver precaução com a sua toma, pois pode causar alterações gastrointestinais em doses elevadas (Nayak et al., 2014).

3. Ozonoterapia na Medicina Dentária

3.1 História da ozonoterapia

Em 1785, Martin Van Marun, um físico holandês, verificou um gás com um cheiro característico após a passagem de faíscas elétricas na sua máquina eletrostática. No entanto, apenas em 1840, Christian F. Schönbein, professor na universidade de Basel, atribuiu a este gás o nome “ozono”, tendo origem na palavra grega *ozein* que significa “odor”. Este descreveu a reação química que leva à formação do ozono a partir do oxigénio e por estes feitos é considerado o “pai da ozonoterapia” (Naik et al., 2016; Srikanth et al., 2013).

Posteriormente, em 1930, o dentista suíço Dr. E. A. Fisch relatou a utilização de água ozonizada como desinfetante e cicatrizante após cirurgias dentárias. Consequentemente, levou a uma evolução no âmbito da Medicina Dentária, tendo vindo a ser utilizada por um número crescente de médicos dentistas em todo o mundo (Gallo & Scribante, 2021; ISCO3, 2020).

Nas últimas décadas, ocorreu um aumento de estudos científicos com o objetivo de compreender melhor os seus mecanismos básicos de ação e efeitos sistémicos (de Sire et

al., 2021). Diversas associações científicas internacionais foram criadas, particularmente a *International Scientific Committee of Ozone Therapy* e na atualidade a ozonoterapia é legal em diversos países (ISCO3, 2020). Em Portugal, é categorizada como uma competência setorial em Medicina Dentária desde 2021 (OMD, 2021).

3.2 Molécula de ozono

O elemento oxigénio existe em duas formas alotrópicas, em que para além do oxigénio diatómico mais comum (O_2), existe uma variante triatómica (O_3) denominada “ozono” (Barczyk et al., 2023). A sua formação ocorre quando uma molécula de oxigénio é submetida a radiação ultravioleta (UV) de alta energia e divide-se em dois átomos de oxigénio livres, que por sua vez colidem com moléculas de oxigénio diatómicas, formando uma molécula triatómica (Gulafsha & Anuroopa, 2019) (Figura 3).

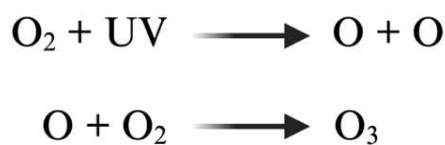


Figura 3 - Formação da molécula de ozono. Criado com BioRender.com.

Embora o ozono em si não seja um radical, é o terceiro oxidante mais potente, sendo o primeiro o flúor. Tem um potencial de oxidação aproximadamente 150% maior que o do cloro quando utilizado como agente antimicrobiano contra bactérias, vírus, fungos e protozoários (Barczyk et al., 2023; Gupta & Deepa, 2016).

Deste modo, com o objetivo de aproveitar as propriedades do ozono para fins medicinais, este é produzido utilizando um gerador de ozono, em que o produto final é uma mistura gasosa que contém 95-99,5% de O_2 puro e 0,1-5% de O_3 . No entanto, o ozono é um gás termodinamicamente instável e transforma-se facilmente em oxigénio puro, sendo a sua semivida de 40 minutos a 20°C ou 140 minutos a 0°C. Por ser altamente instável e dependente da temperatura e pressão, este não pode ser armazenado e deve ser utilizado no momento (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Suh et al., 2019; Tiwari et al., 2017).

3.3 Propriedades biológicas do ozono

Os estudos demonstram que o ozono apresenta propriedades antimicrobianas, imunoestimulantes, anti-hipóxicas, anti-inflamatórias, analgésicas, biossintéticas e remineralizantes (Gallo & Scribante, 2021; Gupta & Deepa, 2016; Liaqat et al., 2022).

Ação antimicrobiana

Os efeitos antimicrobianos do ozono verificam-se em bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários (Gallo & Scribante, 2021; Gupta & Deepa, 2016).

Relativamente à sua ação antibacteriana, esta abrange bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, sendo as bactérias Gram-positivo as mais suscetíveis (Sen & Sen, 2020). O ozono provoca a oxidação de fosfolípidos e lipoproteínas do invólucro celular bacteriano, destruindo a parede celular e rompendo a membrana citoplasmática, permitindo que o próprio ozono se infiltre dentro dos microrganismos. Consequentemente, oxida glicoproteínas e glicolípidos, bloqueando assim a função enzimática, o que leva a uma perda de função dos organelos (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Mese et al., 2020).

A sua ação aumenta em meio líquido, especialmente em pH ácido, característico das lesões de cárie (Naik et al., 2016). Nesse sentido, alguns estudos demonstram uma eficácia bastante significativa contra bactérias cariogénicas, tais como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii* (Tiwari et al., 2017).

De modo complementar, o ozono apresenta uma atividade antimicrobiana nos fungos ao inibir o crescimento celular em determinadas fases de reprodução, enquanto que nos vírus danifica a cápside viral e perturba a sua replicação ao interferir na ligação do vírus com a célula hospedeira (Gallo & Scribante, 2021; Tiwari et al., 2017).

Esta ação do ozono é inespecífica e seletiva para as células microbianas, não tendo efeito nas células do corpo humano devido à sua capacidade antioxidante. Desta forma, o stress oxidativo causado pelo ozono é prejudicial aos microrganismos e não às células humanas (Gallo & Scribante, 2021; Naik et al., 2016).

Efeito imunoestimulante

O ozono estimula o sistema imunitário celular e humoral e, conseqüentemente, a proliferação de células imunocompetentes, síntese de imunoglobulinas e a ativação de macrófagos. Como resultado, ocorre a produção de citocinas como interleucinas, prostaglandinas e leucotrienos que reduzem a inflamação e auxiliam na cicatrização e no controle da dor (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Naik et al., 2016). No entanto, é importante referir que o seu efeito é dose-dependente, tendo em concentrações elevadas um efeito imunossupressor e em concentrações baixas um efeito imunoestimulante (Srikanth et al., 2013).

Efeito anti-hipóxico, anti-inflamatório e analgésico

O ozono aumenta a pressão parcial de oxigênio nos tecidos e melhora o transporte de oxigênio no sangue, provocando uma alteração do metabolismo celular (Gupta & Deepa, 2016). Este também diminui a produção de mediadores de inflamação e inativa os mediadores da dor por oxidação. Para além disso, ao melhorar a microcirculação sanguínea local, assiste na eliminação de toxinas e na resolução de distúrbios que provocam dor (Naik et al., 2016).

Efeito biossintético

O ozono desencadeia a ativação dos mecanismos de síntese proteica nas células. Com o aumento da quantidade de mitocôndrias e ribossomas, existe um aumento da atividade funcional e da regeneração de tecidos e órgãos (Gulafsha & Anuroopa, 2019).

Efeito de remineralização

Foi também estudado o potencial de remineralização do ozono quando atua sobre as substâncias orgânicas dos dentes. Verificou-se que este permite a difusão de iões de cálcio e fósforo para a superfície interna do dente cariado através da abertura dos túbulos dentinários. Desta forma, o ozono aumenta a penetração de agentes remineralizantes (Libonati et al., 2019; Sen & Sen, 2020).

3.4 Indicações

Segundo Gupta & Deepa (2016), Liaqat e colaboradores (2022) e Sen & Sen (2020), a ozonoterapia está indicada em casos de:

- Controlo da placa bacteriana;
- Tratamento da halitose;
- Profilaxia e prevenção de cáries;
- Remineralização de cáries de fossas e fissuras, radiculares e de superfície lisa;
- Irrigação/insuflação em tratamentos restauradores;
- Branqueamento dentário;
- Dessensibilização dentária;
- Desinfecção de próteses fixas/removíveis;
- Irrigação/insuflação em tratamentos endodônticos;
- Irrigação/insuflação em tratamentos periodontais;
- Tratamento em casos de gengivite;
- Tratamento de feridas e processos inflamatórios;
- Tratamento em determinadas patologias dos tecidos moles;
- Tratamento antibacteriano durante/após cirurgias dentárias ou de implantes;
- Controlo da dor;
- Tratamento de disfunções temporomandibulares.

3.5 Efeitos adversos

A inalação de ozono pode ser tóxica para o sistema pulmonar e causar alguns efeitos adversos como tosse, náuseas, vômitos, dores de cabeça, epífora, rinite, irritação das vias respiratórias superiores, falta de ar e problemas cardíacos (Gupta & Deepa, 2016; Naik et al., 2016).

No entanto, segundo as diretrizes da *Madrid Declaration on Ozone Therapy*, a maioria dos efeitos adversos relatados encontra-se relacionada com a *mala praxis* (incorreta técnica ou via de administração e concentração de ozono administrado), com a exposição por inalação e com *overdose* acidental (ISCO3, 2020). Dito isto, em Medicina

Dentária as complicações causadas pela ozonoterapia são pouco frequentes (Naik et al., 2016).

3.6 Métodos de aplicação de ozono

Os métodos de aplicação de ozono em Medicina Dentária incluem ozono gasoso, água ozonizada e/ou óleo ozonizado. Estas podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação, dependendo da aplicação clínica e dos resultados esperados (Barczyk et al., 2023; Naik et al., 2016).

3.6.1 Ozono gasoso

O ozono em gás é frequentemente utilizado em Medicina Dentária Conservadora/Dentisteria e Endodontia (Gulafsha & Anuroopa, 2019). Normalmente este é administrado localmente através de um sistema de sucção selado, de modo a evitar a sua inalação e efeitos adversos (Gupta & Deepa, 2016). O ozono na sua forma gasosa tem a capacidade de penetrar profundamente e alcançar a dentina cariada, túbulos dentinários e até mesmo áreas de difícil acesso que são difíceis de desinfetar durante a preparação químico-mecânica dos canais radiculares. Para além disso, ao penetrar através do forâmen apical, promove a regeneração e cicatrização óssea (Barczyk et al., 2023; Sen & Sen, 2020).

3.6.2 Água ozonizada

Águas de alta pureza, como as de osmose reversa, são as mais adequadas para a produção de água ozonizada em Medicina Dentária. Dependendo da coluna de ozonização e da sua tecnologia de mistura ozono/água, a concentração final de ozono dissolvido pode ser por volta de 1/4 a 1/5 da concentração de gás aplicada no gerador. É necessário ter também em atenção que a solubilidade do ozono é muito maior em água refrigerada (2-3°C) do que em água à temperatura ambiente, para além de ser menos reativo. Porém, é menos conveniente de ser aplicada em casos de hipersensibilidade ao frio (ISCO3, 2020).

A água ozonizada é bastante utilizada como colutório em casos de halitose, gengivite, candidíase oral e estomatite. A sua irrigação é também realizada nos canais radiculares durante o tratamento endodôntico ou em bolsas periodontais após o tratamento periodontal não cirúrgico (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Suh et al., 2019). Para além disso, também pode ser utilizada no abastecimento de água na cadeira do consultório, ou seja, como colutório pré-tratamento para que o paciente possa desinfetar a sua cavidade oral no início da consulta (Sen & Sen, 2020).

Uma grande vantagem de ser utilizada água ozonizada é eliminar o risco de o ozono ser inalado pelo trato respiratório. No entanto, os estudos indicam que tem uma menor eficácia antimicrobiana em comparação ao ozono gasoso (Gupta & Deepa, 2016).

3.6.3 Óleo ozonizado

O óleo ozonizado é bastante útil em Medicina Oral devido às suas propriedades antimicrobianas e cicatrizantes nas lesões orais e infeções fúngicas. Este apresenta uma grande acessibilidade e segundo as diretrizes da *Madrid Declaration on Ozone Therapy*, é recomendável a compra de óleos ozonizados com os seus componentes documentados, ao invés de realizar a sua produção, pois evita-se assim a formação de subprodutos tóxicos secundários (Gupta & Deepa, 2016; ISCO3, 2020).

3.7 Aplicações clínicas

A ozonoterapia pode ser utilizada em diversas áreas da Medicina Dentária como a Medicina Dentária Preventiva e Conservadora, Endodontia, Periodontologia, Cirurgia Oral, Medicina Oral, Implantologia, Reabilitação Oral, Oclusão, Ortodontia e até mesmo Oncologia da cabeça e pescoço. Para além da sua aplicabilidade clínica nos pacientes, o ozono também pode ser utilizado para a desinfecção do próprio consultório (Barczyk et al., 2023).

No entanto, alguns autores reconhecem que esta terapia deve ser usada como uma abordagem complementar, muitas vezes em combinação com o tratamento convencional, e não como uma alternativa (Barczyk et al., 2023).

3.7.1 Dentisteria Minimamente Invasiva

Remineralização de lesões de cárie

As fossas e fissuras profundas são difíceis de higienizar e por isso são altamente suscetíveis ao alojamento de alimentos, resultando na acumulação de placa bacteriana. Por esse motivo, a aplicação de ozono nestes casos tem-se revelado altamente eficaz. Recomenda-se uma limpeza das fissuras antes do tratamento com ozono e após a sua aplicação a colocação de um agente remineralizante e o selamento das fissuras (Tiwari et al., 2017).

Remoção seletiva da lesão de cárie

A remoção completa de todo o esmalte e dentina cariada em lesões de cárie profundas pode resultar em exposição pulpar. Nesse sentido, cada vez mais se realizam protocolos minimamente invasivos com uma remoção seletiva das lesões de cárie, que são divididos em *one-step* e *two-step/stepwise excavation method*. Nestes métodos, durante a remoção do tecido cariado mantém-se uma camada fina de dentina cariada interna (afetada) que apresenta capacidade de remineralização. A restauração definitiva pode ser realizada na mesma consulta (*one-step*) ou coloca-se uma restauração provisória, implicando uma segunda consulta (*stepwise excavation*). Desta forma, com o passar do tempo ocorre a formação de dentina terciária, o que evita a possibilidade de existir uma exposição pulpar (Mese et al., 2020; Warreth, 2023).

Complementarmente, a utilização de agentes antimicrobianos cavitários como o ozono contribui para a redução das bactérias remanescentes nos túbulos dentinários, o que permite evitar a progressão da lesão e diminuir a necessidade de uma segunda consulta (Mese et al., 2020).

3.8 Precauções

Em caso de intoxicação com o ozono, o doente deve ser colocado em decúbito dorsal e inalar oxigénio. A ingestão oral de vitamina E, vitamina C e N-acetilcisteína também é benéfica, principalmente na exposição crónica a ozono (Gulafsha & Anuroopa, 2019; Gupta & Deepa, 2016).

Segundo ISCO3 (2020) e Naik e colaboradores (2016), a utilização de ozono gasoso é o método mais propenso a realizar inalação acidental e, por esse motivo, é fundamental que o médico dentista tome todas as medidas de segurança, tais como:

- Interromper imediatamente o procedimento se o odor específico do ozono for detetado e verificar a existência de alguma fuga;
- Usar, sempre que possível, aspiração de alto débito e uma campânula de silicone flexível adaptada a uma seringa com conexão Luer Lock;
- Certificar-se da presença de vitamina C (em formato de dose única) e de oxigênio medicinal com uma máscara e um humidificador no consultório;
- Usar materiais resistentes ao ozono tais como o vidro, o silicone e o teflon.

4. Enquadramento

A remoção convencional do tecido cariado não garante a eliminação total das bactérias cariogênicas, podendo surgir consequências como cáries secundárias, sensibilidade pós-operatória e inflamação pulpar. Posto isto, para além do poder preventivo dos agentes antibacterianos na cárie dentária, alguns destes também podem ser importantes para o sucesso de uma restauração como um tratamento complementar antibacteriano, principalmente quando é efetuada uma preparação cavitária minimamente invasiva (Cangul et al., 2020; Sancakli et al., 2018).

Com estas intenções, as propriedades antibacterianas do ozono têm sido estudadas e comparadas à ação da clorexidina, porém os resultados nem sempre são consistentes (Barczyk et al., 2023) e a qualidade de evidência é considerada baixa (Santos et al., 2020). De um modo geral, existe uma ausência de informações relevantes sobre aspetos metodológicos nos estudos e, quando estas se encontram especificadas, verifica-se uma heterogeneidade entre protocolos aplicados, tanto na concentração e tempo de aplicação como no tipo de gerador e oxigênio utilizados (Gallo & Scribante, 2021; Santos et al., 2020; Tricarico et al., 2020).

Desta forma, esta investigação surge da necessidade de testar *in vitro* a capacidade antibacteriana do ozono e uniformizar uma metodologia de aplicação.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar *in vitro* a capacidade antibacteriana do ozono em bactérias cariogénicas, de forma a testar a sua ação preventiva ou como um tratamento coadjuvante não invasivo da cárie dentária.

2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos, este estudo pretende:

- Testar, em ambiente controlado, a suscetibilidade de uma gama diversificada de estirpes bacterianas cariogénicas, nomeadamente, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii*, à exposição de ozono;
- Determinar qual o método de aplicação de ozono (água, gás ou ambos em simultâneo) e tempo de exposição mais eficaz;
- Contribuir para o desenvolvimento de um protocolo universal, no qual se assegura uma ação antibacteriana ideal como medida preventiva ou terapêutica contra a cárie dentária;
- Destacar potenciais áreas para futuras investigações no domínio da ozonoterapia na Medicina Dentária.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Local do estudo

O estudo decorreu nas instalações do Instituto Universitário Egas Moniz, no laboratório de Microbiologia Aplicada, entre março e julho de 2023.

2. Tipo de estudo

Caracteriza-se por um estudo experimental *in vitro*, no qual todos os ensaios foram realizados na câmara de segurança biológica ninoSAFE class II (Nino Labinteriör, Jungsbacka, Sweden) (Figura 4), de modo a garantir a esterilidade da área de trabalho.



Figura 4 - Câmara de segurança biológica ninoSAFE class II (Nino Labinteriör, Jungsbacka, Sweden).

3. Microrganismos e condições de cultura

Os microrganismos utilizados foram *Streptococcus mutans* ATCC 35668 (*S. mutans*), *Streptococcus sobrinus* DSM 20742 (*S. sobrinus*), *Lactobacillus casei* ATCC 393 (*L. casei*) e *Actinomyces naeslundii* DSM 43013 (*A. naeslundii*) (adquiridos à American Type Culture Collection, Virginia, USA e ao Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany).

Inicialmente as estirpes bacterianas encontravam-se liofilizadas, tendo sido reconstituídas (reativadas) com meio líquido de *Brain Heart Infusion* (BHI) (no caso de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *A. naeslundii*), ou em *Man, Rogosa and Sharp agar* (MRS) (no

caso de *L. casei*). Foram incubadas na estufa (VWR, Radnor, USA) a 37°C durante 48 horas, em atmosfera de anaerobiose (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) para *S. mutans*, *S. sobrinus* e *A. naeslundii* e em atmosfera de microaerofilia (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, France) para *L. casei*.

De seguida, cada estirpe foi inoculada através de estrias múltiplas em meios de cultura sólidos apropriados para o seu crescimento, particularmente, gelose de sangue (Biogerm, Maia, Portugal) para *S. mutans* e *S. sobrinus*, MRS agar (Biokar Diagnostics, Allonne, France) para *L. casei* e gelose de chocolate (Biogerm, Maia, Portugal) para *A. naeslundii*.

Após a sua inoculação, os meios foram incubados na estufa (VWR, Radnor, USA) a 37°C durante 48 horas, sendo que os de gelose de sangue e chocolate foram colocados em condições de anaerobiose (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) e os de MRS agar em microaerofilia (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, France) (Figura 5).

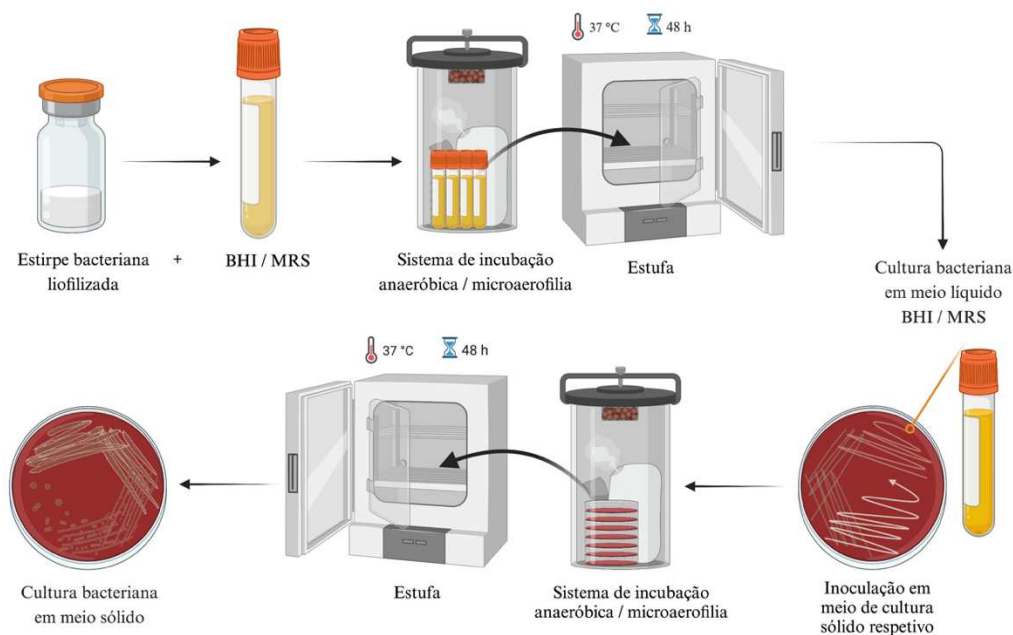


Figura 5 – Esquema representativo da preparação dos microrganismos e respetivos meios de cultura. Criado com BioRender.com.

Com o objetivo de manter um stock padrão a longo prazo, 850 µL da cultura bacteriana em meio líquido foram adicionados a 150 µL de glicerol e armazenados em freezer a -80°C (Arctiko, Esbjerg, Denmark).

4. Preparação das suspensões bacterianas

Através dos meios de cultura sólidos previamente inoculados (Figura 6) foram preparadas suspensões de cada microrganismo em 10 mL de água ultrapura estéril Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) e misturadas no vórtex ZX3 (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italy). De forma a garantir a padronização das suspensões, utilizou-se o densitómetro McFarland DEN-1 (Grant Instruments, Cambridgeshire, United Kingdom), que permitiu obter um conteúdo microbiano aproximado de 10^8 UFC/mL (escala de McFarland 1) (Figura 7).

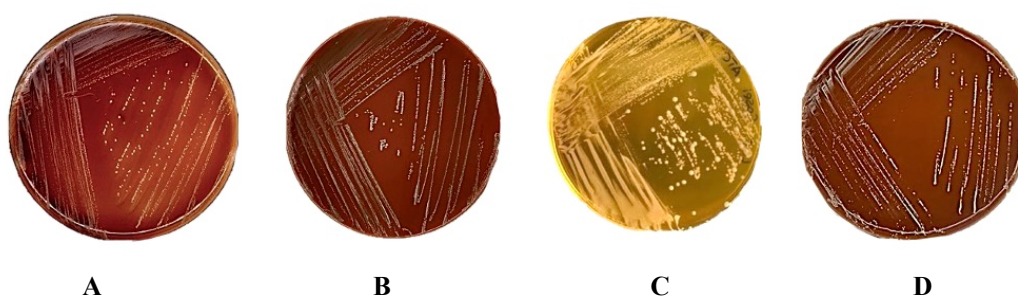


Figura 6 – Culturas de *S. mutans* (A), *S. sobrinus* (B), *L. casei* (C) e *A. naeslundii* (D) em meio sólido.

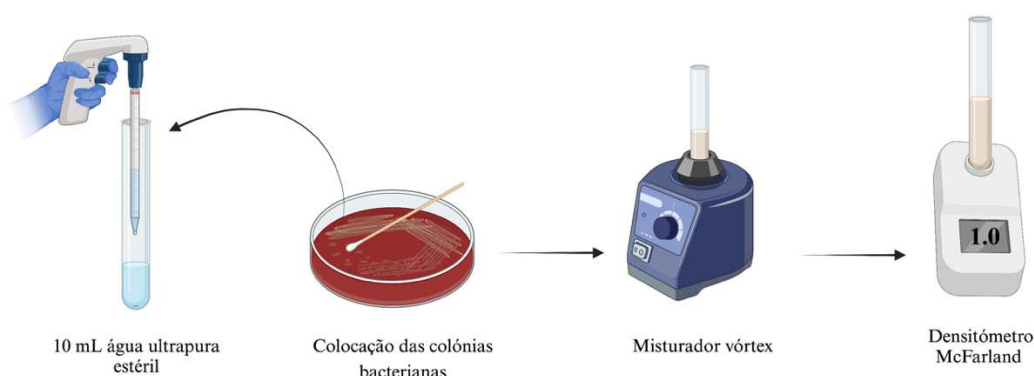


Figura 7 - Esquema representativo da preparação das suspensões bacterianas. Criado com BioRender.com.

5. Grupos de controlo

Cada ensaio independente, para cada microrganismo, foi realizado em triplicado e incluiu os grupos experimentais e simultaneamente um grupo de controlo negativo, no qual as bactérias não foram submetidas a nenhum tratamento, e um grupo de controlo positivo, em que se realizou a aplicação de clorexidina 2% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) durante 40 segundos (Tabela 1 e Figuras 8 e 9).

Tabela 1 - Protocolo experimental dos grupos de controle. Nota: Entre cada passo do protocolo, a solução é sempre agitada no vórtex, de modo a homogeneizar a mesma.

Grupos de controle	Protocolo experimental
Controlo negativo (CTRL_NEG) (Figura 8)	1º. Colocar 1 mL da suspensão bacteriana em 9 mL de água ultrapura estéril Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany); 2º. Realizar duas diluições seriadas com 100 µL em 9,9 mL de água peptonada tamponada estéril (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany); 3º. Inocular 100 µL por espalhamento no meio de cultura sólido; 4º. Colocar no sistema gerador de atmosfera adequada, em estufa (VWR, Radnor, USA) a 37°C durante 48 horas.
Controlo positivo (CTRL_POS) (Figura 9)	1º. Colocar 100 µL da suspensão bacteriana em 900 µL de clorexidina 2% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA); 2º. Após 40 segundos, colocar 100 µL de tween 80 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), com o objetivo de inativar a clorexidina; 3º. Inocular 100 µL por espalhamento no meio de cultura sólido; 4º. Colocar no sistema gerador de atmosfera adequada, em estufa (VWR, Radnor, USA) a 37°C durante 48 horas.

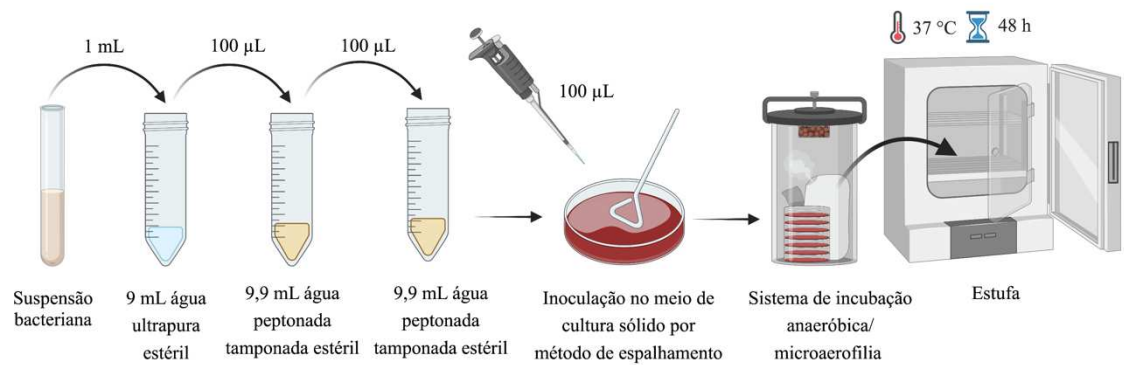


Figura 8 - Esquema representativo do protocolo experimental do grupo de controlo negativo. Criado com BioRender.com.

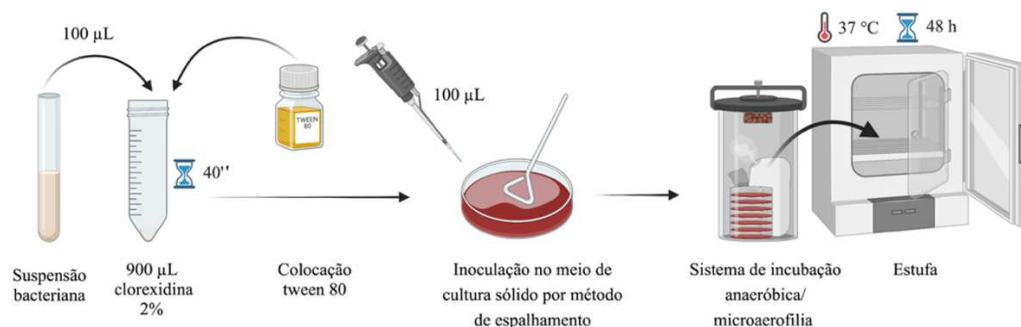


Figura 9 - Esquema representativo do protocolo experimental do grupo de controlo positivo. Criado com BioRender.com.

6. Aplicação de ozono

De modo a existir uma otimização do estudo, este foi dividido em duas fases, nas quais diferem o método e o tempo de aplicação de ozono.

6.1 1ª Fase do estudo

Relativamente à 1ª fase, para cada bactéria testada, foram realizados 8 ensaios independentes, e cada ensaio em triplicado. Em 2 ensaios independentes, para além dos 3 replicados de ensaio, o plaqueamento para contagem dos UFC/mL também foi feito em triplicado. Os grupos experimentais de estudo incluíram o ozono na forma de gás a 40 µg/mL e/ou água a 60 µg/mL durante 80 segundos. Deste modo, foi utilizado o gerador de ozono medicinal Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain), ilustrado na figura 10, conectado a uma garrafa de oxigénio medicinal (Nippon Gases, Maia, Portugal).



Figura 10 - Gerador de ozono medicinal Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain).

Para a aplicação de água ozonizada, foram testados dois sistemas diferentes de ozonização (Figura 11), nos quais a água foi preparada a uma concentração de 60 µg/mL, com um fluxo de 30 L/h durante 5 minutos. Os mesmos parâmetros foram utilizados na ozonização de água, comparando um sistema borbulhador de água de 500 mL (SimplyO₃,

Grand Ledge, USA) com uma coluna de ozonização de água de 1 L (Philozon, Nova Esperança, Brazil). Este último distingue-se do sistema anterior por permitir um maior volume de água e a formação de microbolhas de gás mais pequenas e em maior quantidade, promovendo uma maior dissolução do ozono na água e, consequentemente, uma maior concentração final (Xiong et al., 2018).



Figura 11 - Sistemas de ozonização de água utilizados: A - Sistema borbulhador de água (SimplyO₃, Grand Ledge, USA); B - Coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil).

Para tal, foi utilizada água ultrapura estéril Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) com um pH de 9,3, refrigerada até ao momento da ozonização a uma temperatura de 4°C. Após a sua ozonização, esta foi armazenada num frasco de vidro âmbar e utilizada no momento.

Por não existirem protocolos definidos para a aplicação de ozono em Dentisteria, a concentração de ozono e o tempo de aplicação foram selecionados de acordo com as diretrizes da *Madrid Declaration on Ozone Therapy* e da empresa Sedecal que comercializa o gerador e permite uma gama de concentrações de 1 a 80 µg/mL (ISCO3, 2020). Desta forma, foram realizados 4 grupos experimentais:

- 1º. **Grupo O₃_GAS80''**: Insuflação de ozono gasoso a uma concentração de 40 µg/mL durante 80 segundos (Tabela 2 e Figura 12).
- 2º. **Grupo O₃_H₂O80''Simply**: Aplicação de água ozonizada durante 80 segundos, previamente preparada a uma concentração de 60 µg/mL através de um sistema borbulhador de água (SimplyO₃, Grand Ledge, USA) (Tabela 3 e Figura 13).
- 3º. **Grupo O₃_H₂O80''Philozon**: Aplicação de água ozonizada durante 80 segundos, previamente preparada a uma concentração de 60 µg/mL através de uma coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil) (Tabela 3 e Figura 13).

- 4º. **Grupo O₃_H₂O+GAS80''Simply**: Aplicação de água ozonizada previamente preparada a uma concentração de 60 µg/mL através de um sistema borbulhador de água (SimplyO₃, Grand Ledge, USA), simultânea à aplicação de ozono gasoso a uma concentração de 40 µg/mL, durante 80 segundos (Tabela 4 e Figura 14).

Tabela 2 - Protocolo experimental da aplicação de ozono gasoso.

Grupo experimental	Protocolo experimental
O ₃ _GAS80'' (Figura 12)	1º. Colocar 1 mL da suspensão bacteriana em 9 mL de água ultrapura estéril Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany); 2º. Programar o gerador Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) no modo contínuo a uma concentração de 40 µg/mL, com um fluxo de 30 L/h; 3º. Com o auxílio de um extensor e de uma agulha de irrigação Sterican (B. Braun, Melsungen, Germany), insuflar o ozono dentro da água durante 80 segundos; 4º. Após 80 segundos, colocar 1 mL tiosulfato de sódio 10% (VWR, Radnor, USA), com o objetivo de inativar o ozono; 5º. Inocular 100 µL por espalhamento no meio de cultura sólido; 6º. Colocar no sistema gerador de atmosfera adequada, em estufa (VWR, Radnor, USA) a 37°C durante 48 horas.

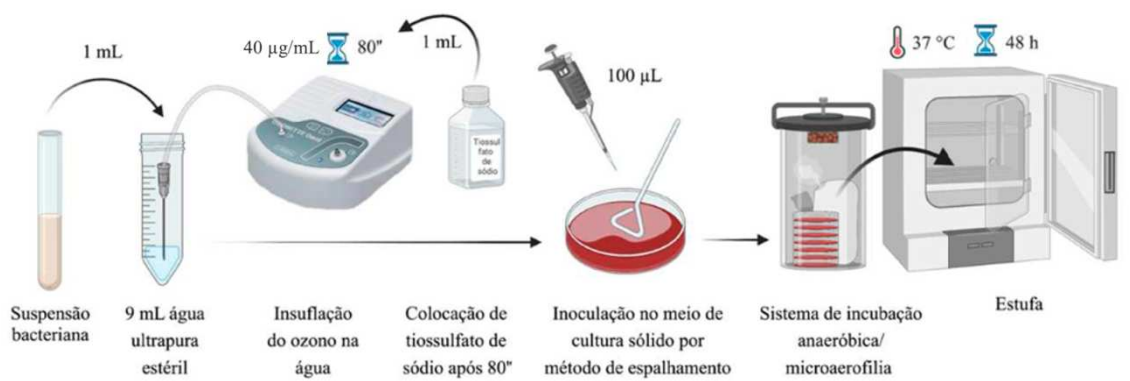


Figura 12 - Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de ozono gasoso (1ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.

Tabela 3 - Protocolo experimental da aplicação de água ozonizada.

Grupos experimentais	Protocolo experimental
O₃_H₂O80' 'Simply	1º. Colocar 500 mL de água ultrapura estéril Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) no sistema de ozonização SimplyO₃ (SimplyO₃, Grand Ledge, USA) ou 1 L no sistema de ozonização Philozon (Philozon, Nova Esperança, Brazil); 2º. Programar o gerador Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) no modo contínuo a uma concentração de 60 µg/mL, com um fluxo de 30 L/h durante 5 minutos, conectado ao sistema de ozonização de água;
O₃_H₂O80'' Philozon (Figura 13)	3º. Colocar 9 mL da água ozonizada em 1 mL da suspensão bacteriana; 4º. Após 80 segundos, colocar 1 mL tiosulfato de sódio 10% (VWR, Radnor, USA), com o objetivo de inativar o ozono; 5º. Inocular 100 µL por espalhamento no meio de cultura sólido; 6º. Colocar no sistema gerador de atmosfera adequada, em estufa (VWR, Radnor, USA) a 37°C durante 48 horas.

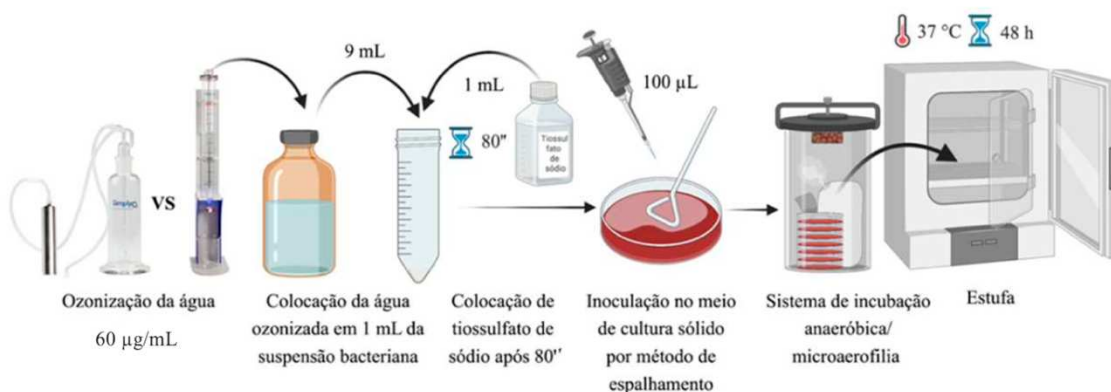


Figura 13 – Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de água ozonizada (1ª fase do estudo). Criado com Biorender.com.

Tabela 4 – Protocolo experimental da aplicação de água ozonizada simultânea à aplicação de ozono gasoso.

Grupo experimental	Protocolo experimental
O₃_H₂O+GAS80'' Simply (Figura 14)	1º. Colocar 500 mL de água ultrapura estéril Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) no sistema borbulhador de água (SimplyO₃, Grand Ledge, USA); 2º. Programar o gerador Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) no modo contínuo a uma concentração de 60 µg/mL, com um fluxo de 30 L/h durante 5 minutos, conectado ao sistema de ozonização de água; 3º. Colocar 9 mL da água ozonizada em 1 mL da suspensão bacteriana; 7º. Com o auxílio de um extensor e de uma agulha de irrigação Sterican (B. Braun, Melsungen, Germany), insuflar o ozono dentro da água ozonizada durante 80 segundos; 4º. Após 80 segundos, colocar 1 mL tiosulfato de sódio 10% (VWR, Radnor, USA), com o objetivo de inativar o ozono; 5º. Inocular 100 µL por espalhamento no meio de cultura sólido; 6º. Colocar no sistema gerador de atmosfera adequada, em estufa (VWR, Radnor, USA) a 37°C durante 48 horas.



Figura 14 - Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de água ozonizada simultânea à aplicação de ozono gasoso (1ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.

6.2 2ª Fase do estudo

Relativamente à 2ª fase, para cada bactéria testada, foram realizados 2 ensaios independentes, e cada ensaio em triplicado. Nestes 2 ensaios independentes, para além dos 3 replicados de ensaio, o plaqueamento para contagem dos UFC/mL também foi feito em triplicado. A metodologia dos grupos de controlo manteve-se, porém, a dos grupos experimentais foi modificada (Tabela 5). Todos estes grupos foram testados a 40 e 80 segundos, de forma a comparar a eficácia do ozono com um menor tempo de aplicação.

Tabela 5 - Diferenças na metodologia entre a 1ª e 2ª fase do estudo.

METODOLOGIA	
1ª Fase	2ª Fase
<u>Ozono gasoso</u> : Insuflado dentro da água ultrapura estéril (na qual foi colocada previamente a suspensão bacteriana), com o auxílio de um extensor e de uma agulha de irrigação Sterican (B. Braun, Melsungen, Germany).	<u>Ozono gasoso</u> : Insuflado diretamente no meio de cultura sólido (inoculado previamente com a suspensão bacteriana), com o auxílio de um extensor e de uma agulha de irrigação Sterican (B. Braun, Melsungen, Germany), através de um furo na tampa do meio de cultura.
<u>Água ozonizada</u> : Ozonização da água a 60 µg/mL através de um sistema borbulhador de água (SimplyO ₃ , Grand Ledge, USA) e de uma coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil); Volume utilizado: 1 mL suspensão bacteriana + 9 mL de água ozonizada.	<u>Água ozonizada</u> : Ozonização da água a 80 µg/mL apenas através de uma coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil); Aumento do volume utilizado, com a mesma proporção (10 mL suspensão bacteriana + 90 mL de água ozonizada).
<u>Água ozonizada + ozono gasoso</u> : Realização simultânea dos dois métodos anteriormente referidos.	<u>Água ozonizada + ozono gasoso</u> : Realização em diferentes momentos temporais dos dois métodos anteriormente referidos.

Desta forma, na 2ª fase do estudo foram realizados 6 grupos experimentais:

- 1º. **Grupo O₃_GAS40''**: Insuflação de ozono gasoso a uma concentração de 40 µg/mL durante 40 segundos (Figura 15).
- 2º. **Grupo O₃_GAS80''**: Insuflação de ozono gasoso a uma concentração de 40 µg/mL durante 80 segundos (Figura 15).
- 3º. **Grupo O₃_H₂O40''**: Aplicação de água ozonizada durante 40 segundos, previamente preparada a uma concentração de 80 µg/mL através de uma coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil) (Figura 16).
- 4º. **Grupo O₃_H₂O80''**: Aplicação de água ozonizada durante 80 segundos, previamente preparada a uma concentração de 80 µg/mL através de uma coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil) (Figura 16).
- 5º. **Grupo O₃_H₂O+GAS40''**: Aplicação de água ozonizada durante 40 segundos, previamente preparada a uma concentração de 80 µg/mL através de uma coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil), e posteriormente a aplicação de ozono gasoso a uma concentração de 40 µg/mL durante 40 segundos (Figura 17).
- 6º. **Grupo O₃_H₂O+GAS80''**: Aplicação de água ozonizada durante 80 segundos, previamente preparada a uma concentração de 80 µg/mL através de uma coluna de ozonização de água (Philozon, Nova Esperança, Brazil), e posteriormente a aplicação de ozono gasoso a uma concentração de 40 µg/mL durante 80 segundos (Figura 17).

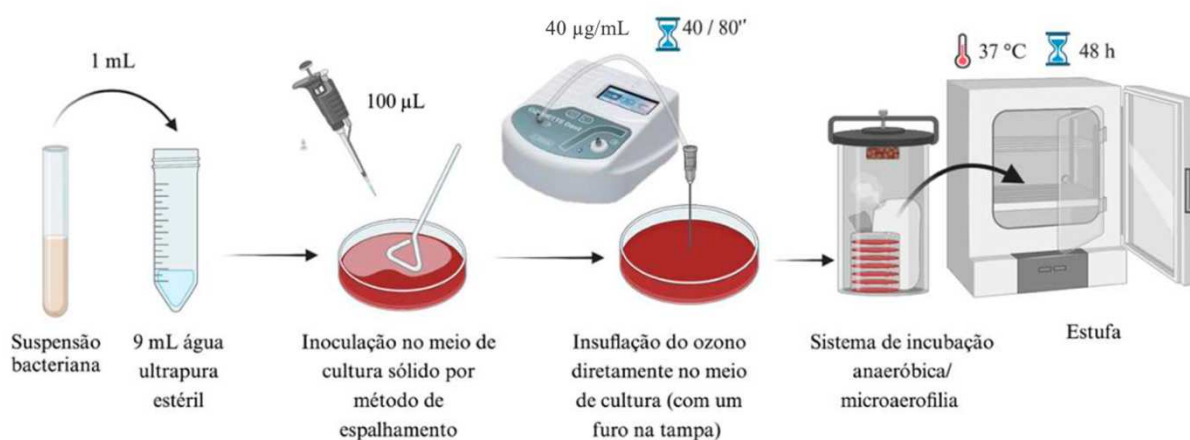


Figura 15 - Esquema representativo do protocolo experimental da aplicação de ozono gasoso (2ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.

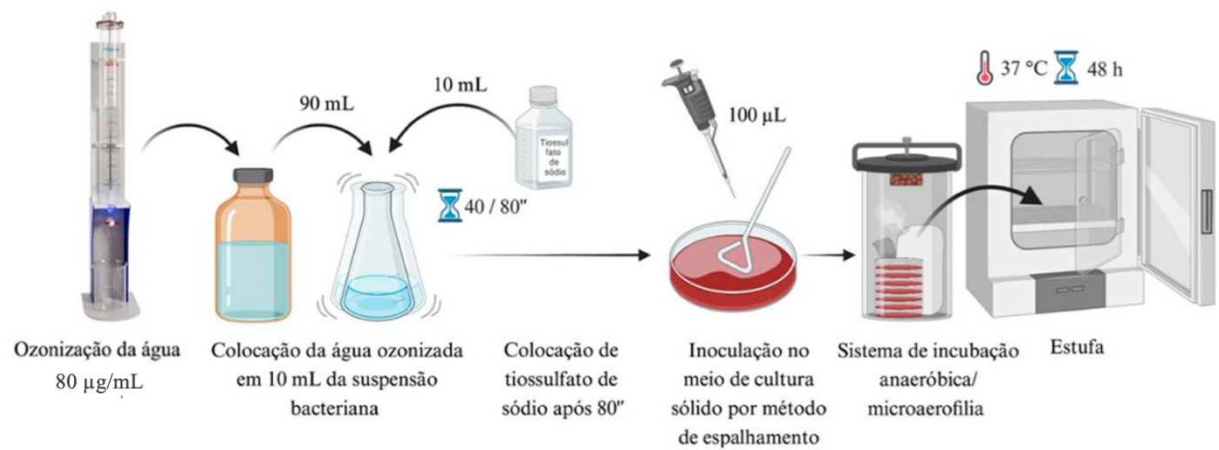


Figura 16 - Esquema representativo da aplicação de água ozonizada (2ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.

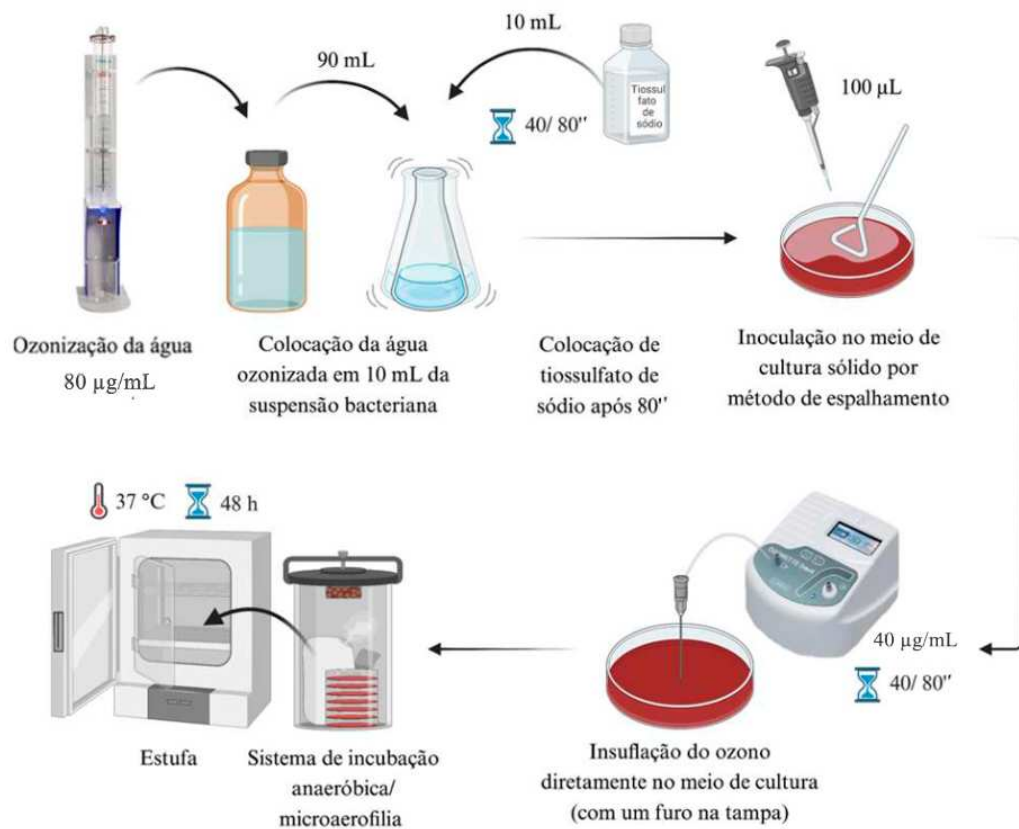


Figura 17 - Esquema representativo da aplicação de água ozonizada e de ozono gasoso em momentos temporais diferentes (2ª fase do estudo). Criado com BioRender.com.

7. Contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após as 48 horas de incubação, foram calculadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC), de acordo com a fórmula da Figura 18.

$$\text{UFC / mL} = \frac{\text{nº de colónias x fator de diluição}}{\text{volume inoculado}}$$

Figura 18 - Fórmula para cálculo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Criado com BioRender.com.

Em casos de ausência de crescimento bacteriano, o valor utilizado foi <10 UFC/mL. Em todas as contagens bacterianas foram realizadas médias do triplicado de amostra e de ensaio, de modo a realizar uma análise estatística.

8. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente com o auxílio do programa informático IBM SPSS *Statistics*, versão 29.0. Foram aplicadas metodologias de análise estatística descritiva e inferencial. Neste último caso foi estabelecido um nível de significância de 5%.

III.RESULTADOS

Atendendo à contagem do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC), verificou-se que a clorexidina 2% (CTRL_POS) eliminou a 100% todos os microrganismos, validando a metodologia do estudo. No entanto, os grupos experimentais da 1ª fase apresentam uma heterogeneidade de resultados entre triplicados de ensaio, tal como exemplificado na Tabela 6 e Figura 19.

Tabela 6 – Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em *S. mutans* (1ª fase).

	O ₃ _GAS80''	O ₃ _H ₂ O80'' Simply	O ₃ _H ₂ O80'' Philozon	O ₃ _H ₂ O+GAS80'' Simply
<u>Replicado 1</u>	< 10	90	210	< 10
<u>Replicado 2</u>	250	< 10	5520	< 10
<u>Replicado 3</u>	5150	9140	920	400



Figura 19 - Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em *S. mutans* no grupo O₃_GAS80'' (1ª fase).

O triplicado de plaqueamento para contagem dos UFC/mL demonstrou também a mesma heterogeneidade de resultados e consequentemente, numa 2ª fase, a metodologia

dos grupos experimentais foi modificada com o intuito de otimizar e diminuir a variabilidade nos grupos experimentais. No entanto, a oscilação de resultados manteve-se nos grupos em que se utiliza água ozonizada (Tabela 7 e Figura 20).

Tabela 7 – Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em *S. mutans* (2ª fase).

	O ₃ _GAS 40’’	O ₃ _GAS 80’’	O ₃ _H ₂ O 40’’	O ₃ _H ₂ O 80’’	O ₃ _H ₂ O+GAS 40’’	O ₃ _H ₂ O+GAS 80’’
<u>Replicado</u> <u>1</u>	3530	2820	10	< 10	< 10	< 10
<u>Replicado</u> <u>2</u>	2490	5380	10000	100	1440	30
<u>Replicado</u> <u>3</u>	3170	3100	< 10	3440	< 10	< 10



Figura 20 - Exemplo da heterogeneidade do número de UFC/mL entre triplicados de ensaio em *S. mutans* no grupo O₃_H₂O80’’ (2ª fase).

Com a nova metodologia de ozono gasoso na 2ª fase, verificou-se também que as bactérias sofreram ação mecânica e foram afastadas para os cantos do meio de cultura e incorporadas para dentro do gel de agar (Figura 21).



Figura 21 – Exemplo da ação mecânica verificada nos ensaios do grupo O_3_GAS80'' em *S.mutans* (2ª fase).

Apesar destas limitações, comparando o número de bactérias inicial (CTRL_NEG ou branco) com a contagem das UFC dos grupos experimentais, verifica-se sempre uma redução bacteriana para todas as bactérias em estudo. Na 1ª fase ocorreram reduções bacterianas entre 10^6 e 10^1 e na 2ª fase verificaram-se reduções entre 10^6 e 10^2 , sendo que a média aritmética dos triplicados de ensaio e de amostra da última experiência de cada fase encontra-se ilustrada nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Média aritmética das contagens bacterianas (UFC/mL) dos grupos controlo e experimentais da última experiência da 1ª fase do estudo.

	<u><i>S. mutans</i></u>	<u><i>S. sobrinus</i></u>	<u><i>L. casei</i></u>	<u><i>A. naeslundii</i></u>
CTRL_NEG	$2,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
CTRL_POS	< 10	< 10	< 10	< 10
O_3_GAS80''	< 10	$1,8 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
$O_3_H_2O80''$Simply	$3,1 \times 10^3$	3,3	$3,5 \times 10^4$	< 10
$O_3_H_2O80''$Philozon	$2,2 \times 10^3$	< 10	< 10	< 10
$O_3_H_2O+GAS80''$ Simply	$1,3 \times 10^2$	< 10	< 10	$3,3 \times 10^3$

Tabela 9 - Média aritmética das contagens bacterianas (UFC/mL) dos grupos controle e experimentais da última experiência da 2ª fase do estudo.

	<u><i>S. mutans</i></u>	<u><i>S. sobrinus</i></u>	<u><i>L. casei</i></u>	<u><i>A. naeslundii</i></u>
CTRL_NEG	2,6 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵	6,4 x 10 ⁴
CTRL_POS	< 10	< 10	< 10	< 10
O₃_GAS40"	3,1 x 10 ³	1,3 x 10 ³	1,4 x 10 ²	< 10
O₃_GAS80"	3,8 x 10 ³	3,4 x 10 ³	1,5 x 10 ²	< 10
O₃_H₂O40"	3,3 x 10 ³	2,6 x 10 ³	3,5 x 10	1,1
O₃_H₂O80"	3,9 x 10 ²	6,4 x 10 ²	< 10	< 10
O₃_H₂O+GAS40"	5,2 x 10 ²	2,7 x 10 ³	< 10	< 10
O₃_H₂O+GAS80"	3,3	3,2 x 10 ³	< 10	< 10

Devido à grande variabilidade de resultados, a análise estatística inferencial não se apresenta como o método de análise mais correto. Esta apenas foi realizada com o intuito de nos dar uma ideia geral sobre as diferenças entre o CTRL_NEG e os grupos experimentais e se existiriam diferenças estatísticas entre métodos de aplicação de ozono.

Por exemplo, na 1ª fase do estudo, para a globalidade das bactérias analisadas, de um modo geral ocorreu uma redução bacteriana significativa ($p < 0,05$). Ao realizar as comparações múltiplas, verificou-se que não existem diferenças significativas entre a ação antibacteriana do ozono em diferentes métodos de aplicação ($p > 0,05$) e não existem diferenças significativas entre a ação antibacteriana do ozono e da clorexidina ($p > 0,05$).

Independentemente, a análise estatística não foi tida em conta, mas sim a análise descritiva, na qual se verificam reduções bacterianas em todos os triplicados de ensaio e de amostra de ambas as fases do estudo.

IV. DISCUSSÃO

A cárie dentária é uma das doenças crônicas mais prevalentes no mundo e, por esse motivo, existe uma grande preocupação em controlar os seus fatores etiológicos. Esta é uma doença multifatorial e dinâmica, mediada por um biofilme bastante diversificado, na qual as estirpes bacterianas mais comuns são *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* (Chen et al., 2015; Cherukuri et al., 2020; Kianoush et al., 2014; Pitts et al., 2017).

O processo dinâmico das lesões de cárie consiste em períodos alternados de desmineralização e remineralização dentária, sendo de extrema importância ocorrer um equilíbrio entre os fatores patológicos e protetores, de modo a existir uma estabilização da doença ou até mesmo uma reversão da lesão em casos iniciais. Nesse sentido, uma correta higiene oral, uma taxa de função salivar normal, uma redução da ingestão de hidratos carbonos fermentáveis, a toma de pré-bióticos e probióticos e a aplicação de selantes e agentes remineralizadores e antibacterianos irão provocar uma estabilização da lesão de cárie e promover a remineralização (Arthur et al., 2014; Krupa et al., 2022; Pitts et al., 2017, 2021).

Deste modo, existe um aumento da procura de agentes antibacterianos biocompatíveis e com menos efeitos adversos, com o intuito de reduzir os níveis de microrganismos na placa dentária e/ou no remanescente dentário após a remoção do tecido cariado (Almaz & Sönmez, 2015; Libonati et al., 2019; Mese et al., 2020; Nayak et al., 2014; Santos et al., 2020). Visto que a remoção total da lesão de cárie aumenta o risco de exposição pulpar e não garante a eliminação de todas bactérias cariogênicas, cada vez mais se realizam protocolos minimamente invasivos com uma remoção seletiva da lesão de cárie, nos quais um tratamento complementar antibacteriano seria bastante importante para o sucesso de uma restauração, evitando cáries secundárias, sensibilidade pós-operatória e inflamação pulpar (Cangul et al., 2020; Sancakli et al., 2018).

Com estas intenções, as propriedades antibacterianas do ozono têm sido estudadas e comparadas à ação da clorexidina, porém os resultados nem sempre são consistentes (Barczyk et al., 2023) e a qualidade de evidência é considerada baixa (Santos et al., 2020). De um modo global, existe uma ausência de informações relevantes sobre a metodologia e uma heterogeneidade entre protocolos aplicados (concentração de ozono, tempo e tipo

de oxigénio e gerador) (Gallo & Scribante, 2021; Santos et al., 2020; Tricarico et al., 2020). Para além disso, a maior parte dos estudos *in vitro* testam a ação antibacteriana do ozono em biofilme e/ou dentes humanos, existindo sempre uma forte componente mecânica associada à aplicação de ozono gasoso/água ozonizada (Boch et al., 2016; Sancakli et al., 2018; Tuncay et al., 2015).

Assim, este estudo teve como principal objetivo testar *in vitro* a capacidade antibacteriana do ozono em bactérias cariogénicas, de forma a aferir a sua ação preventiva ou como um tratamento coadjuvante não invasivo da cárie dentária. Para tal, a sua ação foi maioritariamente testada em suspensão/meio líquido, existindo um cuidado acrescido em eliminar a ação mecânica do estudo e testar apenas a sua ação química.

Foram testadas várias estirpes de bactérias cariogénicas, nomeadamente, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces naeslundii*, por serem as mais utilizadas neste tipo de estudos e por serem consideradas as mais comuns em lesões de cárie (Chen et al., 2015; Cherukuri et al., 2020; Kianoush et al., 2014; Pitts et al., 2017). As estirpes *S. mutans*, *S. sobrinus* e *A. naeslundii* são colonizadores primários com uma grande capacidade de adesão às superfícies e fissuras e também estão envolvidas na etiologia da cárie radicular, enquanto que *L. casei* não tem uma grande capacidade de adesão e está mais envolvida em cáries de dentina mais extensas (Chokshi et al., 2016; Matsumoto-Nakano, 2018).

A clorexidina é considerada o *gold standard* dos agentes antibacterianos e, por este motivo, foi selecionada como controlo positivo para este estudo. Utilizou-se clorexidina 2% por ser a concentração mais testada como desinfetante cavitário e a mais utilizada na literatura na comparação da ação antibacteriana com a do ozono (Gou et al., 2021; Huth et al., 2009; Kapdan et al., 2013; Sancakli et al., 2018).

Foi utilizado o gerador de ozono Ozonette Dent (Sedecal, Madrid, Spain) conectado a uma garrafa de oxigénio medicinal (Nippon Gases, Maia, Portugal), pois ao contrário do ozono produzido através do ar ambiente, este não apresenta elementos reativos de nitrogénio que são contraindicados na prática clínica devido à sua citotoxicidade (ISCO3, 2020). Por o ozono ser um gás altamente instável, a água ozonizada foi utilizada no momento e não foi reutilizada, tendo sido usada água ultrapura estéril Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany), refrigerada a 4°C, com o objetivo de aumentar a solubilidade do ozono na água e diminuir a sua reatividade.

Por não existirem protocolos definidos para a aplicação de ozono em Dentisteria, a concentração de ozono e o tempo de aplicação foram selecionados de acordo com as diretrizes da *Madrid Declaration on Ozone Therapy* e da empresa Sedecal que comercializa o gerador e permite uma gama de concentrações de 1 a 80 µg/mL (ISCO3, 2020). Para além disso, foram tidas em conta as concentrações mais utilizadas na prática clínica, que são 40 µg/mL no ozono gasoso e 60 µg/mL na água ozonizada, sendo que é necessário ter em conta que a concentração final de ozono dissolvido é cerca de 1/4 a 1/5 da concentração aplicada no gerador, resultando numa concentração final de 12-15 µg/mL de água ozonizada (ISCO3, 2020). Ambos foram testados a 40 e 80 segundos, com o intuito de analisar se clinicamente se justifica um menor/maior tempo de aplicação.

Relativamente à 1ª fase do estudo, a aplicação de ozono gasoso foi realizada diretamente na suspensão bacteriana em meio líquido através de uma agulha de irrigação (B. Braun, Melsungen, Germany), de modo a não existir ação mecânica. A água ozonizada também foi aplicada diretamente na suspensão bacteriana em meio líquido, porém foram testados dois métodos de ozonização de água diferentes. Foi comparado um sistema borbulhador de água de 500 mL (SimplyO₃, Grand Ledge, USA) com uma coluna de ozonização de água de 1 L (Philozon, Nova Esperança, Brazil), que se distingue do sistema anterior por permitir um maior volume de água e a formação de microbolhas de gás, promovendo uma maior dissolução do ozono na água e, consequentemente, uma maior concentração final (Xiong et al., 2018). Foi também testada a aplicação simultânea de ozono gasoso e água ozonizada com os métodos anteriormente referidos, de modo a investigar a sua ação sinérgica.

Face à contagem do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC), verificou-se uma heterogeneidade de resultados entre triplicados de ensaio, com reduções bacterianas entre 10⁶ e 10¹. Estas diferenças verificaram-se em todas as bactérias e grupos, exceto no controlo positivo (clorexidina 2%), o que valida a metodologia aplicada. Foram também realizados triplicados de amostra com o objetivo de verificar se as diferenças se mantinham e observou-se que dentro da mesma amostra, que foi homogeneizada no vórtex, obtínhamos contagens diferentes.

Uma das hipóteses explicativas para estas oscilações é uma baixa solubilidade do ozono gasoso na água, havendo uma rápida auto-decomposição e diminuição da sua ação. Tal como referem Egorova e colaboradores (2015), a dissolução do ozono em meio líquido é significativamente afetada pelo pH, diminuindo a sua dissolução em pH alcalino

> 8, como é o caso do nosso estudo, em que a solução apresentava um pH de 9,3. Outra hipótese é que o ozono forma aglomerados e não se dispersa adequadamente na água, razão pela qual nem todas as bactérias são afetadas (Seridou & Kalogerakis, 2021). A terceira hipótese explicativa é a formação de aglomerados bacterianos devido ao stress oxidativo provocado pelo ozono. Ao existirem aglomerados microbianos compactos, o ozono não teria ação no seu interior, ocorrendo uma diminuição da sua ação e variações entre contagens do número de UFC em locais diferentes do mesmo meio líquido e entre ensaios. Esta hipótese é corroborada com a ocorrência do fenômeno de auto-agregação bacteriana causado por stress, que continua pouco compreendido, tal como descrito em Trunk e colaboradores (2018).

Ao verificar a existência de uma heterogeneidade entre resultados na 1ª fase, foi realizada uma nova metodologia numa 2ª fase do estudo. O ozono gasoso foi insuflado diretamente no meio de cultura sólido (inoculado previamente com a suspensão bacteriana), com o auxílio de uma agulha de irrigação Sterican (B. Braun, Melsungen, Germany), através de um furo na tampa do meio de cultura, com o objetivo de alcançar uma aproximação às condições clínicas nas quais se aplica ozono gasoso dentro de uma campânula adaptada a uma seringa. Em relação à água ozonizada, esta foi apenas realizada através da coluna de ozonização de água de 1 L (Philozon, Nova Esperança, Brazil), na qual ocorreu um aumento da concentração para 80 µg/mL e um aumento do volume de ozonização, de modo a promover uma maior concentração final e uma maior dissolução do ozono na água. Deste modo, o grupo experimental no qual se aplica ambos os métodos anteriormente referidos de ozono gasoso e água ozonizada foi realizado em diferentes momentos temporais.

Tendo em conta os resultados obtidos na 2ª fase, as diferenças entre ensaios mantiveram-se nos grupos com água ozonizada, reforçando as hipóteses explicativas anteriormente referidas. Para além disso, é de ressaltar que a metodologia nova dos grupos de ozono gasoso tem uma grande limitação na contagem do número de UFC, pois as bactérias sofreram ação mecânica e foram afastadas para os cantos do meio de cultura e incorporadas para dentro do gel de agar, sendo protegidas da ação do ozono e, por esse motivo, sofreram uma ação antibacteriana reduzida.

Ainda assim, comparando o nº de bactérias inicial (CTRL_NEG) com a contagem das UFC dos grupos experimentais, verificou-se sempre uma redução bacteriana para

todas as bactérias em estudo de ambas as fases, ou seja, os resultados totais obtidos indicam que há uma redução inequívoca do número de microrganismos e, conseqüentemente, o ozono nas diversas formas aplicadas apresenta atividade antimicrobiana.

A literatura disponível sobre a ação antibacteriana do ozono em bactérias cariogénicas é bastante reduzida e insuficiente para permitir uma comparação adequada dos resultados, uma vez que na maior parte dos estudos *in vitro* o ozono é aplicado em biofilmes e/ou dentes humanos, existindo uma grande ação mecânica.

Johansson e colaboradores (2009) apresenta-se como a investigação mais semelhante ao presente estudo. Nesta, foram realizados 9 ensaios nos quais o ozono gasoso foi aplicado diretamente em suspensões bacterianas de *S.mutans*, *L.casei* e *A.naeslundii*, com um pH de 7,2, através de um extensor conectado ao gerador. Não foi utilizado um gerador de ozono medicinal, mas sim o gerador HealOzone (KaVo, Biberach, Germany), que forma ozono através do ar ambiente, a uma concentração de 2100 ppm durante 10, 30 e 60 segundos. De acordo com os resultados da análise estatística, 92, 73 e 64% dos números iniciais de *A.naeslundii*, *S.mutans* e *L.casei*, respetivamente, foram reduzidos após exposição a 10 segundos de ozono gasoso. Após 60 segundos de exposição, ocorreu uma redução bacteriana de 99,9% em todas as estirpes testadas. Embora seja a investigação com uma metodologia mais semelhante, foi utilizado um gerador de ozono diferente, tendo sido utilizada uma concentração e unidade de medida diferentes. No entanto, demonstra uma grande capacidade antibacteriana do ozono, que se pode encontrar otimizada pela utilização de um pH mais baixo relativamente ao presente estudo.

Dukić e colaboradores (2013), Kapdan e colaboradores (2013) e Polydorou e colaboradores (2006) testam a ação antibacteriana do ozono gasoso em bactérias cariogénicas, tais como *S.mutans* e *L.casei*, nos quais todos verificam uma redução bacteriana significativa. Porém, estes estudos são realizados em biofilmes e/ou dentes humanos, existindo uma forma componente mecânica associada. O ozono gasoso foi aplicado através de um gerador de ozono HealOzone (KaVo, Biberach, Germany), que forma ozono através do ar do meio ambiente, a uma concentração 2100 ppm, sendo uma concentração e unidade de medida diferentes do presente estudo. No entanto, utilizam o mesmo tempo de aplicação, sendo que Dukić e colaboradores (2013) verificaram uma

redução antibacteriana significativa aos 40 segundos de aplicação e Kapdan e colaboradores (2013) e Polydorou e colaboradores (2006) verificaram uma redução significativa após 80 segundos.

Pelo contrário, Müller e colaboradores (2007) prepararam biofilmes bacterianos de *A.naeshlundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *S.sobrinus*, *S. oralis* e *Candida albicans* em dentes bovinos durante cerca de 64,5 horas. Estes biofilmes foram submetidos a ozono gasoso durante 60 segundos através do gerador de ozono HealOzone (KaVo, Biberach, Germany) e não foi verificada uma redução antibacteriana eficaz, o que sugere uma boa resistência ao ozono por biofilmes corretamente estabelecidos. Tal como Müller e colaboradores (2007), Sancakli e colaboradores (2018) verificam que a aplicação de ozono gasoso não é suficiente para atingir um efeito antibacteriano eficaz em *S.mutans*, testando a aplicação de ozono gasoso com o gerador HealOzone durante 80 segundos. Porém, ambos os artigos não revelam a concentração de ozono utilizada, aspeto este que pode representar um peso importante nos resultados obtidos.

Polydorou e colaboradores (2012) realizaram a aplicação de ozono gasoso através do gerador HealOzone (KaVo, Biberach, Germany) a 2100 ppm durante 60 segundos em dentes humanos incubados com *S.mutans* e *L.casei*. No entanto, pela necessidade de existirem estudos a longo prazo, os resultados foram verificados após 4 e 8 semanas, sendo que em ambas as semanas se verificou uma redução bacteriana significativa de *S.mutans*, mas não de *L.casei*.

Assim sendo, apesar do número reduzido de artigos recentes, foram analisados os que apresentavam uma maior semelhança com as condições deste estudo. No entanto, não nos permite realizar uma comparação adequada por a maior parte dos estudos terem metodologias completamente diferentes, com ação mecânica em biofilme e/ou dentes e com a utilização do gerador HealOzone (KaVo, Biberach, Germany) que forma ozono através do ar ambiente, apresentando mais componentes para além do oxigénio. Para além disso, a unidade da concentração é expressa em ppm em vez de µg/mL, tornando difícil uma uniformização de protocolos.

Independentemente, o estudo atual demonstra que a aplicação de ozono durante 40 ou 80 segundos apresenta uma capacidade antibacteriana contra *S.mutans*, *S.sobrinus*, *L.casei* e *A.naeshlundii*, tanto na forma de ozono gasoso ou de água ozonizada. Porém,

devido às limitações do estudo não existem resultados claros quando se compara a sua eficácia entre bactérias e diferentes métodos de aplicação.

IV. CONCLUSÃO

A partir desta investigação é possível concluir-se que o ozono apresenta um efeito antibacteriano contra determinadas estirpes bacterianas, nomeadamente *S.mutans*, *S.sobrinus*, *L.casei* e *A.naeslundii*.

Foram utilizadas diversas metodologias e equipamentos de topo, que permitem a formação de microbolhas de gás através de ozono medicinal, com o intuito de otimizar a dissolução do ozono em meio líquido e promover uma maior eficácia antibacteriana. Em contrapartida, devido à heterogeneidade de resultados entre amostras e ensaios e devido às limitações do estudo, não foi possível comparar corretamente a eficácia antibacteriana entre bactérias e entre diferentes métodos e tempos de aplicação. Estas discrepâncias podem ser justificadas pela utilização de um pH da água bastante alcalino, existindo uma baixa solubilidade do ozono gasoso na água, sendo crucial em investigações futuras utilizar um pH mais ácido e monitorizar a concentração e dissolução do ozono na água.

Deste modo, esta investigação atua como um estudo exploratório, evidenciando que são necessárias investigações futuras nas quais se utiliza um pH correto e se otimizaria o presente estudo, com o intuito de testar a ação antibacteriana do ozono noutras estirpes bacterianas e estudar a concentração, o tempo e a forma de aplicação mais eficazes e reprodutíveis para a maioria das bactérias cariogénicas.

1. Relevância clínica

Existe uma grande preocupação em minimizar a necessidade de tratamentos restauradores, assim como em realizar tratamentos mais conservadores e biocompatíveis, focados na preservação do remanescente dentário. Nesse sentido, existe uma necessidade acrescida em controlar os fatores etiológicos envolvidos na progressão das lesões de cárie.

A cárie é uma doença multifatorial, mediada por um biofilme patogénico, que se pode disseminar em locais extra-orais, causando uma inflamação sistémica. Por esse motivo, torna-se de elevada importância estudar a eficácia de agentes antibacterianos mais eficazes e que apresentem poucos efeitos adversos para o organismo.

Embora seja necessário existirem mais estudos de investigação, o ozono revela resultados promissores como uma potencial terapia preventiva para a cárie dentária ou como um agente antibacteriano após a remoção mecânica da cárie. Adicionalmente, a ozonoterapia é uma terapia indolor e não-invasiva, sendo uma área de atuação bastante interessante noutros ramos da Medicina Dentária, como a Odontopediatria.

V. PERSPETIVAS FUTURAS

Devido à carência de artigos relativamente à ação antibacteriana do ozono em bactérias cariogénicas, seria fulcral, no futuro, realizarem um maior número de estudos utilizando protocolos bem definidos e reprodutíveis com o intuito de:

- Testar a sua ação química em bactérias em suspensão, mas também em biofilme, com um maior número de amostras e ensaios;
- Testar a sua ação antibacteriana com uma monitorização de longa duração;
- Testar a ação antibacteriana do ozono noutras estirpes bacterianas;
- Utilizar um kit que permita medir a concentração final de ozono na água ozonizada, de modo a haver uma melhor compreensão da dissolução do ozono em meio líquido;
- Utilizar uma água com um pH entre 2 e 6 (Egorova et al., 2015);
- Testar a ação antibacteriana do ozono na forma de óleo ozonizado;
- Testar outras propriedades do ozono no âmbito da Dentisteria e da Medicina Dentária Preventiva, como por exemplo a remineralização dentária;

VI. BIBLIOGRAFIA

Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T., Richards, V. P., Brady, L. J., & Lemos, J. A. (2018). Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum*, 6(5), 1-18. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>

Adkins, E. A., & Brunst, K. J. (2021). Impacts of Fluoride Neurotoxicity and Mitochondrial Dysfunction on Cognition and Mental Health: A Literature Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(24), 12884. <https://doi.org/10.3390/ijerph182412884>

Almaz, M. E., & Sönmez, I. Ş. (2015). Ozone therapy in the management and prevention of caries. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.06.020>

Arthur, R. A., Kohara, E. K., Waeiss, R. A., Eckert, G. J., Zero, D., & Ando, M. (2014). Enamel Carious Lesion Development in Response to Sucrose and Fluoride Concentrations and to Time of Biofilm Formation: An Artificial-Mouth Study. *Journal of Oral Diseases*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/348032>

Bacali, C., Vulturar, R., Buduru, S., Cozma, A., Fodor, A., Chiş, A., Lucaciu, O., Damian, L., & Moldovan, M. L. (2022). Oral Microbiome: Getting to Know and Befriend Neighbors, a Biological Approach. *Biomedicines*, 10(3), 671. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030671>

Barczyk, I., Masłyk, D., Walczuk, N., Kijak, K., Skomro, P., Gronwald, H., Pawlak, M., Rusińska, A., Sadowska, N., Gronwald, B., Garstka, A. A., & Lietz-Kijak, D. (2023). Potential Clinical Applications of Ozone Therapy in Dental Specialties—A Literature Review, Supported by Own Observations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 2048. <https://doi.org/10.3390/ijerph20032048>

Boch, T., Tennert, C., Vach, K., Al-Ahmad, A., Hellwig, E., & Polydorou, O. (2016). Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm—an in vitro study. *Clinical Oral Investigations*, 20(7), 1733–1739. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1667-1>

Cangul, S., Erpacal, B., Adiguzel, O., Sagmak, S., Unal, S., & Tekin, S. (2020). Does the Use of Ozone as a Cavity Disinfectant Affect the Bonding Strength of Antibacterial Bonding Agents? *Ozone: Science & Engineering*, 42(6), 565–570. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1746633>

Casu, C., Orrù, G., Fais, S., Mazur, M., Grassi, R., Grassi, R. F., & Nardi, G. M. (2023). Efficacy of ozonated water as a PS in photodynamic therapy: A tool for dental caries management? An in vitro study. *Journal of Public Health Research*, 12(2), 1-8. <https://doi.org/10.1177/22799036231182267>

Chen, L., Qin, B., Du, M., Zhong, H., Xu, Q., Li, Y., Zhang, P., & Fan, M. (2015). Extensive Description and Comparison of Human Supra-Gingival Microbiome in Root Caries and Health. *PLoS ONE*, 10(2), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117064>.

Chen, X., Daliri, E. B.-M., Kim, N., Kim, J.-R., Yoo, D., & Oh, D.-H. (2020). Microbial Etiology and Prevention of Dental Caries: Exploiting Natural Products to Inhibit Cariogenic Biofilms. *Pathogens*, 9(7), 569. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070569>

Cherukuri, G., Veeramachaneni, C., Rao, G., Pacha, V., & Balla, S. (2020). Insight into status of dental caries vaccination: A review. *Journal of Conservative Dentistry*, 23(6), 544-549. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_402_20

Chokshi, A., Mahesh, P., Sharada, P., Chokshi, K., Anupriya, S., & Ashwini, B. (2016). A correlative study of the levels of salivary Streptococcus mutans, lactobacilli and Actinomyces with dental caries experience in subjects with mixed and permanent dentition. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(1), 25-28. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.180916>

Costalonga, M., & Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, 162(2), 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>

de Sire, A., Agostini, F., Lippi, L., Mangone, M., Marchese, S., Cisari, C., Bernetti, A., & Invernizzi, M. (2021). Oxygen–Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders. *Biomolecules*, 11(3), 356. <https://doi.org/10.3390/biom11030356>

Deo, P., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(1), 122-128. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18

Deus, P. F., & Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *International Dental Journal*, 72(3), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>

Dukić, W., Jurić, H., Andrasević, A. T., Kovacević, V., Dukić, O. L., & Delija, B. (2013). The efficacy of gaseous ozone on some cariogenic bacteria. *Collegium Antropologicum*, 37(1), 109–113. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23697258/>

Egorova, G. V., Voblikova, V. A., Sabitova, L. V., Tkachenko, I. S., Tkachenko, S. N., & Lunin, V. V. (2015). Ozone Solubility in Water. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 70(5), 207–210. <https://doi.org/10.3103/S0027131415050053>

Food and Drug Administration. (2016). *Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use*, 81, 61127. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2016-09-06/pdf/2016-21337.pdf>

Forbes, S., Latimer, J., Sreenivasan, P. K., & McBain, A. J. (2016). Simultaneous Assessment of Acidogenesis-Mitigation and Specific Bacterial Growth-Inhibition by Dentifrices. *PLoS ONE*, 11(2), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149390>

Gallo, S., & Scribante, A. (2021). Ozone therapy in dentistry: From traditional applications towards innovative ones. A review of the literature. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 707(1), 1-7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/707/1/012001>

Gou, Y., Jin, W., He, Y., Luo, Y., Si, R., He, Y., Wang, Z., Li, J., & Liu, B. (2021). Effect of Cavity Cleanser With Long-Term Antibacterial and Anti-Proteolytic Activities on Resin–Dentin Bond Stability. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11 (784153), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.784153>

Grandjean, P. (2019). Developmental fluoride neurotoxicity: An updated review. *Environmental Health*, 18(110), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0551-x>

Gulafsha, M., & Anuroopa, P. (2019). Miracle of ozone in dentistry: an overview. *World Journal of Pharmaceutical Research* 8(3), 665–677. <https://doi.org/10.20959/wjpr20193-14388>

Gupta, S., & Deepa, D. (2016). Applications of ozone therapy in dentistry. *Journal of Oral Research and Review*, 8(2), 86-91. <https://doi.org/10.4103/2249-4987.192243>

Hajiahmadi, M., Faghri, J., Salehi, Z., & Heidari, F. (2021). Comparative Evaluation of Antibacterial Effect of Propolis and Aloe Vera, Xylitol, and Cpp-Acp Gels on Streptococcus mutans and Lactobacillus in Vitro. *International Journal of Dentistry*, 2021 (5842600), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/5842600>

Han, Y. (2021). Effects of brief sodium fluoride treatments on the growth of early and mature cariogenic biofilms. *Scientific Reports*, 11(18290), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97905-0>

Huang, C.-H., Li, S.-W., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Identification and Classification for the Lactobacillus casei Group. *Frontiers in Microbiology*, 9 (1974), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974>

Huth, K. C., Quirling, M., Maier, S., Kamereck, K., AlKhayer, M., Paschos, E., Welsch, U., Miethke, T., Brand, K., & Hickel, R. (2009). Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *International Endodontic Journal*, 42(1), 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01460.x>

Infarmed. (2014, Agosto 13). *Utilização de produtos com a substância triclosan*. [Comunicado de imprensa]. <https://www.infarmed.pt/documents/15786/1122802/10158320.PDF/a7f94ab3-270b-4a4a-a7d9-a227527d3f74?version=1>.

ISCO3. (2020). *Madrid Declaration on Ozone Therapy* (3rd ed.). International Scientific Committee of Ozone Therapy. www.isco3.org

Jiang, W., Ling, Z., Lin, X., Chen, Y., Zhang, J., Yu, J., Xiang, C., & Chen, H. (2014). Pyrosequencing Analysis of Oral Microbiota Shifting in Various Caries States in Childhood. *Microbial Ecology*, 67(4), 962–969. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0372-y>

Johansson, E., Claesson, R., & Van Dijken, J. W. V. (2009). Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *Journal of Dentistry*, 37(6), 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.004>

Johnston, N. R., & Strobel, S. A. (2020). Principles of fluoride toxicity and the cellular response: A review. *Archives of Toxicology*, 94(4), 1051–1069. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02687-5>

Kapdan, A., Oztas, N., & Sumer, Z. (2013). Comparing the antibacterial activity of gaseous ozone and chlorhexidine solution on a tooth cavity model. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5(3), e133-e137. <https://doi.org/10.4317/jced.51130>

Kianoush, N., Adler, C. J., Nguyen, K.-A. T., Browne, G. V., Simonian, M., & Hunter, N. (2014). Bacterial Profile of Dentine Caries and the Impact of pH on Bacterial Population Diversity. *PLoS ONE*, 9(3), e92940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092940>

Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*, 23(3), 276–286. <https://doi.org/10.1111/odi.12509>

Krupa, N. C., Thippeswamy, H. M., & Chandrashekar, B. R. (2022). Antimicrobial efficacy of Xylitol, Probiotic and Chlorhexidine mouth rinses among children and elderly population at high risk for dental caries – A Randomized Controlled Trial. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 63(2), E282-E287. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/JPMH2022.63.2.1772>

Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: Dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 16(12), 745–759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>

Liaqat, S., Tariq, S., Hayat, I., Mobeen, B., Fayyaz, S., Jabeen, H., Khalid, S., Muhammad, N., & Khan, M. A. (2022). Therapeutic Effects and Uses of Ozone in Dentistry: A Systematic Review. *Ozone: Science & Engineering*, 45(4), 387–397. <https://doi.org/10.1080/01919512.2022.2125363>

Libonati, A., Di Taranto, V., Mea, A., Montemurro, E., Gallusi, G., Angotti, V., N

ardi, R., Paglia, L., Marzo, G., & Campanella, V. (2019). Clinical antibacterial effectiveness of Healozone Technology after incomplete caries removal. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 20 (1), 73–78. <https://doi.org/10.23804/ejpd.2019.20.01.14>

Ma, H., Wu, X., Yang, M., Wang, J., Wang, J., & Wang, J. (2014). Effects of fluoride on bacterial growth and its gene/protein expression. *Chemosphere*, 100, 190–193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.032>

Matsumoto-Nakano, M. (2018). Role of Streptococcus mutans surface proteins for biofilm formation. *Japanese Dental Science Review*, 54(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2017.08.002>

Mese, M., Tok, Y. T., Kaya, S., & Akcay, M. (2020). Influence of ozone application in the stepwise excavation of primary molars: A randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 24(10), 3529–3538. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03223-6>

Müller, P., Guggenheim, B., & Schmidlin, P. R. (2007). Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, 115(1), 77–80. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2007.00418.x>

Murashko, O. N., Yeh, K.-H., Yu, C.-H. A., Kaberdin, V. R., & Lin-Chao, S. (2023). Sodium Fluoride Exposure Leads to ATP Depletion and Altered RNA Decay in Escherichia coli under Anaerobic Conditions. *Microbiology Spectrum*, 11(2), 1-26. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04158-22>

Murray, T. S., & Cassese, T. (2016). Bacteriology of the Head and Neck Regions. In *Head, Neck, and Orofacial Infections* (pp. 27–37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28945-0.00002-8>

Naik, S. V., K, R., Kohli, S., Zohabhasan, S., & Bhatia, S. (2016). Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth???? *The Open Dentistry Journal*, 10(1), 196–206. <https://doi.org/10.2174/1874210601610010196>

Nasseripour, M., Newton, J. T., Warburton, F., Awojobi, O., Di Giorgio, S., Gallagher, J. E., & Banerjee, A. (2021). A systematic review and meta-analysis of the role of sugar-free chewing gum on Streptococcus mutans. *BMC Oral Health*, 21(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01517-z>

Nayak, P. A., Nayak, U. A., & Khandelwal, V. (2014). The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 6, 89-94 <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S55761>

OMD. (2021, Dezembro 10). *Regulamento das Competências Setoriais*. Diário da república, 2ª série, nº 1007/2021. <https://www.ond.pt/content/uploads/2022/08/20211007-regulamento-competencias-setoriais.pdf>

Oporto, G. H., Rodríguez Niklitschek, C., & Chuhuaicura, P. (2021). Antibacterial Effect of Commercial Mouthwashes on Streptococcus mutans: An in vitro study. *International Journal of Odontostomatology*, 15(4), 908–914. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2021000400908>

Philip, N., Suneja, B., & Walsh, L. (2018). Beyond Streptococcus mutans: Clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *British Dental Journal*, 224(4), 219-225. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.81>

Philip, N., Suneja, B., & Walsh, L. J. (2018). Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth? *Caries Research*, 52(1–2), 153–165. <https://doi.org/10.1159/000484985>

Pitts, N. B., Twetman, S., Fisher, J., & Marsh, P. D. (2021). Understanding dental caries as a non-communicable disease. *British Dental Journal*, 231(12), 749–753. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-3775-4>

Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1-44. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>

Polydorou, O., Halili, A., Wittmer, A., Pelz, K., & Hahn, P. (2012). The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of in vitro evaluation. *Clinical Oral Investigations*, 16(2), 545–550. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0524-0>

Polydorou, O., Pelz, K., & Hahn, P. (2006). Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems: Antibacterial activity of an ozone device. *European Journal of Oral Sciences*, 114(4), 349–353. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00363.x>

Riley, P., & Lamont, T. (2013). Triclosan/copolymer containing toothpastes for oral health. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013 (12), CD010514. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010514>

Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Pérez-Mongiovi, D., & Araujo, R. (2016). The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. In *Advances in Applied Microbiology*, 97, 171–210. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.002>

Sancakli, H., Siso, S., Yildiz, S., & Gökçe, Y. (2018). Antibacterial Effect of Surface Pretreatment Techniques against. *Nigerian journal of clinical practice*, 21(2), 170–175. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_98_16

Santos, G. M., Pacheco, R. L., Bussadori, S. K., Santos, E. M., Riera, R., de Oliveira Cruz Latorraca, C., Mota, P., Benavent Caldas Bellotto, E. F., & Martimbianco, A. L. C. (2020). Effectiveness and Safety of Ozone Therapy in Dental Caries Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. *The Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 20(4), 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2020.101472>

Sen, S., & Sen, S. (2020). Ozone therapy a new vista in dentistry: Integrated review. *Medical Gas Research*, 10(4), 189. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.304226>

Seridou, P., & Kalogerakis, N. (2021). Disinfection applications of ozone micro- and nanobubbles. *Environmental Science: Nano*, 8(12), 3493–3510. <https://doi.org/10.1039/D1EN00700A>

Shah, S. V., Badakar, C. M., Hugar, S. M., Hallikerimath, S., K, G., & Mundada, M. V. (2022). Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Herbal Mouth Rinse on Salivary Streptococcus mutans in Children with Mixed Dentition: A Randomized Crossover Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 15(1), 99–103. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-2348>

Skórka-Majewicz, M., Goschorska, M., Żwierello, W., Baranowska-Bosiacka, I., Styburski, D., Kapczuk, P., & Gutowska, I. (2020). Effect of fluoride on endocrine tissues and their secretory functions—Review. *Chemosphere*, 260, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127565>

Srikanth, A., Sathish, M., & Sri Harsha, A. (2013). Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 5(1), 89-94. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.113304>

Suh, Y., Patel, S., Kaitlyn, R., Gandhi, J., Joshi, G., Smith, N., & Khan, S. (2019). Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Medical Gas Research*, 9(3), 163-167. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.266997>

Tiwari, S., Avinash, A., Katiyar, S., Aarthi Iyer, A., & Jain, S. (2017). Dental applications of ozone therapy: A review of literature. *The Saudi Journal for Dental Research*, 8, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.sjdr.2016.06.005>

Tricarico, G., Orlandin, J. R., Rocchetti, V., Ambrosio, C. E., & Travagli, V. (2020). A critical evaluation of the use of ozone and its derivatives in dentistry. *European review for medical and pharmacological sciences*, 24(17), 9071–9093. https://doi.org/10.26355/eurev_202009_22854

Trunk, T., Khalil, H. S., & Leo, J. C. (2018). Bacterial autoaggregation. *AIMS microbiology*, 4(1), 140–164. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.140>

Tuncay, Ö., Dinçer, A., Kuştarıcı, A., Er, Ö., Dinç, G., & Demirbuga, S. (2015). Effects of ozone and photo-activated disinfection against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 18(6), 814-818. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.163289>

Wang, C. F., & Tian, Y. (2015). Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental Pollution*, 206, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.001>

Warreth, A. (2023). Dental Caries and Its Management. *International Journal of Dentistry*, 2023, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2023/9365845>

Wassel, M. O., & Khattab, M. A. (2017). Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *Journal of Advanced Research*, 8(4), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.05.006>

Wen, Z. T., Huang, X., Ellepola, K., Liao, S., & Li, Y. (2022). Lactobacilli and human dental caries: More than mechanical retention. *Microbiology*, 168(6). 1-11. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001196>

Xiong, X., Wang, B., Zhu, W., Tian, K., & Zhang, H. (2018). A Review on Ultrasonic Catalytic Microbubbles Ozonation Processes: Properties, Hydroxyl Radicals Generation Pathway and Potential in Application. *Catalysts*, 9(1), 1-18. <https://doi.org/10.3390/catal9010010>

ANEXOS

Anexo 1 - Resultados preliminares apresentados no 6º Congresso Internacional do CiiEM "Immediate and future challenges to foster One Health".

IN VITRO STUDY OF THE ANTIBACTERIAL EFFECT OF OZONE ON CARIOGENIC BACTERIA

Marta Santos¹, Joana Cruz², Flávia Leandro¹, Mário Polido², António Delgado² and Helena Barroso^{2*}

¹ Egas Moniz School of Health & Science; marta.filipa00@gmail.com; flaviasofialeandro@gmail.com

² Egas Moniz Center for Interdisciplinary Research (CiiEM); Egas Moniz School of Health & Science; joanacruz@gmail.com; mpolido@egasmoniz.edu.pt; ant.delgado94@gmail.com; mhbarroso@egasmoniz.edu.pt

* Correspondence: marta.filipa00@gmail.com

† Presented at the 6th International Congress of CiiEM—Immediate and Future Challenges to Foster One Health, Almada, 5–7 July 2023.



BACKGROUND

Dental caries is one of the most prevalent chronic diseases worldwide. It is a multifactorial condition, in which bacteria metabolize carbohydrates into organic acids, leading to the demineralization of hydroxyapatite (1,6). Recently there has been a paradigm shift towards a more conservative approach in the treatment of dental caries (4). As a result, ozone has been increasingly used as a complementary and conservative treatment due to its antibacterial action (2,3,5). However, there remains a lack of evidence and consensus on protocols (5). Consequently, this study aims to evaluate *in vitro* the antibacterial capacity of ozone on cariogenic bacteria and contribute to the development of a universal protocol.

MATERIAL AND METHODS

Suspensions of *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Streptococcus sobrinus* DSM 20742, *Lactobacillus casei* ATCC 393 and *Actinomyces naeslundii* DSM 43013 were exposed to 40µg of pure gaseous ozone and 60µg of ozonated water during 80 seconds through an ozone generator machine "Ozonette" (Sedecal, Madrid, Spain). The ozonated water was tested in two different ozone systems, an ozone water bubbler system (SimplyO3, Grand Ledge, USA) and a microbubble water ozonation column (Philozon, Nova Esperança, Brazil) (figure 1).



Figure 1 – Ozone generator machine; Ozone water bubbler system; Microbubble water ozonation column

A negative control group without ozone and a positive control group (chlorhexidine 2%) were used. After the ozone/chlorhexidine's action on the suspensions, aliquots were inoculated on specific culture medium and placed in the incubator at 37°C/48h (figure 2). The results were determined by counting the number of CFU (colony forming unit) on the inoculated media.

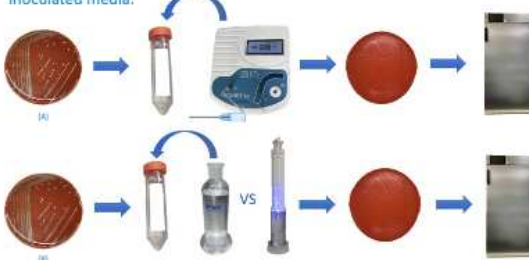


Figure 2 – Simplified protocol of gaseous ozone groups (A) and ozonated water groups (B)

RESULTS

All statistical procedures were performed using IBM SPSS version 28.0 (IBM, New York, USA), in which *Kruskal-Wallis* and *Bonferroni* tests were applied.

There were no statistically significant differences between the different bacteria analysed ($p=0.76$).

It was observed significant bacterial reduction after 80 seconds of ozone exposure in all the microorganisms tested, both on 40µg gaseous ozone ($p<0.01$), 60µg ozonated water ($p<0.01$) and 40µg gaseous ozone + 60µg ozonated water ($p<0.01$) groups (figure 3).

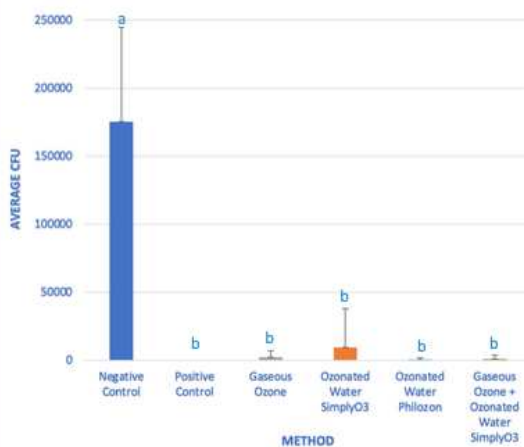


Figure 3 – Graph of averages and standard deviation for each method. The groups with different letters (a,b) show significant differences ($p<0.05$)

Ozone has similar results to Chlorhexidine ($p>0.05$) and although there seems to be a tendency for greater efficacy of ozonized water by the Philozon column compared to the SimplyO3 system, there is no statistical significance between them ($p=0.487$).

CONCLUSION

Ozone, in both water and gas forms, exhibits significant antibacterial activity against cariogenic bacteria, being an equally effective alternative to Chlorhexidine. This supports the need for further investigation as a potential preventive therapy for dental caries or as an antibacterial agent after mechanical caries removal.

ACKNOWLEDGMENTS This research was funded by Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior, CRL and 2M Pharma.

REFERENCES

1. Alvarado L, Deng L, Kaffou H, Palmer SR, Choudhury B, Wen ZL, et al. Biology of Oral Infections. Microbiol Spectr [Internet]. 2018 Oct 5 [cited 2023 May 25]; 6(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272817/> DOI: 10.1128/microreviews.0091-1842-2018
2. Llavero A, De Tejada V, Nave A, Montomayor E, Kurbat S, Argente V, et al. Clinical antibacterial effectiveness measure Technology after complete caries removal. European Journal of Paediatric Dentistry [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 May 25]; 20(1):7-6. Available from: <https://europeandentaljournal.com/2019/03/01/7-6/>
3. Mout R, Tse T, Kaur S, Alzay M. Influence of ozone application in the stepwise excavation of primary molars: a randomized clinical trial. Clinical Oral Investigations [Internet]. 2020 Oct [cited 2023 May 25]; 24(10):3325-3336. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32525883/> DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-020-02228-8>
4. Wessely D, Lohrer T, Speer NP, KPM E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]. 2018 Jul 24 [cited 2023 May 25]; 7 (7) CD008088. Available from: <https://www.cochrane.org/2018/Jul/24/CD008088>
5. Santos OR, Polido M, Baccarini SR, Santos DM, Nave A, de Oliveira-Cruz Latorraca C, et al. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy in Dental Caries Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. Journal of Evidence-Based Dental Practice [Internet]. 2020 Dec [cited 2023 May 25]; 20(4):101472. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33101010/> DOI: 10.1016/j.jebdp.2020.101472
6. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Eckert D, Witter DJ, Barlow-Greene C, et al. Dental caries. Nature Reviews Disease Primers [Internet]. 2017 May 25 [cited 2023 May 25]; 3(1): 17026. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28548517/> DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>