

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

KYMBERLLY DE SOUZA PIGOSSI

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE OZONIZAÇÃO E TEMPERATURAS  
SOBRE A VIABILIDADE DE ÁGUA OZONIZADA PARA FINS TERAPÊUTICOS  
EM ODONTOLOGIA**

Porto Alegre

2019

KYMBERLLY DE SOUZA PIGOSSI

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE OZONIZAÇÃO E TEMPERATURAS  
SOBRE A VIABILIDADE DE ÁGUA OZONIZADA PARA FINS TERAPÊUTICOS  
EM ODONTOLOGIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Cavagni

Porto Alegre

2019

KYMBERLLY DE SOUZA PIGOSSI

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE OZONIZAÇÃO E TEMPERATURAS  
SOBRE A VIABILIDADE DE ÁGUA OZONIZADA PARA FINS TERAPÊUTICOS  
EM ODONTOLOGIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Cavagni

Porto Alegre, 12 de julho de 2019.

---

Juliano Cavagni

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

---

Fernanda Visioli

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

---

Vicente Castelo Branco Leitune

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

## AGRADECIMENTOS

No livro que narra a história da minha vida está prestes a se encerrar mais um capítulo para que eu possa iniciar a compor outro. De tudo que já vivi até hoje, as páginas que narram minha história em busca desse sonho e todas as sensações que ele me proporcionou terão, para sempre, um lugar especial em meu coração. Cada linha escrita dentro dessa história carrega consigo pessoas, momentos e dificuldades que sem dúvidas me auxiliaram na difícil e necessária tarefa de tentar ser alguém melhor, todos os dias – há muito e a quem agradecer.

Primeiramente, gratidão à família maravilhosa a que fui destinada. Ao meu pai Jamir – cuja ligação e sintonia parece vir de outras vidas – e à minha mãe Rosane – porto para me ancorar e recarregar energias antes de me impulsionar para os mais altos voos. Grata também à minha irmã e segunda mãe Janane, minha sobrinha Isadora e meu cunhado Jonatan, os quais abriram mão de suas rotinas e me acolheram durante um ano de curso pré-vestibular, compartilhando tudo que esse momento decisivo trouxe consigo naquela época. Vocês alicerçarem essa conquista e não medirem esforços para que ela se tornasse realidade; mas mais importante que isso: vocês fizeram do meu sonho o sonho de vocês!

Um agradecimento especial às queridas companheiras de graduação e, como costumamos nos chamar – “irmãs de alma” – que essa jornada me presenteou: Tatiana Nery, Bruna Bittencourt, Maieli Nied e Camila Ferri. Hoje sei porque tinha que ser exatamente o vestibular de 2014 – só assim nosso encontro seria possível, resultando nessa amizade que certamente irei levar para toda a eternidade. Não poderia esquecer da Amanda Zimmer que chegou depois, mas nem por isso deixou de ser importante. Afirmo com segurança que a graduação vai me proporcionar muito mais que uma profissão, pois me permitiu cruzar o caminho com pessoas singulares e incríveis. Carrego comigo um pedaço de cada amizade que construí ao longo desses cinco anos e tenho absoluta certeza que ninguém é bom sozinho; nós somos a mistura das pessoas que nos rodeiam e encontramos ao longo da vida.

Obrigada ao Programa de Educação Tutorial que me acolheu durante quatro dos cinco anos de graduação. Onde tive oportunidade de crescer academicamente e, principalmente, como pessoa. Lugar em que aprendi a trabalhar em grupo, liderar, respeitar opiniões divergentes da minha, me superar e desenvolver atividades

extremamente gratificantes, desafiadoras e enriquecedoras tanto a nível acadêmico quanto a nível pessoal.

Um agradecimento especial às mestrandas Alessandra Nicolini e Isadora Rotta, e ao meu orientador, prof. Dr. Juliano Cavagni, o qual me identifiquei desde a primeira aula em que tivemos contato, quando ainda estava no primeiro semestre cursando a disciplina de Introdução à Odontologia.

Por fim, meu agradecimento mais importante: a Deus ou, se acharem melhor, a entidade que acreditarem estar por trás da nossa existência e a razão pela qual damos o nome a isso de vida. Sou muito grata a tudo que precisou acontecer para que eu optasse pelos caminhos que me permitiram chegar até aqui. Hoje, os rumos tomados – até aqueles que aconteceram contra minha vontade – fazem finalmente todo o sentido.

*“Tem algo que não te falam sobre voar: depois que você aprende, fica muito difícil dar um intervalo de tempo muito grande entre o último pouso e uma nova decolagem.”*

Kymerlly de Souza Pigossi

## RESUMO

**Antecedentes e justificativa:** a literatura odontológica ainda carece de protocolos clínicos de ozonização da água considerando a instabilidade da molécula e a necessidade de manutenção da concentração adequada para que as propriedades antimicrobianas sejam garantidas.

**Objetivo:** avaliar a viabilidade da água ozonizada em diferentes temperaturas e regimes de ozonização ao longo do tempo.

**Metodologia:** Foram realizados três experimentos. Primeiramente, a água foi ozonizada a 55µg/mL durante 5 minutos e mantida em dois locais diferentes com faixa de temperatura entre 21 e 23°C e 5 e 10°C . No segundo experimento a água foi mantida somente sob refrigeração e aumentou-se a concentração de O<sub>3</sub> no aparelho para 70µg/mL. Nessa fase, o processo de ozonização teve durabilidade de 5 e 10 minutos em amostras distintas. Finalmente, o último experimento gerou duas amostras de água ozonizada com aparelho regulado em 70µg/mL com tempo de ozonização de 10 minutos, porém com temperatura do refrigerador ainda menor. Procedeu-se a análise da concentração desse gás em meio aquoso através de kit específico nos períodos de 5, 10, 15, 30, 60 minutos e 2, 4 e 6 horas. Outras variáveis mensuradas foram o tempo de ozonização e a quantidade de ozônio produzida pelo aparelho.

**Resultados:** ao avaliar a influência da temperatura ambiente em relação a sua estabilidade, as amostras de água ozonizada que foram mantidas sob refrigeração mostraram maior estabilidade com o passar do tempo quando comparadas a amostras que foram mantidas à temperatura ambiente. O tempo de ozonização também influenciou a estabilidade da solução, visto que a água ozonizada por 10 minutos permaneceu viável por mais tempo, quando comparada a água ozonizada por 5 minutos. Ao avaliar temperatura ainda menor do refrigerador (próxima a 0°C) em concentração otimizada da água ozonizada 70µg/mL, observou-se viabilidade da solução por um período de 2 horas.

**Conclusão:** ozonização com água bidestilada em temperatura próxima de 0°C a 70µg/mL por 10 minutos parece favorecer a manutenção da concentração com propriedades antimicrobianas, possibilitando a viabilidade para seu uso com fins terapêuticos.

Palavras-chave: Ozônio. Uso terapêutico. Administração e dosagem.

## ABSTRACT

**Background:** the dental literature still lacks clinical protocols for water ozonation considering the instability of the molecule and the need to maintain adequate concentration for antimicrobial properties.

**Objective:** to evaluate the viability of ozonated water at different temperatures and ozonation regimes over time.

**Methods:** Three experiments were carried out. First, the water was ozonated at 55µg/mL for 5 minutes and held at two different locations with temperatures between 21 and 23°C or 5 and 10°C. In the second experiment the water was only kept under refrigeration and the O<sub>3</sub> concentration in the apparatus was increased to 70µg/mL. In this phase, the ozonation process had a durability of 5 and 10 minutes in different samples. Finally, the last experiment generated two samples of ozonated water with 70µg/mL regulated apparatus with ozonation time of 10 minutes, but with an even lower refrigerator temperature. After obtaining the water in each experiment, the concentration was analyzed through a specific kit in the periods of 5, 10, 15, 30, 60 minutes and 2, 4 and 6 hours.

**Results:** the samples of ozonated water that were maintained under refrigeration showed greater stability throughout time when compared to samples that were maintained at room temperature. The ozonation time also influenced the stability of the solution, since the ozonated water for 10 minutes remained viable longer when compared to the ozonated water for 5 minutes. When evaluating an even lower temperature of the refrigerator (close to 0°C) in optimized concentration of 70µg/mL of ozonated water, the solution was viable for a period of 2 hours.

**Conclusion:** ozonation with bidistilled water at a temperature close to 0°C in 70µg/mL for 10 minutes seems to maintain the concentration with antimicrobial properties, allowing the viability for its use with therapeutic purposes.

Keywords: Ozone. Therapeutic use. Administration and dosage.

## APRESENTAÇÃO

A ozonioterapia é uma área que vem crescendo em estudos clínicos e laboratoriais, tanto na área médica quanto odontológica. Em virtude de que as características da molécula de ozônio são de interesse nas áreas citadas, estudos vêm sendo sugeridos afim de que as melhores propriedades sejam alcançadas na prática clínica. Na odontologia, a ozonioterapia é utilizada em tratamentos em suas três formas de aplicação: gás, água e óleo. Áreas que se mostram promissoras à utilização do ozônio associado a terapia são a endodontia, periodontia, estomatologia, cariologia e cirurgia. No entanto, os estudos ainda carecem de informações importantes a respeito de como essa terapia é empregada, além de apresentarem qualidade limitada.

O presente trabalho de conclusão de curso faz parte de um projeto maior intitulado “Eficácia de bochecho com água ozonizada sobre a formação do biofilme bacteriano bucal e inflamação gengival: um ensaio clínico randomizado cruzado”. Os resultados apresentados neste estudo são de análises laboratoriais realizadas em água ozonizada em diferentes temperaturas e tempos experimentais, visando verificar a viabilidade da água ozonizada para obtenção de propriedade antimicrobiana. Nesse sentido, a contribuição do presente trabalho inclui o estabelecimento do melhor protocolo clínico a ser empregado no estudo maior, garantindo com isso a viabilidade da solução e, portanto, maior validade interna do ensaio clínico.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

WFOT	World Federation of Occupational Therapists
O <sub>3</sub>	Ozônio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados
ROS	Espécies reativas de oxigênio
LOPS	Produtos de oxidação lipídica
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
GSH	Glutathione Peroxidase
PL	Projeto de Lei
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CFM	Conselho Federal de Medicina
CSSF	Comissão de Seguridade Social e Família
ABOZ	Associação Brasileira de Ozonioterapia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
2.1 TIPO DE ESTUDO .....	19
2.2 LOCAL .....	19
2.3 EXPERIMENTOS.....	19
2.4 PREPARO PADRÃO DA ÁGUA OZONIZADA .....	21
2.5 PROTOCOLO DE ANÁLISE PARA CADA AMOSTRA .....	23
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 EXPERIMENTO 1 .....	25
3.2 EXPERIMENTO 2 .....	26
3.3 EXPERIMENTO 3.....	28
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O ozônio ( $O_3$ ), também denominado trioxigênio, é um gás alótropo do oxigênio ( $O_2$ ) naturalmente encontrado na superfície terrestre. O rompimento da ligação existente entre os átomos do  $O_2$ , causado pela interação dessa molécula com a radiação ultravioleta de origem solar, faz com que o oxigênio liberado dessa reação se una à outra molécula de  $O_2$  íntegra gerando, assim, o gás ozônio ( $O_3$ ). Em relação às propriedades físico-químicas, o ozônio apresenta uma coloração azul celeste e odor característico, grande solubilidade em água e alta instabilidade. Devido ao fato da reação para obtenção de  $O_3$  ser endotérmica, necessitando de calor para ocorrer, o tempo de meia vida desse gás aumenta em temperaturas menores (WFOT Scientific Advisory Committee, 2015).

Acredita-se que o uso medicinal do ozônio tenha cerca de 150 anos. Embora o ozônio tenha sido descoberto ainda no século XVIII, pelo físico Martin Van Marum, a obtenção desse gás de forma artificial pela primeira vez só foi possível no século seguinte por volta de 1840, durante estudos do químico alemão Christian Friedrich. Ainda na metade do século XIX surge o primeiro aparelho capaz de sintetizar gás ozônio por meio de descargas elétricas em átomos de oxigênio. Durante a Primeira Guerra Mundial o gás era utilizado para tratar ferimentos dos soldados devido a sua capacidade desinfetante - tal fato rendeu aos médicos alemães e ingleses uma publicação na revista *The Lancet* sobre o assunto, em 1917 (STOKER *et al.*, 1917). Todavia, a ausência de materiais resistentes à oxidação dificultava seu uso, o que acabou limitando novos estudos sobre o assunto e conseqüentemente, a aplicabilidade desse gás como agente terapêutico foi esquecida durante alguns anos. A publicação intitulada "O Tratamento com  $O_3$  na Cirurgia" pelo dentista Edward Fish, em 1935, deu início à Ozonioterapia conhecida até os dias de hoje. Somente em 1970 o uso medicinal desse gás chegou ao Brasil sendo, posteriormente, amplamente difundido em cursos e congressos pelo médico Edison de Cezar Philippi. (FERREIRA *et al.*, 2013; MARIÑO; SCWHARTZ, 2012).

Além de sua utilidade terapêutica e medicinal, o  $O_3$  é um gás que vem sendo amplamente difundido em operações sanitárias e na indústria alimentícia. Em 2001, a Associação de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos autorizou oficialmente o uso de  $O_3$  como antimicrobiano para tratamento, armazenamento e processamento de alimentos. Além disso, a utilização do cloro como agente desinfetante para

obtenção da água potável ao longo de muitas décadas levou ao surgimento de microrganismos resistentes a esse agente químico, o que representa uma ameaça potencial à saúde pública. No que diz respeito à eficácia do ozônio como agente para desinfecção da água, o uso do mesmo foi validado por milhares de estações de tratamento por todo mundo, o que garante seu emprego com segurança e efetividade pelos diferentes sistemas de vigilância mundiais. Nesse sentido, o ozônio tem sido uma alternativa utilizada em diversos países para desinfecção da água de abastecimento pois permite atingir bactérias e esporos resistentes ao cloro ao mesmo tempo que confere melhores propriedades organolépticas à mesma (DING *et al.*, 2019).

Sabe-se que o  $O_3$  é o terceiro agente oxidante mais potente na escala química. Todavia, o uso desse gás como opção terapêutica baseia-se no pressuposto de que a dosagem administrada é elemento determinante para conferir ao mesmo características terapêuticas ou prejudiciais às células. O  $O_3$  no plasma sanguíneo, quando administrado em doses adequadas, reage imediatamente e em sua totalidade com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), os quais são biomoléculas antioxidantes naturalmente presentes nesse meio. As reações químicas causadas na presença de ozônio com PUFAS geram as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio e, em menor quantidade, produtos de oxidação lipídica (LOPS) (AL-DALAIN *et al.*, 2001; ANTUNES; CADENAS, 2000; BOCCI, 1996).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é o principal produto decorrente das reações químicas que ocorrem na presença de  $O_3$ , levando ao aumento imediato dos níveis dessa substância no plasma e meio intracelular. Conseqüentemente, um estresse oxidativo de grau leve e controlado é causado nas células. Devido a agentes oxidantes naturalmente presentes nos eritrócitos como, por exemplo, a glutathione peroxidase (GSH), os níveis normais de  $H_2O_2$  no plasma e na célula são rapidamente restabelecidos. Nos estudos de Bocci *et al.* (1996) 200ml de sangue humano foram expostos à uma mistura gasosa  $O_3-O_2$  com concentrações variando de 20 a 80 $\mu$ g de  $O_3$ . Independente da concentração, verificou-se que o peróxido de hidrogênio formado devido à presença de  $O_3$  é totalmente eliminado pelos eritrócitos. Em virtude do sistema antioxidante presente nas células, os níveis intracelulares de  $H_2O_2$  retornam à normalidade após cerca de 10 a 15 minutos. Sendo assim, a presença de  $H_2O_2$  em níveis acima dos considerados normais atua como sinalizador para ativação de cadeias bioquímicas importantes que geram uma série de respostas antioxidantes

úteis ao organismo – o que explicaria, em partes, o emprego terapêutico do O<sub>3</sub>. (HALLIWELL, 2001).

Embora o peróxido de hidrogênio seja a principal substância gerada na reação entre o ozônio e ácidos graxos poli-insaturados presentes no plasma, essa interação também obtém (de forma tardia e em menores quantidades) e LOPS. Os LOPS atuam principalmente a nível nuclear das células da medula óssea regulando processos de enzimas antioxidantes, estimulando a síntese proteica e, provavelmente, estimulando a produção de células-tronco. Por meio desses mecanismos os LOPS induzem a adaptação ao estresse oxidativo controlado causado pelo aumento dos níveis circundantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decorrente da administração de doses adequadas de O<sub>3</sub>. (BURGASSI, 2009).

A alta solubilidade do O<sub>3</sub> não permite que o mesmo estabeleça uma reação de equilíbrio quando em contato com o plasma sanguíneo – ao contrário de seu alótropo, O<sub>2</sub>. Por esse motivo, a quantidade de ozônio administrada no plasma sanguíneo é consumida em sua totalidade. Sendo assim, ao término do suprimento de ozônio cessa também a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e LOPS o que faz com que a oxidação lipídica causada por decorrência da presença desse gás no meio seja um processo bem controlado. Por esse motivo, as reações envolvendo o ozônio no organismo ocorrem em quantidade específica e apenas um número limitado de LOPS e peróxido de hidrogênio serão gerados, dependendo exclusivamente da dose de ozônio administrada. (CARDILE, 1995).

Quando o ozônio é administrado, uma parte desse gás será neutralizada pelos mecanismos naturais de defesa presentes nas células do organismo. A porção restante, por sua vez, reagirá com PUFAS para obtenção de substâncias capazes de desencadear reações biológicas e terapêuticas importantes. Sendo assim, o mecanismo terapêutico do ozônio baseia-se no controle da produção de LOPS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para ser obtenção de efeitos biológicos a nível celular. Para que tais efeitos biológicos sejam capazes de trazer respostas importantes e seguras ao organismo, a dosagem adequada de ozônio deve ser determinada de acordo com a capacidade antioxidante do tecido em questão, estando dentro da faixa terapêutica. Em suma, quando o O<sub>3</sub> é administrado em doses adequadas, provoca um estresse celular controlado que não deve ser subliminar a ponto de exercer efeito placebo ao mesmo tempo que não pode ser exacerbado. Nos casos de dosagem muito acima das faixas terapêuticas, a

capacidade antioxidante das células atinge seu ponto de saturação, o que pode acarretar em danos e prejuízo celular. (BOCCI *et al.*, 1998; DIAZ-LLERA *et al.*, 2002).

A administração do ozônio no organismo pode se dar através do contato com uma mistura gasosa (95% de O<sub>2</sub> e 5% de O<sub>3</sub>), água ozonizada ou óleos ozonizados, os quais podem ser obtidos através de geradores específicos para cada caso. Em relação a estabilidade desses meios, de acordo com a literatura, a concentração de ozônio se mantém mais estável sob a forma de óleo quando comparado a água e gás, respectivamente. Em contrapartida, embora a água não seja o meio que garante melhor estabilidade do gás, o emprego do O<sub>3</sub> por meio desse veículo é o que apresenta maior biocompatibilidade com os tecidos humanos. Cabe salientar, que fatores como temperatura, local de armazenamento, pH e composição da água estão diretamente à estabilidade da molécula em seus diferentes veículos (BOCCI, 2005; HAENSLER, 2013). Levando em consideração que as reações químicas que envolvem a síntese e decomposição do ozônio são endotérmicas, em temperaturas mais baixas esse gás tem seu tempo de vida, havendo uma relação inversamente proporcional entre sua estabilidade e temperatura. Em relação ao pH da água, sabe-se que meios básicos aceleram sua decomposição (DI BERNARDO, DANTAS, VOLTAN, 2017). Em relação ao tipo de água utilizado, sabe-se que quanto maior for sua impureza, mais rápida é a desintegração da molécula de ozônio. Por fim, deve-se evitar o contato da água ozonizada com superfícies poliméricas, principalmente no que diz respeito ao seu armazenamento, uma vez que essa molécula possui alta reatividade com esse tipo de material (HAENSLER, 2013).

As vias de administração parenterais e tópica têm sido as formas de aplicação mais empregadas na medicina descritas na literatura. Levando em consideração que a capacidade antioxidante de um tecido é fator determinante para dose de ozônio a ser empregada, a via respiratória (por inalação) é contraindicada. Nesses casos, o O<sub>3</sub> apresenta-se como um gás potencialmente tóxico ao trato respiratório, uma vez que esses tecidos apresentam baixa quantidade de substâncias capazes de metabolizar os produtos decorrentes das reações biológicas desse gás com o meio. Além disso, a injeção do gás por via intravenosa também não é recomendada, devido ao risco de embolia por oxigênio (WFOT Scientific Advisory Committee, 2015). Até o momento, a literatura a respeito das formas de administração do O<sub>3</sub> defende as vias subcutânea, intrapleural, intraperitoneal e auto-hemoterapia como as mais comumente empregadas e seguras, além do seu uso tópico (BOCCI, 2006; STADLBAUER, 2008).

Em outubro de 2017 o Projeto de Lei (PL) nº 9001/2017, o qual objetiva regulamentar a prescrição da ozonioterapia no Brasil, foi aprovado pelo Senado Federal. O Diário Oficial da União do dia 10 de julho de 2018 trouxe, em sua publicação, a Resolução do Conselho Federal de Medicina (CFM) nº 2.181/2018, a qual definiu a ozonioterapia como um procedimento passível de ser realizado apenas quando em caráter experimental. Sendo assim, tratamentos médicos baseados nessa abordagem devem ser realizados apenas com o propósito de estudos que cumpram os critérios estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep). De acordo com o CFM, o desrespeito dessa norma pode levar à abertura de sindicâncias e processos de infração ética contra os profissionais. No início de 2019, uma nota publicada pelo CFM posicionou-se contra o PL nº 9001/2017. Atualmente, o Projeto de Lei encontra-se em tramitação na Câmara dos Deputados aguardando parecer do relator na Comissão de Seguridade Social e Família (CSSF).

De acordo com a Associação Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ), o O<sub>3</sub> quando empregado de forma terapêutica possui propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, é capaz de modular o estresse oxidativo e melhorar aspectos da circulação periférica e oxigenação. Dentre as indicações da ozonioterapia, cabe ressaltar: redução dos efeitos colaterais decorrentes dos tratamentos de radioterapia e quimioterapia, problemas circulatórios, doenças virais, feridas de origem vascular, diabética e por insuficiência arterial, queimaduras, hérnias de disco, protrusão discal e dores lombares, dores articulares decorrentes de inflamações crônicas, colites e outras inflamações intestinais crônicas e imunoativação no geral. Além disso, outros benefícios ao organismo também podem ser citados, tais como: liberação de óxido nítrico, envolvida no processo de vasodilatação; modulação do sistema imunológico, otimização da drenagem linfática, efeito lipolítico, liberação de fatores de crescimento ou regeneração, efeito germicida; regulação do metabolismo e das funções hepáticas, renal e tireoidiana; estímulo da síntese de enzimas antioxidantes intracelulares; melhora da liberação de oxigênio nos tecidos e modulação da cascata inflamatória (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA, 2019).

O favismo é a principal condição clínica que contraindica o emprego da ozonioterapia. Nesses casos ocorre déficit da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase, a qual tem papel extremamente importante no processo de oxidação dos produtos gerados pelo O<sub>3</sub> havendo, nessas situações, o risco de hemólise e processos oxidativos em demasia (MILLER *et al.*, 1993). Embora o risco mutagênico

e outras consequências sejam improváveis, o ozônio também não deve ser utilizado em casos de gravidez. Outras situações como hipotireoidismo, trombocitopenia, distúrbios de coagulação não controlados, anemia e hipertensão arterial severa e instabilidade cardio-vascular merecem atenção especial, sendo necessária sua estabilização clínica antes do início da terapia com ozônio (SMITH *et al.*, 2017; WFOT Scientific Advisory Committee, 2015)

Em estudo de Vázquez e colaboradores (2018) buscou avaliar a eficácia da ozonioterapia como tratamento para pacientes portadores de osteoartrite no joelho. Na revisão, foram incluídos 10 ensaios clínicos controlados totalizando 400 pacientes que receberam terapia com ozônio e 381 pacientes que foram tratados de forma convencional. Constatou-se que, a curto prazo, as infiltrações intra-articulares com ozônio foram mais efetivas que o tratamento placebo e igualmente eficazes quando comparada aos tratamentos convencionais, não havendo nenhuma reação adversa ou efeitos colaterais nos pacientes tratados. Todavia, devido ao risco de viés encontrado nos estudos envolvidos, os autores ressaltam a necessidade de estudos com maior qualidade metodológica a fim de confirmar a eficácia e analisar a segurança dessa forma de tratamento a longo prazo.

O pé diabético é uma complicação comum do Diabetes *melittus* que ocorre quando uma área machucada ou infeccionada nos pés desenvolve uma úlcera devido a circulação sanguínea deficiente ou aos níveis glicêmicos não controlados. Em casos mais avançados, essa situação pode evoluir levando à morbidade e à mortalidade. Um estudo abrangendo 200 pacientes com pé diabético avaliou a eficácia da ozonioterapia na cicatrização das úlceras decorrentes dessa complicação. Um grupo recebeu o tratamento com O<sub>3</sub> além do tratamento padrão regular já estabelecido na literatura. O outro grupo, por sua vez, recebeu o tratamento de rotina. Dentre os desfechos avaliados no estudo estão: tamanho e grau de severidade da ferida, tempo de cicatrização, glicemia em jejum dos pacientes e mensuração de biomarcadores inflamatórios específicos antes e após os diferentes tratamentos. Os resultados obtidos através dessa pesquisa constataram a eficácia do tratamento com ozônio para pacientes com pé diabético com um tempo médio de cicatrização significativamente menor quando comparado ao grupo controle e também mostrou-se uma modalidade de tratamento adequada no que diz respeito à redução das chances de infecção e amputação desses casos (IZADI *et al.*, 2019).

Um ensaio clínico randomizado avaliou a eficácia e segurança do novo sistema com terapia de ozônio para o tratamento da hepatite B crônica. Cento e oitenta e nove pacientes foram alocados em 3 grupos experimentais da seguinte maneira: grupo 1 – auto-hemoterapia com ozônio usando gerador TianYi; grupo 2 – auto-hemoterapia com ozônio utilizando gerador Humares e grupo 3 – uso via oral de cápsulas de glicirrizinato de amônio. Verificou-se que o perfil de segurança foi semelhante para o tratamento nos três grupos e os eventos adversos foram infrequentes e, quando houveram, leves. A ozonioterapia, por sua vez, teve eficácia antiviral superior com segurança semelhante às cápsulas de glicirrizinato de amônio. Além disso, também associou-se ao tratamento utilizando O<sub>3</sub> à normalização dos níveis de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase). Sendo assim, essa modalidade terapêutica poderia trazer benefícios importantes e significativos aos pacientes portadores de hepatite B crônica (YU *et al.*, 2018).

A aplicação do ozônio como método terapêutico nas diferentes áreas da medicina ainda é controversa. Mesmo décadas após o início da ozonioterapia, fatores como a dificuldade de estudos capazes de fornecer dados científicos, biológicos e clínicos sólidos aliados a falta de regulamentação, apoio financeiro e desinteresse das autoridades de saúde impede o progresso dessa modalidade terapêutica para além das práticas complementares (BOCCI, 2006). Se por um lado existem profissionais defendendo seu uso e falando sobre seus benefícios, por outro existem aqueles que acreditam ser necessário buscar mais conhecimento sobre o tema para que se garanta sua empregabilidade com eficácia e segurança (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2018).

Dr. Fish foi o primeiro cirurgião-dentista a usar a água ozonizada na prática odontológica. Naquela época, passou-se a utilizar o O<sub>3</sub> em cirurgias odontológicas a fim de melhorar a homeostase, suprimento local de O<sub>2</sub> e inibir a proliferação bacteriana, diminuindo as chances de quadros infecciosos (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2007). Estudos mostram que o O<sub>3</sub> aquoso possui boa compatibilidade com células do epitélio oral, gengiva, fibroblastos e células periodontais. Dessa forma, a administração tópica de ozônio, através da água ozonizada, é a forma de emprego terapêutico mais comum desse gás na área da odontologia (HUTH *et al.*, 2006).

Estudo de Arita e colaboradores (2005) avaliaram o efeito da água ozonizada sobre *Cândida albicans* presentes em dentaduras de acrílico. Os resultados desse estudo sugerem que o uso da água ozonizada foi útil para reduzir significativamente

a quantidade desse fungo sobre as próteses. Além disso, o O<sub>3</sub> tem se mostrado um agente desinfetante potencialmente eficaz para agir sobre os biofilmes removendo alguns microrganismos tais como *Legionella pneumophila*, *S. mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium* e *E. faecalis* (WALKER *et al.*, 2003). Os estudos de Nagayoshi (2009) apontaram um efeito importante da água ozonizada sobre a membrana de bactérias gram-negativas, como *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*. Além disso, sua aplicação tópica mostrou forte atividade bactericida contra bactérias presentes no biofilme dentário e, em experimentos *in vitro*, foi capaz de inibir o acúmulo de placa dentária experimental.

A área da endodontia é uma das mais estudadas dentro da ozonioterapia, porém a literatura ainda é bastante conflitante. Em estudo realizado por Cardoso *et al.* (2008) inocularam *C. albicans*, *E. faecalis* e endotoxinas de *Escherichia coli* em espécimes de dentes humanos. Em um grupo o agente irrigante utilizado foi a água ozonizada e a solução fisiológica foi usada no grupo controle. Embora a água ozonizada tenha mostrado uma redução significativa no número de *C. albicans* e *E. faecalis* na amostragem imediata, valores maiores foram detectados no período após 7 dias. Além disso, não houve nenhuma atividade em relação à endotoxina. Em contrapartida, estudo de Nogales e colaboradores (2014) buscaram avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de água ozonizada em espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. De acordo com a metodologia aplicada por este grupo, o ozônio aquoso na concentração de 8 µg/mL foi eficiente para eliminar esses três tipos de bactérias. Pode-se dizer que esses estudos laboratoriais sugerem um potencial promissor do ozônio, todavia, a evidência clínica para sua aplicação em endodontia ainda não é consistente. Dessa forma, há necessidade de mais estudos controlados a respeito do assunto para que assim seja possível justificar o uso desse gás como modalidade de tratamento rotineiro em endodontia (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2007).

Devido à capacidade bactericida e bacteriostática do ozônio, inúmeros estudos têm buscado avaliar o efeito desse gás como tratamento adjuvante das doenças periodontais. Nos estudos *in vitro* de Huth *et al.* (2011), que tinham como objetivo comparar a eficácia antisséptica da ozonioterapia em relação à clorexidina contra microrganismos periodontais, verificou-se que os tratamentos com ozônio gasoso e aquoso (em altas concentrações) se mostraram antissépticos potentes na terapia para periodontite. Dodwad e colaboradores (2011) concluíram, através de seus estudos,

que a aplicação tópica de O<sub>3</sub> pode servir como potente agente antimicrobiano ao mesmo que possui boa biocompatibilidade para atuar como adjuvante no tratamento não-cirúrgico de doenças periodontais. Um estudo randomizado do tipo boca-dividida de Kshitish e Laxman (2010) foi realizado para comparar o efeito da clorexidina e do O<sub>3</sub> no tratamento periodontal. Os autores observaram maior redução no índice de placa, índice de sangramento gengival e profundidade das bolsas. Somado à isso, uso do ozônio permitiu um efeito antifúngico adicional não encontrado nos sítios em que foi utilizada a clorexidina.

Todavia, o estudo de Tasdemir *et al.* (2019) não encontrou diferença dos parâmetros periodontais adotados quando avaliaram a influência do uso da água ozonizada como adjuvante no tratamento não cirúrgico de pacientes com periodontite crônica. Em consonância com os autores anteriormente citados, Ahu e colaboradores (2018) não encontraram resultados que mostrassem que o tratamento da periodontite crônica utilizando O<sub>3</sub> como adjuvante fosse capaz de trazer benefícios adicionais aos parâmetros clínicos, microbiológicos e bioquímicos em relação ao tratamento não-cirúrgico padrão.

Levando em consideração que o ozônio é um gás altamente instável e solúvel em água e que sua concentração deve estar em níveis suficientemente capazes de desencadear respostas celulares e microbiológicas para que seja possível exercer seu efeito terapêutico, estudos capazes de mensurar a concentração desse gás e como ela se comporta ao longo do tempo em águas ozonizadas se fazem necessários. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade da água ozonizada em diferentes temperaturas e regimes de ozonização ao longo do tempo.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo utilizou um delineamento do tipo ensaio experimental, *in vitro*.

### 2.2 LOCAL

O estudo foi realizado pela equipe de Periodontia nas dependências da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em dois ambientes diferentes com temperaturas controladas, sendo um climatizado e outro refrigerado.

### 2.3 EXPERIMENTOS

O presente estudo foi dividido em três experimentos. Em um primeiro momento buscou-se avaliar o impacto da temperatura do ambiente sobre a estabilidade da água. Posteriormente, buscou-se avaliar qual a possível influência no aumento do tempo de ozonização e na quantidade aplicada de O<sub>3</sub> durante o preparo da água. Por fim, com base nos melhores resultados observados nos experimentos 1 e 2, realizou-se uma nova avaliação da concentração de O<sub>3</sub>, objetivando o estabelecimento de um protocolo de ozonização. A figura 1 traz um fluxograma resumido dos experimentos realizados nesse estudo.

Para os testes foram necessários 4 litros de água bidestilada da marca Eurofarma. O aparelho (Modelo O&L1.5 RM, Ozone&Life, São Paulo, Brasil) foi regulado antecipadamente e 500mL de água bidestilada era ozonizada por um período de acordo com o experimento. Após o final do procedimento de ozonização, o líquido foi transferido para recipiente de vidro com tampa, vedado e armazenado de acordo com as amostras e experimentos.

As análises da concentração de O<sub>3</sub> na água obtida foram realizadas em tempos padronizados. Além disso, a temperatura do local de armazenagem e de cada amostra da solução ozonizada foram mensuradas e registradas através de termômetros específicos no momento de cada análise.

**Figura 1 - Diferentes experimentos de acordo com a concentração de ozônio utilizada, tempo de ozonização e períodos em que foram feitas as análises.**



No primeiro experimento foram obtidas 4 amostras. Em todas, programou-se o aparelho para a geração de uma com concentração de 55 µg/mL de O<sub>3</sub>. As análises nesse grupo foram realizadas nos períodos de 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 e 360 minutos. Foram necessários o total de 2 litros de água bidestilada para o primeiro experimento, sendo que um dia antes da realização dos testes 1 litro foi deixado no local de realização do estudo (amostra 1) e o outro mantido sob refrigeração em geladeira (amostra 2). No grupo em que a água foi mantida à temperatura ambiente, foram adicionados à coluna do aparelho 500mL de água bidestilada em um primeiro momento e, após o processo de obtenção, a solução foi transferida para um recipiente e o mesmo armazenado no local do experimento, à temperatura ambiente. Posteriormente, este mesmo protocolo foi repetido com os 500mL restantes da mesma água bidestilada, a fim de obter-se uma segunda amostra da mesma solução. No grupo em que a água foi armazenada em refrigerador o protocolo experimental foi o mesmo utilizado no grupo anterior, à exceção de que, após obtenção da solução, a mesma foi transferida para recipiente com tampa vedável e armazenada sob refrigeração. Um termômetro foi colocado no refrigerador a fim de registrar a temperatura em seu interior. Posteriormente, repetiu-se o mesmo processo com os 500mL de água bidestilada refrigerada restantes, obtendo uma segunda amostra.

Para o segundo experimento, o ozonizador foi programado para geração de uma água de concentração 70 µg/mL de O<sub>3</sub>. Após processo de obtenção da solução as mesmas foram transferidas para o recipiente de vidro e mantidas sob refrigeração. As análises nesse grupo foram realizadas nos períodos de 5, 30, 60, 100 e 120 minutos. Nesse protocolo, 1 litro de água bidestilada armazenada sob refrigeração 24

horas antes dos testes foi utilizado. Assim, para uma das amostras ozonizou-se 500mL de água bidestilada durante 5 minutos; na outra os 500mL restantes foram ozonizados durante o período 10 minutos.

No terceiro experimento foi utilizado 1 litro de água bidestilada. Em um primeiro momento, 500mL de água foram ozonizados durante 10 minutos com gerador de ozônio programado para geração de água com concentração em a 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{O}_3$ . Após o tempo de preparo da água, a mesma foi transferida para o recipiente e mantida sob refrigeração, em temperatura inferior à do experimento 2. As análises nesse experimento foram realizadas nos períodos de 5, 30, 60, 100 e 120 minutos. Posteriormente, repetiu-se o mesmo processo com os 500mL de água bidestilada restante, gerando a segunda amostra da solução.

#### 2.4 PREPARO PADRÃO DA ÁGUA OZONIZADA

Para obtenção da água ozonizada foi utilizada água bidestilada (Eurofarma), um gerador de ozônio (Modelo O&L1.5 RM, Ozone&Life, São Paulo, Brasil) e oxigênio medicinal. Para o processo de ozonização, foram adicionados 500ml de água bidestilada a uma coluna de vidro com tampa (Ozone&Life, São Paulo, Brasil) e o líquido borbulhado durante um período de tempo específico de acordo com cada experimento. Antes de dar início a cada ciclo de ozonização, foi realizado um teste onde o  $\text{O}_3$  gerado pelo aparelho foi capturado através de uma seringa siliconizada e aplicado em luva de látex; tal procedimento teve intuito de garantir que a saída de  $\text{O}_3$  do gerador deu-se de maneira adequada. A figura 2 aborda um fluxograma resumido dessa etapa do estudo.

No experimento 1 o gerador foi regulado para uma concentração de 55  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e o cilindro de oxigênio foi programado em  $\frac{1}{4}$ , levando a geração de uma água com concentração aproximada 13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{O}_3$ . Ao dar início ao processo de ozonização, a água borbulhou por 5 minutos (tempo padrão para que ocorra saturação da água). Ao final do processo, a água foi acondicionada em recipiente de vidro com tampa e armazenada de acordo com os experimentos. Foram necessários o total de 2 litros de água bidestilada para os experimentos, sendo que um dia antes da realização dos testes 1 litro foi deixado no local de realização do estudo (amostra 1) e o outro mantido sob refrigeração em geladeira (amostra 2). No grupo em que a água foi mantida à temperatura ambiente, foram adicionados à coluna do aparelho 500mL de água

bidestilada em um primeiro momento e, após o processo de obtenção, a solução foi transferida para um recipiente e o mesmo armazenado no local do experimento, à temperatura ambiente.

**Figura 2 - Fluxograma resumido do passo-a-passo para a ozonização da água utilizado no estudo.**



Nos experimentos 2 e 3, o gerador foi regulado para uma concentração de  $70\mu\text{g/mL}$  (capacidade máxima do aparelho utilizado) e o cilindro de oxigênio foi programado em  $1/8$ . Segundo a literatura, o produto final seria uma água com concentrações aproximadas de 13 e  $17\mu\text{g/mL}$  de  $\text{O}_3$ , pois a capacidade máxima de concentração atingida na ozonização é de 25% da total (BOCCI, 2005). Tanto no experimento 2 como no experimento 3, a água utilizada foi refrigerada 24 horas antes de dar início aos testes.

No segundo experimento utilizou-se 1 litro de água bidestilada. A primeira amostra foi obtida através da colocação de 500mL dessa água na coluna do aparelho e o processo de ozonização teve duração de 5 minutos. Na segunda amostra desse experimento, os 500mL de água restantes foram ozonizados pelo dobro do tempo, fazendo com que o processo para sua obtenção durasse 10 minutos. Após o processo

de obtenção das amostras do segundo experimento, as mesmas foram armazenadas em recipientes de vidro com tampa e mantidas sob regime de refrigeração.

O último experimento utilizou 1 litro de água e o tempo de 10 minutos como padrão para a obtenção de ambas amostras. Inicialmente, 500mL de água foram adicionadas ao aparelho e ozonizadas durante 10 minutos. O processo se repetiu posteriormente com os 500mL restantes. Após o processo de ozonização, ambas amostras foram transferidas para o recipiente específico e armazenadas sob refrigeração.

## 2.5 PROTOCOLO DE ANÁLISE PARA CADA AMOSTRA

A análise foi realizada por meio do kit colorimétrico Ozone - CHEMets® Visual Kit K-7404 (CHEMetrics). O teste consistiu em análise por meio de comparação visual através de escala de cor. O kit compõe dois comparadores de ozônio, o comparador de baixo alcance verifica concentrações entre 0,00 a 0,60 ppm e é composto por um recipiente contendo os comparadores dispostos ao redor, onde a amostra é anexada no centro deste recipiente e a comparação da amostra realizada com as diferentes tonalidades do comparador. Já o comparador de alto alcance verifica concentrações que vão de 0,60 a 3,00 ppm, sendo a comparação realizada no mesmo contexto do anterior, porém os comparadores estão dispostos em sequência linear de gradação.

O preparo para análise das amostras decorreu da seguinte forma: dois participantes do estudo ficaram responsáveis pelo preparo padronizado da água ozonizada, após um participante realizou a etapa de confecção das amostras, que consistiu no seguinte preparo: 5 gotas de solução reagente (A-7400, CHEMetrics) foram adicionadas ao frasco que compõe o kit, 20mL de água bidestilada estéril e 5mL da água ozonizada foram também adicionados ao frasco. Tanto a água ozonizada quanto a bidestilada foram coletados pelo método de pipetagem afim de que as quantidades necessárias para o teste fossem precisas. Logo após, uma ampola a vácuo (R-7404, CHEMetris) foi inserida no frasco e sua ponta quebrada, afim de permitir a reação entre a solução presente dentro da ampola e a amostra do frasco. Ao ocorrer a reação, o líquido dentro da ampola se tornou rosa, em diferentes gradações, e foi misturado até que ocorresse a homogeneidade de toda a solução na ampola, durante 1 minuto. A ampola passou por processo de secagem com papel toalha e então a análise foi procedida por um único examinador, através dos

comparadores de ozônio de baixo e alto alcance. Em caso de necessidade, um examinador referência foi solicitado. Ao realizar a análise, de acordo com os comparadores, o valor indicado de concentração foi multiplicado por 5, já que a água ozonizada inicialmente foi diluída em água bidestilada, afim de equiparar os valores achados no estudo com os valores reais.

No experimento 1, as amostras foram analisadas nos períodos de 5', 10', 15', 30', 60', 120', 240' e 360'. Já nos experimentos 2 e 3, as análises foram feitas em 5', 30', 60', 100' e 120'.

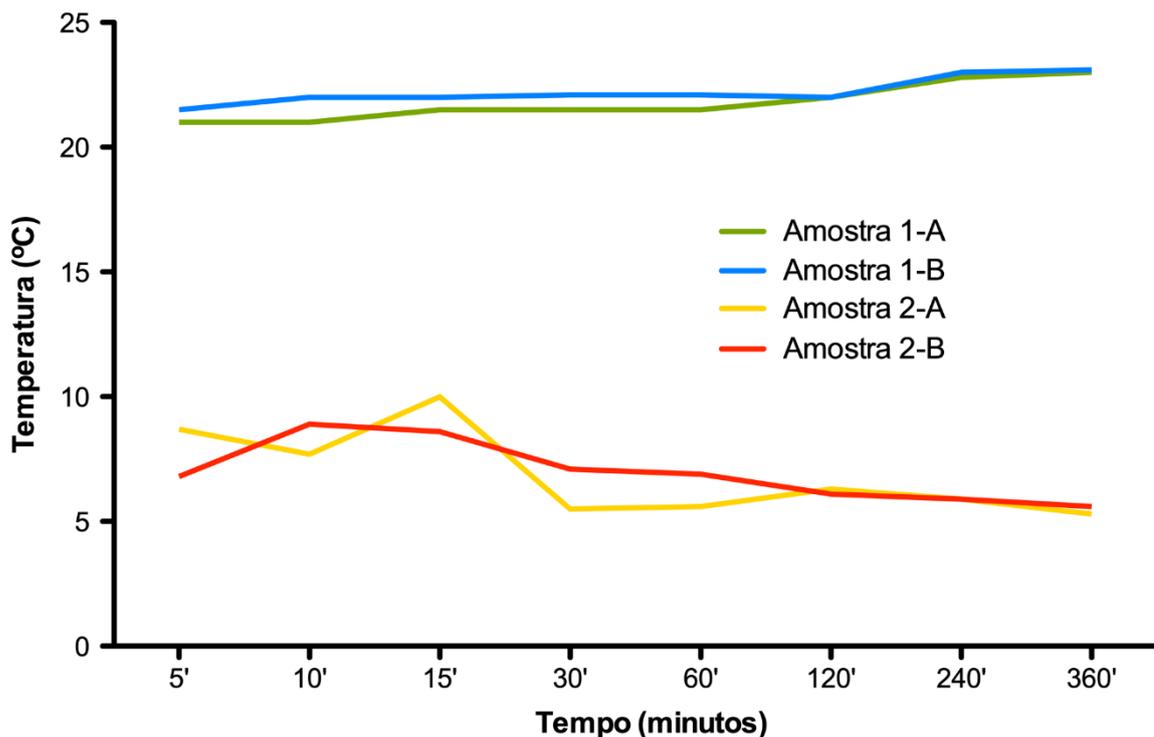
### 3 RESULTADOS

Conforme descrito na seção material e método, os resultados do presente estudo serão apresentados divididos de acordo com o experimento realizado e, portanto, em 3 sessões.

#### 3.1 EXPERIMENTO 1

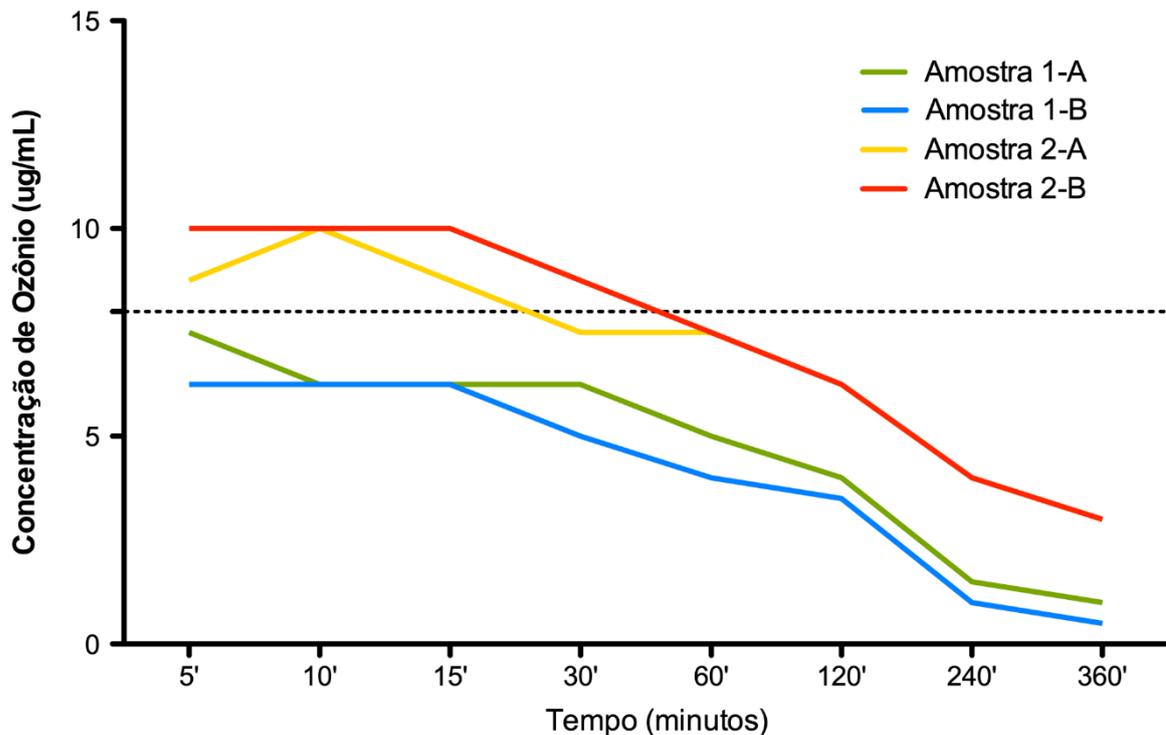
O experimento 1 objetivou avaliar a influência da temperatura da água sobre a ozonização em diferentes cenários. A figura 3 ilustra a variação da temperatura nos ambientes em que a água foi mantida em temperatura ambiente (amostras 1-A e 1B) e refrigerada em geladeira (amostras 2-A e 2-B). Observou-se uma diferença na temperatura quando foram comparados os 2 cenários, com maiores temperaturas da água observadas no ambiente climatizado. Para o ambiente climatizado, pouca variação ocorreu na temperatura sendo que esta oscilou entre 21 e 23°C. Já no ambiente em que a água foi refrigerada previamente, essa variação foi maior e oscilou entre 5 e 10°C.

**Figura 3 - Variação da temperatura dos ambientes de acordo com os diferentes períodos de tempo e amostras avaliados.**



O resultado mais importante deste experimento é demonstrado na Figura 4. Nota-se que para que o ozônio seja considerado viável e com suas propriedades mantidas, o mesmo deve apresentar concentração igual ou superior a  $8\mu\text{g/mL}$  (NOGALES, 2014). Nesse sentido, observou-se uma influência bastante grande da temperatura do ambiente sobre a concentração de ozônio na água. No grupo em que a água foi mantida em geladeira, observou-se a manutenção da viabilidade por aproximadamente 30 minutos. Já no grupo em que a água foi mantida em temperatura ambiente, a concentração de ozônio não atingiu os valores mínimos necessários para apresentar eficácia clínica desde o início do período experimental.

**Figura 4 - Concentração de  $\text{O}_3$  por amostra de acordo com os diferentes tempos e ambientes avaliados.**



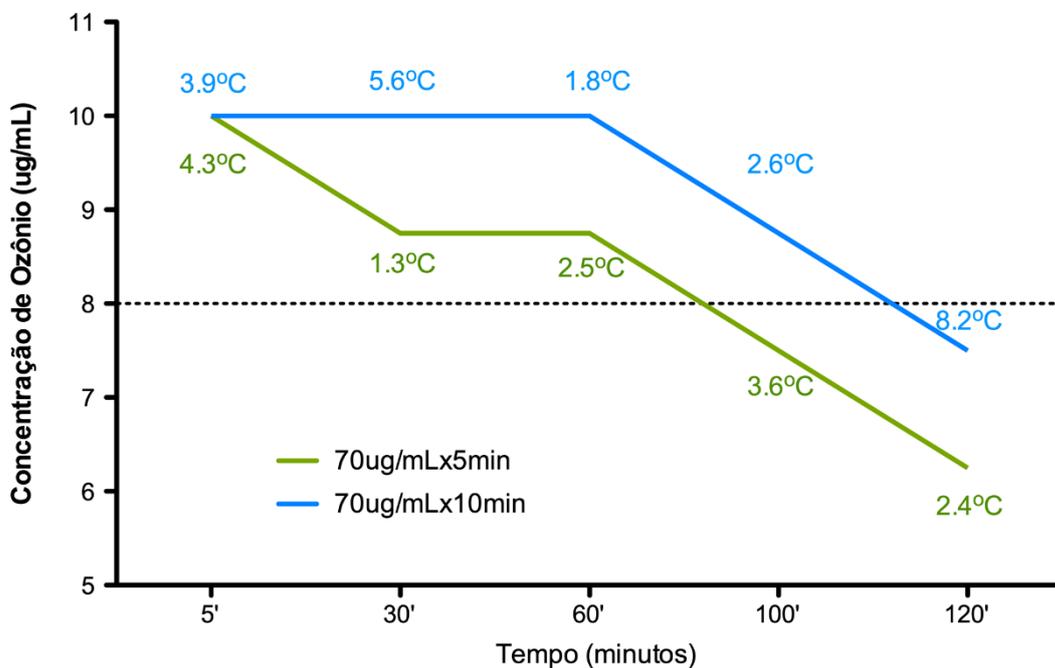
Linha pontilhada indica a concentração de ozônio viável para uso clínico

### 3.2 EXPERIMENTO 2

O experimento 2 teve como proposição avaliar a influência do aumento do tempo de ozonização e a quantidade de ozônio aplicada durante o preparo da água. Nesse sentido, e com base nos achados do experimento 1 optou-se por aumentar a

quantidade de ozônio injetada na água para  $70\mu\text{g/mL}$  ao invés de  $55\mu\text{g/mL}$ , sendo o tempo de ozonização da água a variável em estudo. A Figura 5 ilustra a comparação da ozonização da água de  $70\mu\text{g/mL}$  em 5 e 10 minutos, bem como a temperatura em cada uma das amostras. Considerando estas quantidades e tempos de injeção de ozônio, as concentrações iniciais observadas na água foram de  $10\mu\text{g/mL}$  para ambas amostras.

**Figura 5 - Concentração de  $\text{O}_3$  ao longo do tempo de acordo com os diferentes períodos de ozonização e temperaturas do refrigerador.**



Linha pontilhada indica a concentração de ozônio viável.

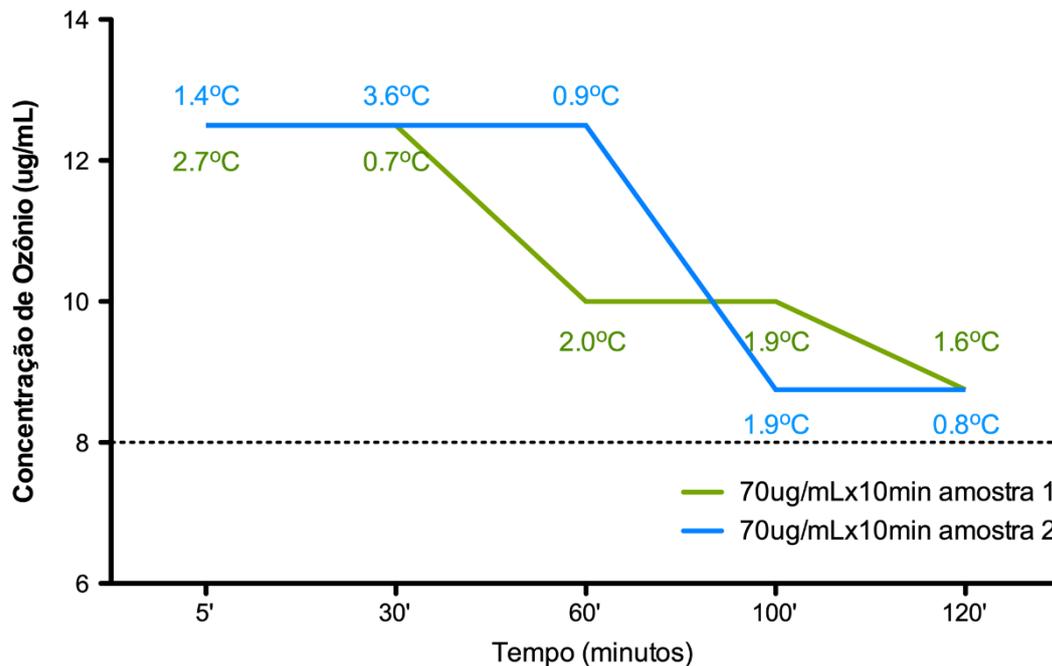
Valores acima de cada linha representam a temperatura do refrigerador nos respectivos períodos experimentais.

Observou-se um aumento do tempo de viabilidade da água ozonizada à medida que o tempo de ozonização aumentou. Na amostra em que a água foi ozonizada por um tempo maior, observou-se uma viabilidade da água após 100 minutos enquanto na amostra com tempo de ozonização de 5 minutos isso não ocorreu. Entretanto após 120 minutos ambas amostras mostraram concentrações de ozônio inviáveis para utilização clínica, perdendo, portanto, suas propriedades antimicrobianas. Observa-se nesse experimento uma temperatura do refrigerador variando entre  $1,3$  e  $8,2^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 EXPERIMENTO 3

O experimento 3 objetivou avaliar a concentração de ozônio a  $70\mu\text{g/mL}$  durante 10 minutos em água com temperatura ainda inferior à do experimento 2. A figura 6 ilustra a concentração de ozônio mensurada quando a água foi ozonizada a  $70\mu\text{g/mL}$  durante 10 minutos. Nesse experimento, atentou-se para manter o refrigerador em temperaturas ainda menores e que variaram entre  $0,7$  e  $3,6^\circ\text{C}$ . Considerando estas quantidades e tempo de injeção de ozônio, as concentrações iniciais observadas na água foram de  $12,5\mu\text{g/mL}$  para ambas amostras. Os resultados observados evidenciam que quando a temperatura é mantida nesse patamar a viabilidade da água ozonizada mantém-se mesmo após 120 minutos de ozonização.

**Figura 6 - Concentração de  $\text{O}_3$  ao longo do tempo e temperatura do refrigerador em cada amostra ozonizada a  $70\mu\text{g/mL}\times 10\text{min}$ .**



Linha pontilhada indica a concentração de ozônio viável.

Valores acima de cada linha representam a temperatura do refrigerador nos respectivos períodos experimentais.

## 4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência de diferentes temperaturas e tempo decorrido após ozonização de água sobre a concentração de ozônio na mesma. Além disso, foi verificada a influência do tempo de ozonização sobre a concentração desse gás em meio aquoso.

A ozonioterapia tem sido utilizada crescentemente na Odontologia como terapia que tem por objetivo atuar como adjuvante no tratamento de diversas doenças crônicas e agudas. O emprego de ozônio nessa área se mostra interessante uma vez que o custo para sua obtenção em meio aquoso é baixo e pelo fato de que nas doses utilizadas em odontologia, que são bastante baixas, atua de forma biologicamente compatível sem causar danos aos tecidos (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Há relatos do emprego do ozônio em odontologia para desinfecção de canais radiculares, tratamento de lesões cariosas, como adjuvante a terapia periodontal e peri-implantar, como meio auxiliar em cicatrização de tecidos moles e ação sobre infecções fúngicas (EL HADARY *et al.*, 2011; HUTH *et al.*, 2009; MAKEEVA *et al.*, 2017; NOITES *et al.*, 2014). Entretanto, a literatura que suporta os diferentes usos possíveis da ozonioterapia na prática odontológica é escassa e com limitada qualidade (AZARPAZHOOH; LIMEBACK, 2007).

Até o momento, estudos que avaliaram a ozonioterapia na Odontologia demonstram certo potencial. Por exemplo, Makeeva *et al.* (2017) mostraram em seus estudos que a quantidade de bactérias em lesões radiculares reduz com o emprego da ozonioterapia. Além disso, a água ozonizada apresenta propriedades bactericidas interessantes sobre a parede celular de bactérias que compõe o biofilme dentário, além de propriedades antimicrobianas capazes de reduzir significativamente microrganismos presentes nos tecidos da região radicular (NAGAYOSHI *et al.*, 2009). Também o estudo de Sivalingam *et al.* (2016) verificou que a aplicação tópica de água e óleo sobre a superfície de úlceras aftosas, herpes labial e infecções gengivais acelera o processo de cicatrização dos tecidos, podendo também ser útil no tratamento de alveolite e na diminuição do tempo de cicatrização pós-exodontia. Estudos mostram que o ozônio é capaz de reduzir substancialmente bactérias envolvidas nos processos de agressão periodontal como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Parvimonas micra* quando comparado ao tratamento padrão ouro utilizando de digluconato de clorexidina 2% (HUTH *et al.*, 2011).

Buscas sistematizadas na literatura apontam para um número limitado de estudos, cujas metodologias são bastante heterogêneas e pouco detalhadas. Nesse sentido, aqueles que lançam mão da ozonioterapia em odontologia fazem-no estritamente seguindo informações anedóticas ou de material de propaganda ou, ainda, unicamente a partir de recomendação dos fabricantes.

A questão de pesquisa envolvida neste trabalho vincula-se ao fato de que um agente para uso em pacientes necessita, além de eficácia, ser de fácil utilização. A informação a respeito de estabilidade das concentrações residuais de ozônio em água bidestilada ozonizada é de até 10 horas (HAENSLER, 2013). Todavia, manter a água ozonizada em concentrações de O<sub>3</sub> suficientemente adequadas para que a mesma seja capaz de exercer propriedades antimicrobianas é algo desafiador, uma vez que a quantidade de ozônio presente após 24 horas já é insuficiente para exercer um papel terapêutico antimicrobiano (WFOT Scientific Advisory Committee, 2015). Neste estudo, o tempo máximo de estabilidade da água ozonizada em concentração capaz de exercer ação antimicrobiana foi de 2 horas quando mantida sob o regime de refrigeração e ozonizada em 70µg/mL durante 10 minutos. Esse tempo é bastante restrito, especialmente porque a utilização do ozônio fica limitada para uso em consultório ou em locais onde seja possível ozonizar a água. Assim, este estudo procurou verificar a influência da temperatura da água e do ambiente na estabilidade de concentração de ozônio.

No que se refere a manutenção de concentrações de ozônio, também foi objeto de teste neste estudo a possibilidade de aumentar o tempo de ozonização da água, uma vez que na literatura os protocolos de tempo de ozonização variam de 5 a 15 minutos (AZUMA *et al.*, 2014). Em dois dos experimentos, a concentração utilizada para ozonização da água no aparelho foi de 70µg/mL, durante 10 minutos. Como resultado, verificou-se que o incremento de tempo tem impacto na concentração. Assim, recomenda-se que esse artifício seja utilizado.

Estudos em que a água ozonizada é utilizada como monoterapia ou como adjuvante a determinado tratamento carecem de informações referentes a sua obtenção. Diante das diversas variáveis que a estabilidade da água é dependente para apresentar propriedades requeridas, o preparo da água ozonizada deve ser realizado de forma padronizada. Fatores que devem ser levados em conta são a temperatura, local de armazenamento da água, pH e composição da água (DI BERNARDO; DANTAS; VOLTAN, 2017; HAENSLER, 2013).

A água utilizada para ozonização deve ser a mais pura possível, visto que o ozônio é altamente reativo, ao entrar em contato com impurezas presentes em água da torneira ou até mesmo água destilada, poderá ter sua desintegração antecipada (BOCCI, 2005; RE *et al.*, 2008). Viebahn-Haensler (2013) avaliou a decomposição do ozônio em três diferentes águas: água bidestilada, água destilada e água deionizada. Como resultados, verificou que a água bidestilada apresenta maior tempo de meia vida quando comparada as águas destilada e deionizada; por esse motivo, a água bidestilada foi a empregada nesse estudo para obtenção da água ozonizada.

Quando o recipiente de armazenamento do ozônio é levado em consideração, a literatura se refere novamente ao fato de que o ozônio é uma molécula altamente reativa, e por isso a água deve ser armazenada em recipiente que seja resistente a essa reatividade como vidro, silicone ou teflon. Tal fato, foi objeto de preocupação deste estudo à medida que foi utilizado um recipiente de vidro com tampa para armazenamento da após processo de ozonização. Além disso, alguns autores recomendam que o recipiente seja fechado e armazenado em refrigerador (BOCCI, 2005), entrando em outro ponto fundamental para a estabilidade da água ozonizada: a temperatura. Como esse fator foi um ponto em questão desse estudo, a temperatura mostrou ter grande influência na estabilidade da água ozonizada em nosso estudo, ratificando os achados de Viebahn (2013), onde a degradação do ozônio na água bidestilada foi mais rápida a medida que as temperaturas também se mostravam aumentadas quando comparada à baixas temperaturas. Por esse motivo, é correto afirmar que a meia vida do ozônio em água é temperatura-dependente.

O tempo de ozonização da água é outro fator que deve ser levado em conta, o período para saturação da água no processo de ozonização deve ser, no mínimo, 5 minutos (BOCCI, 2005), podendo chegar até 15 minutos de borbulhamento (AZUMA *et al.*, 2014). O presente estudo analisou dois tempos de ozonização e obtivemos resultados satisfatórios no período maior de borbulhamento da água em consonância com estudo realizado por Fagundes (2013).

O ozônio pode ser aplicado topicamente através de três diferentes veículos: gás, óleo e água. O gás é o meio menos utilizado, uma vez que o ozônio sob a forma gasosa se decompõe facilmente em  $O_2$  e que, quando aplicado sob a forma de gás, apresenta maior risco de toxicidade se comparado aos outros dois veículos possíveis. Em relação à estabilidade em água e óleo, o  $O_3$  se mantém estável por mais tempo no último podendo alcançar meses de durabilidade. Todavia, cabe salientar que seu

processo de obtenção é mais sensível e envolve uma série de riscos exigindo, portanto, profissionais treinados em ambientes laboratoriais específicos, o que acaba influenciando no seu custo de obtenção (WFOT Scientific Advisory Committee, 2015). O ozônio sob a forma de água ozonizada é o meio mais empregado na odontologia. Nesse estudo, embora se saiba que a estabilidade do gás em meio aquoso seja intermediária nesse veículo (maior quando comparada à forma gasosa e menor quando comparada ao óleo ozonizado), o seu emprego apresenta vantagens como ótima biocompatibilidade com os tecidos e fácil obtenção, diminuindo seus custos – fatos principais para justificar seu emprego (AZUMA *et al.*, 2014).

Demonstrou-se claramente que a ozonização de água gelada prolonga o tempo de validade do produto. Um procedimento fácil e de baixo custo propicia que a ozonioterapia tenha sua possibilidade de utilização real aumentada. Nesse sentido, enquanto não estiver à disposição do cirurgião-dentista uma alternativa que confira estabilidade maior, este estudo evidencia a necessidade de ozonização de uma água bidestilada, previamente refrigerada e mostra que a manutenção da solução em ambiente com temperatura próxima de 0°C é mandatória.

Por fim, o presente estudo teve por objetivo dar suporte à ozonioterapia no que se refere a garantias da presença do ozônio como agente terapêutico assegurando principalmente suas propriedades antimicrobianas. Outros testes devem ser realizados, uma vez que a utilização da ozonioterapia, ainda que se tenham obtido ganhos importantes na praticidade com os resultados destes experimentos, ainda carece de outras estratégias para aumentar a validade dos produtos. A ampliação da estabilidade permitirá, por exemplo o uso caseiro da ozonioterapia, o que seria potencialmente interessante para o manejo das doenças bucais mais prevalentes caso sua eficácia clínica seja demonstrada.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego do ozônio vem se disseminando como terapia adjuvante no tratamento de doenças crônicas e agudas nas diferentes áreas que compõe a Odontologia. Todavia, a literatura atual sobre o assunto possui deficiências a serem superadas, principalmente no que diz respeito à metodologia utilizada para obtenção do ozônio em veículos e suspensões, a qual apresenta-se bastante heterogênea.

O presente estudo almejou o estabelecimento de um protocolo padrão de água ozonizada que fosse capaz de garantir sua viabilidade terapêutica ao mesmo tempo que não perdesse seu potencial antimicrobiano, uma vez que esse gás é altamente solúvel em água, o que afeta diretamente sua estabilidade neste meio.

Este trabalho demonstrou que quando refrigeramos a água-bidestilada previamente ao processo de ozonização e quando esta, após processo no ozonizador, é mantida em temperaturas mais baixas, sua concentração permanece viável terapeuticamente por um período de tempo maior.

Além disso, os experimentos mostraram que ozonizar a água por mais tempo e utilizando um fluxo maior no aparelho também se mostraram estratégias eficientes para aumentar a sua viabilidade ao longo do tempo.

Para estudos clínicos, o estabelecimento de um protocolo padronizado e bem descrito, o qual seja capaz de manter os níveis de  $O_3$  em concentrações suficientemente capazes de exercer as ações antimicrobianas necessárias para servir como possível adjuvante na terapia periodontal se faz necessário. Através desse trabalho de conclusão de curso, estabeleceu-se que o protocolo padrão a ser utilizado para obtenção da água ozonizada a ser utilizada no ensaio clínico intitulado “Eficácia de bochecho com água ozonizada sobre a formação do biofilme bacteriano bucal e inflamação gengival: um ensaio clínico randomizado cruzado” utilizará o fluxo no aparelho em  $70\mu\text{g/mL}$  de  $O_3$  durante um período de ozonização por 10 minutos.

Por fim, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de alcançar estratégias capazes de garantir a concentração do ozônio em níveis suficientes para sua utilização antimicrobiana ao longo do tempo, uma vez que tal fato seria um ganho importante para ampliar seu uso para além do consultório odontológico.

## REFERÊNCIAS

- AHU, U. *et al.* Ozone application as adjunctive therapy in chronic periodontitis: Clinical, microbiological and biochemical aspects. **Journal of dental sciences**. Taipei, v. 14, n. 1, p. 27-37, Mar. 2018
- AL-DALAIN, S. M. *et al.* Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. **Pharmacological Research**, London, v. 44, n. 5, Sept. 2001
- ANTUNES, F.; CADENAS, E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 475, n. 2, p. 121-126, June 2000
- ARIAS-VÁZQUEZ, P. I. *et al.* Eficacia de las infiltraciones con ozono en el tratamiento de la osteoartritis de rodilla vs. otros tratamientos intervencionistas: revisión sistemática de ensayos clínicos. **Rehabilitación**. Madrid, v. 53, n. 1, p. 43-55, ene./mar. 2019
- ARITA, M. *et al.* Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. **Oral microbiology and immunology**. Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 206-10, Aug. 2005
- AZARPAZHOOH, A.; LIMEBACK, H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. **Journal of dentistry**. Kidlington, v. 36, n. 2, p. 104-16, Dec. 2007
- BRASIL. Resolução 2.181 do Conselho Federal de Medicina, de 20 de Abril de 2018. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, ano 106, nº 131, 10 de julho de 2018. Seção I, p. 1.
- BOCCI, V. **Ozone: a new medical drug**. Dordrecht: Springer, 2005.
- BOCCI, V. A. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of the ozonotherapy today. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, Chieti, v. 10, n. 2-3, p. 31-53, Apr./Sept. 1996
- BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. **Archives of Medical Research**. New York, v. 37, n. 4, p. 425-435, May 2006
- BOCCI, V. A. *et al.* Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**. Milan, v. 12, n. 3, p. 67-75, July/Sept. 1998
- BURGASSI, S. *et al.* How much ozone bactericidal activity is compromised by plasma components?, **Journal of Applied Microbiology**, England, v. 106, n. 5, p. 1715-21, May 2009

CARDILE, V. *et al.* Effects of ozone on some biological activities of cells in vitro. **Cell Biology and Toxicology**, Princeton, v. 11, n. 1, p. 11-21, Feb. 1995

CARDOSO, M. G. *et al.* Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**. St. Louis, v. 105, n. 3, p. 85-91, May 2008

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B.; VOLTAN, P. E. N. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 3ª ed. São Carlos: LDiBe Editora, 2017.

DIAZ-LLERA, S. *et al.* Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 517, n. 1-2, p. 13-20, May 2002

DING, W. *et al.* Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. **Water Research**, London, v. 160, p. 339-349, Sept. 2019

DODWAD, V. *et al.* Changing paradigm in pocket therapy- ozone vs conventional irrigation. **International Journal of Public Health Dentistry**. Udaipur, v. 2, n. 2, p. 7-12, 2011

EL HADARY, A. A. *et al.* Evaluation of the effect of ozonated plant oils on the quality of osseointegration of dental implants under the influence of Cyclosporin A an in vivo study. **The Journal of oral implantology**. Abington, v. 37, n. 2, p. 247–257, Jun. 2011

FAGUNDES, C. **Estudo de cobertura comestível com propriedades antifúngicas e atmosfera modificada na manutenção da qualidade de tomate cereja (*lycopersicon esculentum* var. *Cerasiforme*)**. 2013. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FERREIRA, S. *et al.* Ozonioterapia no controle da infecção em cirurgia oral. **Revista Odontológica de Araçatuba**, Araçatuba, v. 34, n. 1, p. 36-38, jan./jun. 2013.

GALLO, J. H. da S. Cautela no uso da Ozonioterapia. Portal CFM, 2019. Disponível em:  
[https://portal.cfm.org.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=27916:cautela-no-uso-da-ozonioterapia&catid=46:artigos&Itemid=18\\_](https://portal.cfm.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=27916:cautela-no-uso-da-ozonioterapia&catid=46:artigos&Itemid=18_). Acesso em: 15 maio 2019.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Aging**, Auckland, v. 18, n. 9, p. 685-716, Sept. 2001

HAENSLER, R. V. El uso del ozono en medicina. Disponível em:  
[http://www.mundialsiglo21.com/novedades/2013jul\\_ozono\\_medicina.pdf](http://www.mundialsiglo21.com/novedades/2013jul_ozono_medicina.pdf). Acesso em 14 jun. 2019.

HUTH, K. C. *et al.* Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. **European journal of oral sciences**. Copenhagen. v. 114, n. 5, p. 435-440, Oct. 2006

HUTH, K. C. *et al.* Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. **International endodontic journal**. Oxford, v. 42, n. 1, p. 3-13, Jan. 2009

HUTH, K. C. *et al.* Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. **European journal of oral sciences**. Copenhagen. v. 119, n. 3, p. 204-10, June 2011

IZADI, M. *et al.* Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. **Diabetes & metabolic syndrome**. Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 822-825, Jan./Feb. 2019

KSHITISH D.; LAXMAN V. K. The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: a clinical and microbiologic study. **Indian journal of dental research**. Ahmedabad, v. 21, n. 3, p. 341-8, July/Sept. 2010

MAKEEVA, I. M. *et al.* Assessment of antibacterial efficacy of ozone therapy in treatment of caries at the white spot stage. **Stomatologiia**. Moscow, v. 96, n. 4, p. 7-10, 2017

MARIÑO, R. Q; SCWHARTZ, A. Ozonioterapia y legislación Análisis para su regulación. **Revista Española de Ozonoterapia**. Madrid, v. 2, n. 1, p. 5-49, agosto 2012

MULLER, N. J. *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**. London, v. 84, n. 4, p. 407-12, Apr. 1993

NAGAYOSHI, M. *et al.* Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. **Oral microbiology and immunology**. Copenhagen, v. 19, n. 4, p. 240-6, Aug. 2009

NOGALES, C. G. *et al.* Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis* – in vitro study. **Revista Española de Ozonoterapia**. Madrid, v. 4, n. 1, p. 9-15, 2014

NOITES, R. *et al.* Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. **BioMed research international**. New York, v. 2014, p. 1-11, May 2014

OLIVEIRA, L. E. A. *et al.* Ozonioterapia e Odontologia: Novas Perspectivas. Disponível em: <https://www.doity.com.br/media/doity/submissoes/artigo-f99572e32fe1ac268884fb7b6bc43a2600e98489-arquivo.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2019

OZONIZE-SE: O que é ozonioterapia? **Site da Associação Brasileira de Ozonioterapia**, 2019. Disponível em: <https://www.aboz.org.br/ozonize-se/> Acesso em: 29 maio 2019.

RE *et al.* Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. **Archives of medical research**. Cidade do Mexico, v. 39, n.1, p. 17-26, Jan. 2008

Resolução do CFM que define ozonioterapia como prática experimental no País é publicada no Diário Oficial. **Portal CFM**, 2018. Disponível em: [https://portal.cfm.org.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=27716:2018-07-09-15-34-31&catid=3/](https://portal.cfm.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=27716:2018-07-09-15-34-31&catid=3/). Acesso em: 12 maio 2019.

SIVALINGAM, V. P. *et al.* Does topical ozone therapy improve patient comfort after surgical removal of impacted mandibular third molar? A randomized controlled trial. **Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**. Philadelphia, v. 75, p. 51.e1–51.e9, Sept. 2016

SMITH, N. L. *et al.* Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical gas research**. London, v. 7, n. 3, Oct. 2017

STADLBAUER, T. H. *et al.* Preconditioning with ozone abrogates acute rejection and prolongs cardiac allograft survival in rats. **Transplantation proceedings**. New York, v. 40, n. 4, p. 974-77, May 2008

STOKER, G. *et al.* The Surgical uses of Ozone. **The Lancet**. London, v. 26, p. 797, May 1917.

TASDEMIR, Z. *et al.* The effects of ozone therapy on periodontal therapy: A randomized placebo-controlled clinical trial. **Oral diseases**. Copenhagen, v. 25, n. 4, p. 1195-1202, May 2019

WALKER, J. T. *et al.* Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. **Applied and environmental microbiology**. Washington, v. 69, n. 6, p. 3327-32, June 2003

WFOT Scientific Advisory Committee 2015. **WFOT's Review on Evidence Based Ozone Therapy**. Disponível em: <<https://www.wfoot.org/wp-content/uploads/2016/01/WFOT-OZONE-2015-ENG.pdf/>>. Acesso em: 09 maio 2019.

Yu, H. *et al.* Efficacy and safety of Ozone Therapy for patients with chronic hepatitis B: A multicenter, randomized clinical trial. **Journal of Ozone Therapy**. Valence, v. 2, n. 2, 2018.