

MARIANA LAGE-MARQUES

Estudo da ozonioterapia como contribuição  
para a Odontologia Veterinária

SÃO PAULO

2008

MARIANA LAGE-MARQUES

# Estudo da ozonioterapia como contribuição para a Odontologia Veterinária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

**Departamento:**

Cirurgia

**Área de Concentração:**

Clínica Cirúrgica Veterinária

**Orientador**

Prof. Dr. Marco Antônio Gioso

SÃO PAULO  
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2093  
FMVZ

Lage-Marques, Mariana

Estudo da ozonioterapia como contribuição para a odontologia veterinária / Mariana Lage-Marques. – São Paulo : M. Lage-Marques, 2008. 65 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.  
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Gioso.

1. Ozônio. 2. Ozonioterapia. 3. Antimicrobiano. 4. Imunomodulação.  
5. Odontologia veterinária. I. Título.

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LAGE-MARQUES, Mariana

Título: Estudo da ozonioterapia como contribuição para a Odontologia Veterinária

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

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

## **AGRADECIMENTOS**

Deus, meu grande guia. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

Minha Mãe, Heloisa de Carvalho Pinto Lage-Marques, parceira e grande amiga fiel e companheira. Enche-me de forças diariamente.

José Luiz Lage-Marques, pai e exemplo de profissional. Se entregou à profissão e a sua grande missão: educar. Meu sempre e grande exemplo de vida, de honestidade, guerreiro, amigo.

Maria Isabel, minha irmã, amiga nas horas de aperto, distante e presente ao mesmo tempo.

Pedro, meu irmão querido, maduro, honesto, fiel, carinhoso e companheiro,  
meu grande orgulho.

José Manuel Pedreira Mouriño, meu companheiro. Obrigada pela paciência.

Waldemar Lage Marques e Julieta Lage Marques (*in memorian*), Vera Gomes  
de Carvalho Pinto e Júlio de Carvalho Pinto (*in memorian*)

Ao meu grande colega e amigo Marco Antônio León-Roman que me ensinou  
a Odontologia Veterinária. Sempre do meu lado, motivando e ao mesmo  
tempo fazendo chorar. Agradeço por isso.

Aos companheiros de pós-graduação: Fernanda Maria Lopes, Fernanda A. Hofmann, Jonathan Ferreira, Sérgio Camargo, Vanessa G. G. Carvalho, Roberto S. Fecchio, Samira Abdalla e Lenin Arturo V. Martínez. Sem vocês não teria terminado este trabalho. A ajuda de vocês foi fundamental, desde sempre, até o final do trabalho.

Ao amigos do ODONTOVET Daniel G. Ferro, Michelle A. F. A. Venturini e Herbert L. Corrêa, por todo o apoio desde a minha época de estagiária até hoje.

Carlos Góes Nogales, parceiro na Ozonioterapia, que ajudou com o desenvolvimento deste trabalho.

Leandro Spett, grande amigo que ajudou com o esquema da ação do ozônio na célula.

José Mirón Oliveira da Silva, querido funcionário da FMVZ-USP, exemplo de profissional sempre sorridente, prestativo e atencioso. Não me lembro quando foi negou algum pedido.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Prof. Dr. Marco Antônio Gioso, meu mestre na vida e na Odontologia Veterinária. Exemplo de profissional, líder e amigo. Desde o meu primeiro contato com o Laboratório de Odontologia Comparada da FMVZ-USP soube me motivar a trabalhar pela nossa profissão. Obrigada pelo voto de confiança e todas as oportunidades oferecidas.

## RESUMO

LAGE-MARQUES, M. **Estudo da ozonioterapia como contribuição para a Odontologia Veterinária.** [*Ozone therapy, contributions for Veterinary Dentistry*]. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.

O ozônio, forma triatômica do oxigênio, tem sido amplamente estudado ao longo dos anos. Sua aplicação destaca-se devido ao seu alto poder oxidativo na ação contra bactérias, fungos, protozoários e vírus. A alta instabilidade faz com que o gás transforme-se em oxigênio após determinado tempo, não liberando resíduos no ambiente. Também tem sua aplicação estudada de forma a aprimorar o sistema circulatório, produzindo aumento na oxigenação tecidual, estimulando a produção de antioxidantes endógenos e causando efeito imunomodulador (com a estimulação da liberação de citocinas). Foi o objetivo deste trabalho a organização das informações sobre o ozônio empregado na Medicina Veterinária e Odontologia Humana, principalmente suas aplicações como antimicrobiano, para esclarecer a importância de suas utilizações e fornecer subsídios para que a ozonioterapia possa ser utilizada na Odontologia Veterinária. Assim, com base na literatura, foi possível concluir que a ozonioterapia constitui proposta coadjuvante promissora diante da necessidade do controle da infecção, além da ação imunomoduladora que pode ser empregada nas mais variadas situações da prática clínica.

Palavras-chave: Ozônio. Ozonioterapia. Antimicrobiano. Imunomodulação. Odontologia Veterinária.

## ABSTRACT

LAGE-MARQUES, M. *Ozone therapy, contributions for Veterinary Dentistry*. [Estudo da ozonioterapia como contribuição para a Odontologia Veterinária]. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Ozone, the triatomic form of oxygen, has been widely studied over the years. With a very oxidative potential, acts against bacteria, fungi, protozoa and viruses. The high instability, after a few minutes makes it return to the oxygen form. This is important because of the non residual effect on the environment. The ozone has also an immune modulating effect, stimulating the release of endogenous antioxidants and acts in the circulation system inducing to an increase on oxygen tissue levels. This research aimed to gather information about ozone, particularly the antimicrobial effect, raising the importance of the applications, aiming a possible use of the ozone in Veterinary Dentistry. Therefore, it is possible to conclude that the ozone therapy can be an important adjuvant to infectious diseases control, and can be used in different types of clinical applications.

Key words: Ozone. Ozone therapy. Antimicrobial. Immune modulation. Veterinary Dentistry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema de um sistema de geração de ozônio, a partir do ar comprimido que demonstra a filtração, compressão, resfriamento e desumidificação o qual o ar precisa sofrer para geração do ozônio.....23
- Figura 2 - Esquema que demonstra a ação do ozônio no metabolismo das hemácias.....26

## ABREVIATURAS E SIGLAS

O <sub>3</sub>	Ozônio
Km	Quilômetro
UV-A	Raio ultravioleta tipo A
UV-B	Raio ultravioleta tipo B
UV-C	Raio ultravioleta tipo C
Vitamina D	Calciferol
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O	Oxigênio atômico
CFC	Clorofluorcarbono
mg/dl	Miligrama por decilitro
dl	Decilitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ppmv	Partes por milhão por volume
µg/ml	Micrograma por mililitro
ERO	Espécies reativas do oxigênio

$O_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$OH^{\cdot}$	Radical Hidroxila
$^1O_2$	Oxigênio singleto
DNA	Ácido desoxirribonucléico

mg/kg	miligrama por quilograma
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
SOD	Superóxido desmutase
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
GSH-Rd	Glutathiona redutase
GSSH	Glutathiona oxidada
GSH	Glutathiona reduzida
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzido
G6PD	Glicose 6- fosfato desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
2,3 DPG	2,3 difosfoglicerato
IκB	Enzima inibidora da NFκB
NFκB	Fator de transcrição
TNF	Fator de necrose tumoral
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleucina

TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento
HSP	Proteína cognata
M	Concentração molar ou molaridade
Na/K-ATPase	Na/K-ATPase
O3-AHT	Autohemoterapia maior
PDT	Terapia fotodinâmica
Min	minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
HOCL	Ácido hipocloroso

## SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\mu$	Mi
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
%	Porcentagem
$\kappa$	Kappa
x	vezes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 HISTÓRIA DO OZÔNIO NAS CIÊNCIAS DA SAÚDE .....	21
2.1.1 <b>Produção comercial do ozônio médico</b> .....	22
2.2 UMA SUBSTÂNCIA OXIDANTE IMUNOMODULADORA .....	24
2.3 MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANO .....	29
2.4 FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO .....	30
2.4.1 <b>Autohemoterapia maior (O<sub>3</sub>-AHT)</b> .....	30
2.4.2 <b>Autohemoterapia menor</b> .....	31
2.4.3 <b>Insuflação retal</b> .....	32
2.4.5 <b>Intra-articular ou em disco intervertebral</b> .....	33
2.4.6 <b>Ação antimicrobiana do ozônio sob a forma de gás</b> .....	34
2.4.7 <b>Água ozonizada</b> .....	35
2.4.8 <b>Óleo ozonizado</b> .....	38
2.4.9 <b>Na Medicina Veterinária</b> .....	39
2.5 EFEITO CITOTÓXICO .....	39
2.6 CONTRA-INDICAÇÕES .....	40
<b>3 DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57

# ***Introdução***

## 1 INTRODUÇÃO

A evolução das pesquisas voltadas à aplicação do ozônio sob a forma medicinal tem aumentado de forma significativa. Os conhecimentos adquiridos *in vitro* ou *in vivo* têm sido desenvolvidos pela Medicina, Odontologia e Veterinária e permitem novas descobertas, além das já utilizadas amplamente, como no tratamento de água.

Sua utilização de forma segura em organismos vivos tem sido a ação descrita sobre bactérias, fungos, protozoários e vírus. Age nos constituintes da membrana citoplasmática reagindo com os ácidos graxos poliinsaturados, inibindo e bloqueando o sistema de controle enzimático, com isso causa alteração da permeabilidade e a lise celular (WICKRAMANAYAKE et al., 1984).

O ozônio possui também ação imunomoduladora quando aplicado sob a forma sistêmica. De acordo com a dose, é capaz de aumentar a produção de antioxidantes endógenos e liberar substâncias que atuam como mensageiras para sistema imune (BOCCI, 1996).

Tendo por objetivo a utilização do ozônio pela Odontologia Veterinária, foi realizada uma revisão de literatura para que possam ser analisadas as formas de aplicação que mais se enquadram para as dificuldades encontradas nesta área, mais especificamente para doenças em que estão envolvidas bactérias. Destaca-se a doença periodontal, que acomete 80% dos animais domésticos, considerada uma doença infecciosa e inflamatória comum que está relacionada à destruição do tecido ao redor do dente (gingiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar) em resposta ao processo inflamatório provocado principalmente por bactérias (HARVEY et al., 1995).

Debowes et al., em 1996 demonstraram uma correlação positiva entre a severidade da doença periodontal e lesões histológicas em rins, fígado e miocárdio. A exposição crônica do organismo aos causadores da doença periodontal resulta em resposta imunológica ou não. Ainda segundo estes autores, as citocinas e outros mediadores inflamatórios que induzem gengivite e periodontite promovem destruição tecidual que pode atingir níveis sistêmicos afetando o tecido cardiovascular e placenta.

A doença quando estabelecida apresenta microorganismos “chave”. Na região subgingival de cães com gengivite, dos aeróbicos gram-positivos mais encontrados foram o *Staphylococcus* e *Streptococcus spp.* (HARVEY et al., 1995; LIPPOLIS et al., 2004), *Pasteurela multocida*, *Escherichia coli* e *Fusobacterium russi* (ELLIOTT et al., 2005). Os anaeróbios obrigatórios descritos como mais encontrados foram os *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* e *Prevotella*. A *Porphyromonas* aparece sob a forma de catalase-positiva (HARVEY et al., 1995; RADICE et al., 2006).

Não foram encontrados relatos do uso da ozonioterapia na Odontologia Veterinária, e para a sua utilização faz se necessário uma ordenação dos dados já publicados, principalmente no que diz respeito à maneira pela qual o ozônio atua (mecanismo de ação) e sobre quais microrganismos, em particular, os que estão presentes na cavidade oral.

# ***Revisão de Literatura***

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O ozônio é uma variedade alotrópica do oxigênio ( $O_3$ ), que se forma na alta atmosfera, naturalmente, por reações fotoquímicas. Serve de filtro contra as radiações ultravioleta emitidas pelo sol quando à 25 km de altitude (UV-A, UV-B e UV-C). Os raios UV-A auxiliam na síntese da vitamina D no organismo, UV-C são absorvidos pela própria atmosfera, não provocando grandes problemas. Já o UV-B é nocivo à saúde, com grande potencial carcinogênico. Os raios ultravioletas atuam como uma descarga elétrica quebrando a ligação do  $O_2$ , transformando-o em oxigênio atômico (O), formando o ozônio no meio ambiente, o que promove a coloração azulada do céu. O ozônio no meio ambiente apresenta a principal função de proteger o ecossistema contra esses raios ultravioletas. Substâncias como o clorofluorcarbono (CFC), subproduto do cloro, destroem a camada de ozônio e como consequência acarreta no efeito estufa. O CFC sobe para a alta atmosfera e reage com os raios ultravioletas liberando cloro. O cloro que com densidade alta, desce passando pela a camada de ozônio, reage produzindo óxidos de cloro e oxigênio (BOCCI, 1996).

Possui a capacidade de oxidar componentes orgânicos e inorgânicos e age como precipitante de metais pesados, através da formação das espécies reativas do oxigênio (GLAZE, 1986). O ozônio, após ter a sua estrutura química descoberta, passou a ser produzido com finalidade de desinfecção de água; com o tempo possibilitou com que outras funções também lhe fossem atribuídas como a utilização médica. É considerado o segundo elemento da natureza com maior poder oxidativo perdendo apenas para o flúor (TORRES et al., 1996).

O gás é incolor, parcialmente solúvel em água, instável e evapora quando na temperatura ambiente. Possui odor facilmente detectado mesmo em concentrações muito baixas (0,01 a 0,05mg/dl). Fatores como temperaturas elevadas, radiação ultravioleta, agentes catalisadores, potencial hidrogeniônico (pH) e força iônica podem acelerar o processo de decomposição do ozônio (LAPOLLI et al., 2003).

Sua característica oxidante é desejável porque reduz a concentração e tempo necessários para a desinfecção, que mesmo em doses baixas mostrou ser efetiva (LAPOLLI et al., 2003).

Atualmente com a preocupação em formação de organoclorados a utilização do ozônio ganhou força, além de evitar gastos excessivos com a cloração da água. Além disso, possui poder de desinfecção 10 vezes maior que o cloro. Por isso são destaques fatores como: a rapidez e eficiência na inativação dos microrganismos, além de baixa toxicidade nos efluentes que sofreram processo de ozonização (LAPOLLI et al., 2003).

## 2.1 HISTÓRIA DO OZÔNIO NAS CIÊNCIAS DA SAÚDE

A história do ozônio iniciou-se em 1834, através do químico alemão Christian Friedrich Schönbein, professor da Universidade de Basel, que reconheceu inicialmente o odor e passou a investigá-lo. Ele percebeu que ao liberar descarga elétrica sobre a água era produzido um odor diferente, nomeado de *ozon*, do grego *ozein*. Foi descrito como uma substância oxidante e também desinfetante. Schönbein também notou que a concentração de ozônio aumentava de acordo com a altitude. Um pouco antes da sua morte em 1867, ironicamente por *Bacillus anthracis*, a fórmula molecular do ozônio foi reportada por Jacques-Louis Soret que deixou claro que era composto de oxigênio (BOCCI, 1996).

O alemão Werner Von Siemens, em seguida, identificou a possibilidade de geração de ozônio a partir do oxigênio e do ar, por intermédio de descargas elétricas. Desenvolveu o primeiro gerador de ozônio capaz de eliminar microorganismos, ressaltando sua alta instabilidade. Em 1889, Marius Paul Otto, na Universidade de Sorbone em Paris, iniciou sua utilização como desinfetante. A partir de 1893, começou a ser aplicado em estações de tratamento de água desencadeando na primeira companhia especializada na construção e na instalação de equipamentos para ozonização no tratamento de água (*Compagnie Provençale de L'Ozone*) (RUBIN, 2001).

Durante a primeira guerra mundial foi utilizado de forma empírica para tratamento de feridas infectadas e gangrenas. Seu efeito antimicrobiano é que estimulou as pesquisas. Hans Wolff foi o primeiro a reportar a possibilidade de expor o sangue a uma mistura de oxigênio e ozônio, criando a técnica que será posteriormente descrita, a autohemoterapia. Junto com Joachim Hänsler fundaram

em 1972 a Sociedade Médica de Ozônio, com o principal objetivo de motivar pesquisas voltadas a esse assunto, tornando a terapia com ozônio mais aceita (BOCCI, 1996).

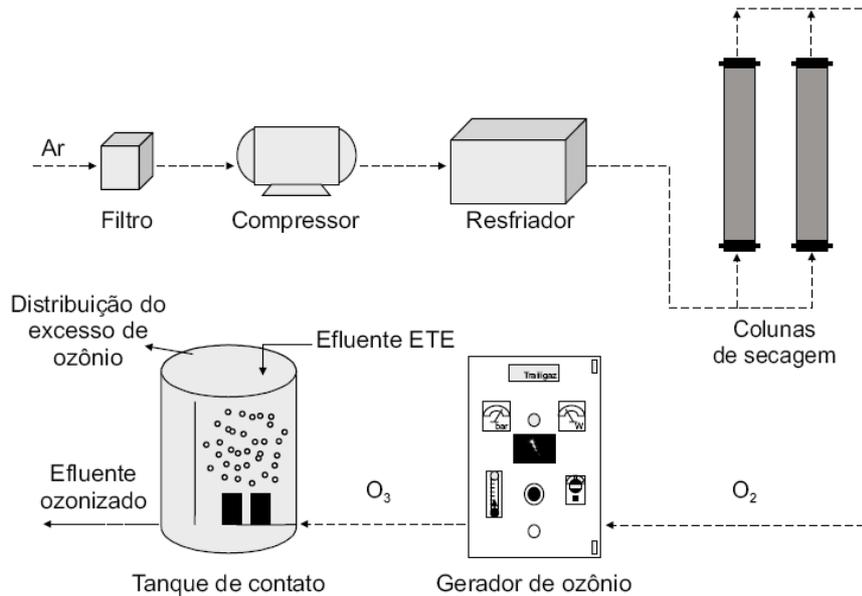
A ozonioterapia é a técnica que emprega ozônio como um agente terapêutico. Atualmente são descritas nas: osteomielites, abscessos, úlceras de decúbito, pé diabético, queimaduras, doenças isquêmicas, degeneração macular relacionada com a idade (forma atrófica), problemas ortopédicos, fibromialgias, tratamento de cáries dentárias, osteonecrose da mandíbula, infecções agudas e crônicas da cavidade oral, hepatites, herpesvírus, papilomavírus, herpeszoster, onicomicose, criptosporidiose, fadiga em pacientes com câncer, doenças auto-imunes (artrites reumatóides, doença de Crohn, psoríases, esclerose múltipla), doença pulmonares, síndrome do estresse respiratório agudo, metástases, sepses e disfunção de vários órgãos (BOCCI, 2005).

Hoje é um dos agentes sanitizantes em mais de 16 países tais como de Cuba, Rússia, Polônia e China, Alemanha e Itália. Cuba possui 39 centros Clínicos de Ozonioterapia. Na Europa atualmente mais de 10.000 médicos utilizam este método. No Brasil sua utilização teve início entre 1975 e 1980 a partir de 2000 ganhou mais adeptos. Em 2004, a cidade de Santo André, em São Paulo, sediou a primeira conferência internacional sobre o uso medicinal do ozônio e em abril de 2006 foi realizado em São Paulo o primeiro Congresso Internacional de Ozonioterapia, onde foi criada a Associação Brasileira de Ozonioterapia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZÔNIOterapia (200-)

### **2.1.1 Produção comercial do ozônio médico**

A forma mais utilizada pelos geradores médicos na produção do ozônio é pela descarga corona. Onde ocorre uma descarga elétrica pela diferença de potencial de dois eletrodos em um fluxo gasoso de oxigênio medicinal. O campo elétrico fornece energia suficiente aos elétrons para que ocorra o rompimento das duplas ligações da molécula de oxigênio ( $O_2$ ), gerando dois átomos isolados. Esses átomos de oxigênio reagem com outra molécula de  $O_2$  formando o  $O_3$ . Quando a produção é feita a partir do ar comprimido, este precisa ser submetido a um pré-tratamento como filtração,

compressão, resfriamento e desumidificação (figura 1). Com a utilização de oxigênio líquido precedido de um evaporador, o custo é reduzido e de fácil manipulação (LAPOLLI et al., 2003).



(Fonte: LAPOLLI et al., 2003)

Figura 1 - Esquema de um sistema de geração de ozônio, a partir do ar comprimido que demonstra a filtração, compressão, resfriamento e desumidificação pelo qual o ar precisa sofrer para geração do ozônio

Após a produção do ozônio e utilização, antes de ser liberado ao meio ambiente, ele deve ser submetido a mecanismos de destruição do gás, que pode ser através de substâncias catalisadoras ou aquecimento, por meio de resistências térmicas.

A concentração do ozônio é medida de formas diferentes nos Estados Unidos e Europa. O que é importante saber é que a conversão segue  $1\text{ppmv} = 0,002\mu\text{g/ml}$  (partes por milhão por volume e microgramas por ml). A Organização Mundial de Saúde permite o trabalho com ozônio por 8 horas com a concentração no ambiente de até  $0,06\text{ppmv}$  ou  $0,12\mu\text{g/ml}$  (BOCCI, 2005). Promove alterações respiratórias decorrentes da liberação de radicais livres e subprodutos da peroxidação lipídica no trato respiratório após a inalação (BOCCI, 2007). O ozônio presente no ar, de forma

elevada induz problemas respiratórios, asma e reduz a função dos pulmões (WHO, 2008).

## 2.2 UMA SUBSTÂNCIA OXIDANTE IMUNOMODULADORA

O ozônio é capaz de induzir a liberação de espécies reativas do oxigênio, que quando em concentrações controladas irá estimular a produção de antioxidantes, além de regular a liberação dos eicosanóides. As ações físicas, químicas e fisiológicas do ozônio estão quase estabelecidas. Sabe-se que o ozônio reage imediatamente com determinado número de moléculas presentes dos fluidos biológicos, chamadas de antioxidantes, proteínas e carboidratos (mais especificamente os ácidos graxos poliinsaturados) (BOCCI, 1996).

Para o melhor conhecimento da ação do ozônio sobre os fluidos celulares e fluidos corpóreos, importa lembrar que a respiração celular está baseada na presença do oxigênio. Isso promove a liberação de espécies reativas do oxigênio (ERO). São consideradas espécies reativas do oxigênio o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ), o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) entre outras. As EROs podem atacar e lesionar várias moléculas biologicamente importantes como proteínas, ácido desoxirribonucléico (DNA) e membranas, induzindo a várias doenças crônicas, câncer e o envelhecimento. O radical hidroxila é um dos componentes mais destrutivos (BOCCI, 1996).

Alguns autores descreveram a aplicação controlada do ozônio como um pré-condicionamento oxidativo que previne o dano hepatocelular mediado por radicais livres. A terapia com ozônio demonstrou preservar a integridade do fígado induzindo enzimas ou ativando caminhos para manter o equilíbrio redox. A dose neste caso utilizada para ratos foi de 1mg/kg e sugerida em humanos 0,25mg/kg. Um alto índice da enzima superóxido desmutase e glutatona, baixo índice de peroxidação e homeostase normal do  $Ca^{2+}$  indicam o sucesso do tratamento (LEÓN et al., 1998).

A ação do ozônio, portanto, implica em dois tipos de processos:

- **Reação inicial com ozônio:** quando o oxigênio é reduzido de forma univalente, deixando um elétron livre em sua órbita externa, o que promove a produção das espécies reativas do oxigênio (ERO), que algumas vezes

constituem os radicais livres, que desencadeiam as reações bioquímicas no sangue (BOCCI, 1996).

- **Peroxidação lipídica:** É o processo pelo qual as EROs atacam os ácidos graxos poliinsaturados, desintegrando as membranas celulares promovendo a perda da permeabilidade. A peroxidação lipídica também gera EROs, mais especificamente o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e uma variedade de aldeídos conhecidos como produtos da peroxidação lipídica, tais como malondialdeído, 4-hidroxinonenal e isoprostanos que são inclusive utilizados para avaliação do estado de estresse oxidativo de um organismo (LIMA e ABDALLA, 2001; NAOUM, 2001).

Al-Dalain et al. (2001) constataram que o uso do ozônio como agente terapêutico, reduziu os danos provocados pelas espécies reativas do oxigênio, e o uso em doses baixas promoveu controle da diabetes e suas conseqüências, como por exemplo, o pé diabético.

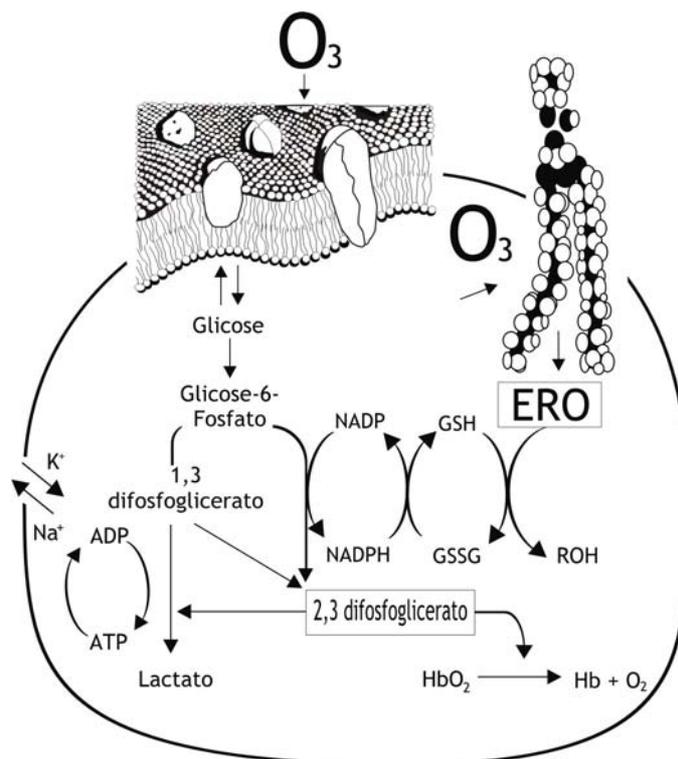
Segundo Alves et al. (2004) a dose de  $50\mu g/kg^{-1}$  aplicada por 10 dias consecutivos, apresentou efeitos benéficos. Neste caso os autores aplicaram ozônio diluído em 500 ml de solução salina, em eqüinos submetidos à síndrome de reperfusão induzida por obstrução vascular de jejuno.

Os antioxidantes são substâncias que bloqueiam o efeito dos radicais livres em um período de meio a um minuto. São classificados em enzimáticos a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase/ redutase, glutaredoxina, tioredoxina e catalase. E a concentração no organismo varia individualmente de acordo com sexo, idade, dieta, época do ano e metabolismo. Os não enzimáticos são algumas vitaminas lipossolúveis, hidrossolúveis, e os oligoelementos (BOCCI, 2005).

Essas duas reações de oxidação e principalmente a liberação do  $H_2O_2$  garantem as propriedades terapêuticas do ozônio. O peróxido de hidrogênio quando em contato com o sangue rapidamente passa para o interior dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas, onde sofre ação destes antioxidantes endógenos e vira água. Por passar para o interior das células, e desencadear reações bioquímicas, torna-se torna o principal mensageiro que ativará a todo o processo (BOCCI et al., 2005).

O efeito do ozônio no sangue (figura 2) é induzir o estresse oxidativo que libera radicais hidroxila. Com o tempo os antioxidantes que já sofreram a oxidação retornam a sua forma reduzida com o auxílio da NADPH (fosfato de dinucleótido de

nicotinamida e adenina). Um exemplo é o que ocorre com a glutatona redutase (GSH-Rd) que utiliza a NADPH para retornar a sua fase de glutatona oxidada (GSSH) para a original (GSH). O NADP utilizado torna-se oxidado e é reduzido pelo ciclo da pentose fosfato, onde a glicose 6-fosfato desidrogenase é a enzima chave. Com isso há um aumento da glicólise com aumento dos níveis de ATP. Os eritrócitos que estiverem em contato com o ozônio, em um curto período de tempo, tornam-se capazes de aumentar a distribuição de oxigênio. Há um aumento da 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) que atua na glicólise anaeróbica, responsável pela dissociação da oxihemoglobina, que promove um aumento da oxigenação tecidual. Como consequência há um aumento da adenosina trifosfato (ATP) também responsável por estabilizar o potencial de membrana celular, e pode ser interpretado como um aumento do metabolismo celular (BOCCI, 2005).



(Adaptado de VIENBAHN-HAESLER, 2003)

Figura 2 - Esquema que demonstra a ação do ozônio no metabolismo das hemácias.

Nos linfócitos o  $H_2O_2$  ativa a tirosina quinase que desprende a I $\kappa$ B, fator de inibição que não permite a ativação da NF $\kappa$ B. Esta é um fator de transcrição, que quando ativada permite a migração para o núcleo resultando na síntese de proteínas. Pode estar envolvida na produção de enzimas, como óxido nítrico sintetase e ciclooxigenase-2, superóxido dismutase, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF), moléculas de superfície-1 de adesão de célula intracelular e E-selectina. Nas plaquetas estimula a liberação de fatores de crescimento e nas células endoteliais aumenta a produção de óxido nítrico (BOCCI, 2005).

Segundo Zamora et al. (2005) o uso do ozônio, como uma adaptação a liberação de radicais livres, pode diminuir a liberação sérica do TNF- $\alpha$ . No modelo experimental de choque séptico induzido em ratos, com a aplicação pela via intraperitoneal, autores indicaram aumento da atividade dos antioxidantes por meio da estimulação hepática, mantém a I $\kappa$ B inibindo a NF- $\kappa$ B, desta forma não ocorre liberação de citocinas e enzimas como o TNF- $\alpha$  e GSH-Px, que estão envolvidas na indução e desenvolvimento do choque séptico.

As espécies reativas do oxigênio também irão resultar na liberação de citocinas, termo genérico para designar as moléculas envolvidas na emissão de sinais entre células durante a resposta imune. Estão entre elas os interferons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ), moléculas importantes na limitação da infecção viral. Produzidos na fase inicial da infecção constituem a primeira linha de resistência a muitas doenças virais. As interleucinas (IL-2, IL-6; IL-8) produzidas principalmente por células T, mas também sintetizadas por macrófagos e células teciduais, atuam em células que possuem receptores específicos para cada uma delas, promovendo entre suas funções: ativação, proliferação, diferenciação e migração celular. Lembrando que durante essa ativação a liberação da interleucina 10 e TGF- $\beta$ 1 coordena esta ação não permitindo que seja exagerada (BOCCI et al., 2005).

Martínez-Sanchez et al. (2005) descreveram que a adaptação ao estresse oxidativo induzida através da aplicação do ozônio via insuflação retal, na diabetes tipo dois, repetidamente em doses não tóxicas aparece controlando a curva glicêmica, normalizando a liberação de peróxidos e ativando a superóxido desmutase.

Em pacientes que apresentavam osteonecrose da mandíbula, foram feitas aplicações do gás localmente por 5 minutos, duas vezes por semana em um total de 20 dias. A osteonecrose da mandíbula em humanos pode apresentar como fatores

etiológicos a osteomielite crônica, herpes zoster, radioterapia em pacientes oncológicos. Ozônio atua preservando e induzindo a concentração dos antioxidantes endógenos e bloqueando a xantina oxidase (enzima que produz ácido úrico), caminho para geração de espécies reativas do oxigênio. O ozônio também pode apresentar um efeito benéfico na circulação sanguínea aumentando a concentração de eritrócitos, taxa de hemoglobina, diapedese e fagocitose e age estimulando o sistema reticulo-histiócitos. Esses efeitos são mais visíveis em pequenos vasos e capilares (AGRILLO et al., 2006).

Inflamações crônicas típicas virais, doenças auto-imunes, diabetes, arterosclerose e câncer liberam excessivamente espécies reativas do oxigênio que podem acelerar o desenvolvimento destas doenças. Por este motivo, a indução do estresse oxidativo com duração por dois a três minutos, e utilizando concentrações “fisiológicas”, não pode ser equacionada como um estresse patológico (BOCCI, 2007).

Em casos de choque séptico, o pré-condicionamento com ozônio tem sido capaz de resguardar o animal contra a depleção de glicogênio e prevenir sua degradação até lactato, inibindo a acidose intracelular. Mantém também estável a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  (GALLARDO et al., 2008).

Chen et al. (2008) observaram a supressão pelo ozônio da liberação da endotelina-1 após a reperfusão do rim após transplante. Acreditam que o mediador que induz a liberação dos antioxidantes neste caso é o óxido nítrico.

Em pacientes que receberam transplante de fígado que foram submetidos ao pré-condicionamento oxidativo, determinou-se uma maior capacidade de proteção ao órgão contra dano isquêmico. O ozônio também reduziu a expressão da p65, diminuiu a produção do TNF- $\alpha$  e promoveu uma redução da imunoreatividade da proteína HSP-70. O que significa que preservou o equilíbrio redox, a função mitocondrial e os pools de glutathiona, bem como a regulação do NF $\kappa$ B e HSP-70 (LEÓN-HERNANDEZ et al., 2008).

## 2.3 MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANO

Scott e Leshner (1962) indicaram que o ozônio atuava sobre a *Escherichia coli*, atacando a estrutura dos ácidos nucléicos no interior das células. .

Segundo Wickramanayake et al. (1984) o ozônio tem ação estudada especificamente sobre os microrganismos, neste estudo os autores compararam o ozônio com o cloro e demonstraram que a ação do ozônio é de longe mais efetiva que a do cloro sobre cistos de *Giardia lamblia*. Este estudo também comprovou a ação do ozônio sobre cepas de *E. coli*, ressaltando maior sensibilidade quando em comparação com a giárdia. Este protozoário apresentou maior sensibilidade ao ozônio do que a *G. muris*; a concentração da água utilizada (0,05M), para este experimento foi mensurada com espectrofotometria, e o tempo de exposição foi de dois a cinco minutos, em temperatura de 22° C (FINCH et al., 1993).

Nas bactérias age nos constituintes da membrana citoplasmática, sistemas enzimáticos e ácidos nucléicos, promovendo alteração na permeabilidade conseqüentemente lise celular, no entanto esporos de *C. sporogenes* e *B. subtilis* apresentaram resistência para a sua eliminação (RICKLOFF, 1987).

É capaz de inativar o vírus da Hepatite A, quando aplicado sob partículas suspensas em solução salina, com concentração de 1mg/l em 60 segundos (VAUGHN et al., 1990). Age nas proteínas celulares e nos ácidos nucléicos. A resistência dos microrganismos ao ozônio ou a qualquer agente de desinfecção será influenciada pela espécie e forma com que aparecem no meio (LAPOLLI et al., 2003).

Young e Setlow (2004) mais recentemente, demonstraram que o ozônio é capaz de eliminar esporos, e isto não ocorre por dano no DNA da célula; os autores sugerem que pode ser por produzir defeitos na germinação, talvez por acometimento da membrana interna.

A aplicação é importante quando sua ação é confirmada sobre microrganismos presentes nas infecções hospitalares. A aplicação na dose de 25ppm por um período de 20 minutos apresentou significativa redução e eliminação em alguns casos para *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, altamente patogênicos (SHARMA; HUDSON, 2008).

Murray et al. (2008) com ozônio em meio líquido, descreveram a inativação de vírus, entre eles herpesvírus, adenovírus e influenza por peroxidação lipídica sobre os quais promove dano irreversível.

## 2.4 FORMAS DE ADMINISTRAÇÃO

Diversas formas de aplicação e vias de administração como a aplicação sob a forma de gás, água ozonizada, óleo, autohemoterapia (maior e menor) e algumas vias de administração seguem descritas abaixo.

### 2.4.1 Autohemoterapia maior (O<sub>3</sub>-AHT)

Refere-se ao tratamento do sangue de forma extracorpórea de uma mistura de oxigênio e ozônio, e reinfusão lenta. A lavagem dos eritrócitos com solução salina previamente à ozonização não é indicada porque torna os eritrócitos mais vulneráveis, aumentando a hemólise. Em humanos há descrição de bem estar com duração de 4 a 5 dias, no entanto, não existem comprovações científicas que diferenciam essa sensação do efeito placebo (BOCCI, 1996).

Para a manipulação do sangue faz-se necessário o uso de anticoagulante. O citrato de sódio não induz a agregação plaquetária, mas o Ca<sup>2+</sup> é quelado induzindo hipocalcemia transitória (IULIANO et al., 1997). A heparina pode induzir a agregação plaquetária (BOCCI et al., 1999).

Autohemoterapia maior é realizada com um volume sanguíneo de usualmente 225 ml na concentração de 40 e 80 µg/ml. Quando a concentração supera os 100 µg/ml observa-se hemólise progressiva de 0,5-7% das células. Com atuação principalmente do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (VALACCHI; BOCCI, 1999), há um aumento do metabolismo das hemácias e crescimento da 2,3-difosfoglicerato (2,3 DPG) e adenosina trifosfato (ATP), bem como a liberação de citocinas imunocompetentes que liberam citocinas, interferons e interleucinas. Este procedimento induz estresse oxidativo calculado e transitório, utilizando como mensageiro principal os peróxidos. Os níveis de metahemoglobina e hematócrito se mantêm normais, há uma mínima perda de

potássio que rapidamente volta ao normal e o sistema antioxidante do sangue é capaz de proteger adequadamente enzimas como Na/K-ATPase, acetilcolinesterase quando a concentração é de até 80 µg/ml (BOCCI, 2004).

Sugerem-se tratamentos semanais, por longo período de tempo. O sangue não deve ser tratado em bolsas de transfusão, para que não ocorram reações químicas. O indicado são frascos estéreis de vidro com 3,8% de citrato de sódio, que segundo o autor apresenta melhores resultados que com o uso da heparina (BOCCI, 2005).

Di Paolo et al. (2005) indicaram que existem desafios quando se trata da autohemoterapia. Após testes *in vivo* e *in vitro* com mais de 1200 tratamentos em 82 pacientes, a mistura de oxigênio e ozônio, trabalhados extracorporeamente, com heparina, confirmaram seu potencial para tratamento de doenças arteriais periféricas, doenças coronarianas, dislipidemia severa, entre outras doenças vasculares. Além de também sugerir esta técnica também pode ser adaptada para o uso em hemodiálises.

De acordo com Bocci (2006) a utilização da autohemoterapia, nunca foi por objetivo substituir os tratamento médicos instituídos. O que se propõe é a utilização como um coadjuvante, para potencializar efeitos, em casos onde o tratamento convencional não apresentou bons resultados.

#### **2.4.2 Autohemoterapia menor**

A autohemoterapia menor trabalha com a ozonização de 5 a 10ml de sangue de forma extracorpórea. Neste caso são utilizadas seringas estéreis e a homogeneização do sangue com oxigênio-ozônio é feito manualmente. Essa quantidade reinfundida pela via intravascular mistura-se rapidamente com o volume total de sangue. Sugere-se a reaplicação pela via intramuscular, mas isso implica dor. É relatado para tratamento de herpesvírus, asma e câncer. Mas seus resultados ainda não são tão convincentes (BOCCI, 2005).

### 2.4.3 Insuflação retal

É a aplicação intra-retal do gás, capaz de ativar do metabolismo das hemácias sistemicamente, melhorando as propriedades reacionais, promovendo aumento da 2,3-difosfoglicerato, ATP (adenosina trifosfato) e alterando o balanço oxigênio/hemoglobina. É capaz de liberar IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ . Além disso, acredita-se que a hiperoxigenação possa acelerar os processos de cicatrização tecidual, conceitualmente pode produzir um efeito imunomodulador local e generalizado, podendo ser usado em casos de colites ulcerativas e proctites (processo inflamatório que acomete o reto). A aplicação de até 750ml de gás pode ser tolerada, usando uma cânula para a aplicação. A concentração não deve ser superior a 40 $\mu$ g/ml. Mas sugere-se sempre iniciar a terapia com doses menores, 10 $\mu$ g/ml em 150ml e aumentar gradativamente (BOCCI, 1996).

Candelario-Jalil et al. (2001) indicaram aplicação intra-retal a fim de prevenir o dano provocado pela liberação dos radicais livres (induzida pela aplicação de tetraclorocarbono experimentalmente). Este método pode prevenir a depleção do glicogênio e evitar a excesso de produção do lactato. A aplicação apenas do ozônio sem a aplicação do agente não promoveu nenhuma alteração.

González et al. (2004) relataram que o uso do ozônio por via intra-retal pode reduzir o aumento dos níveis de creatinina sérica e reverter a inibição da atividade da superóxido desmutase, catalase e glutathione peroxidase nos rins de ratos causada pelo uso da cisplatina.

Li-Jie et al. (2007) indicaram que o ozônio protegia o fígado contra as ações dos radicais livres induzidas por drogas hepatotóxicas, principalmente quando associada a medicina tradicional chinesa.

### 2.4.4 Intracavitário

A aplicação do gás em cavidades nasal e oral para o tratamento das infecções bacterianas e virais foram testadas e devem ser evitadas pela possibilidade de inalação. O trato respiratório apresenta sensibilidade quando o

ozônio se apresenta na forma de gás. Nestas regiões é mais seguro e mais prático a aplicação sob a forma de água ou óleo ozonizado (BOCCI, 1996).

A aplicação intraperitonealmente demonstra efeito antimicrobiano quando comparado entre diferentes gases: (dióxido de carbono (99,99%), gás hélio (99,99%) e ar comprimido (21% oxigênio e 79% nitrogênio), com ozônio a 0,4%. O ozônio inviabiliza o crescimento das cepas bacterianas como as da *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na medicina humana esta via de aplicação é utilizada como auxiliar de vídeo-cirurgia (PEREIRA et al., 2005).

Segundo Zamora et al. (2005) no modelo experimental de choque séptico induzido em ratos, com a aplicação pela via intraperitoneal, estimula a produção de antioxidantes e inibe a liberação da TNF- $\alpha$  e GSH-Px, que estão envolvidas na indução e desenvolvimento do choque séptico.

#### **2.4.5 Intra-articular ou em disco intervertebral**

A aplicação da mistura de oxigênio e ozônio periganglionarmente ou no interior do disco intervertebral em humanos, na concentração de 27  $\mu\text{g/ml}$  mostrou-se uma forma de tratamento para os que não responderam ao tratamento comum. Utilizada com volumes baixos de 2 a 10 ml na dose de 5 a 10  $\mu\text{g/ml}$  o gás parece atuar com propriedades analgésicas. Em aplicações para tratamento de hérnias de disco. O ozônio age na composição de glicoproteínas, como as proteoglicanas, resultando na liberação de água e conseqüentemente degeneração da matriz celular, o que é repostado por tecido fibroso. Esse evento acarreta na redução do volume do disco intervertebral, principal objetivo na aplicação do ozônio, que pode levar a uma descompressão medular (ANDREULA et al., 2003).

Wei et al. (2007) avaliaram a ação da aplicação de 6-10 ml (40mg/ml) no interior dos discos intervertebrais, para tratamento de 72 pacientes (humanos) com hérnia de disco que não apresentavam sinais de hipertermia, concluindo não haver necessidade na realização de terapia com antibióticos concomitantemente a esse tratamento.

#### 2.4.6 Ação antimicrobiana do ozônio sob a forma de gás

Pesquisas na Odontologia e na Medicina Veterinária com ozônio na forma de gás têm sido desenvolvidas e comprovam a ação antimicrobiana do ozônio. Age comprovadamente contra microrganismos patogênicos presentes na cavidade oral.

Em 1998, Kowalsky et al. demonstraram que a incubação de placas com colônias de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em períodos de 10 a 480 segundos apresentou uma inativação de 99,99% dos microrganismos. Este artigo sugeriu que o efeito sob a forma de gás apresentava ação antimicrobiana semelhante ao ozônio na água. Estes mesmos autores sugerem que sejam feitos trabalhos sobre a ação do ozônio sem esporos, tanto na forma de gás quanto na forma de água

Baysan et al. (2000) estudaram *in vitro* a ação do ozônio em dentes humanos com cáries recém-extraídos. Destacou a sua redução significativa sobre cepas de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* quando a exposição ao gás foi aplicada por 10 segundos. Na aplicação sobre cáries dentárias, *in vivo*, com tempos de exposição de 10 a 20 segundos, demonstrou redução drástica na maioria dos microrganismos encontrados (BAYSAN e LINCH, 2004).

Hems et al. (2005) realizaram três tipos de testes, com aspensão de água ozonizada; uma sob culturas de *E. faecalis* em períodos de 30 a 240 segundos; sobre biofilme reproduzido com o emprego de uma membrana de nitrato de celulose, por período de 48 horas, por 60 a 240 segundos. Por fim, o terceiro, o biofilme foi exposto ao ozônio na forma de gás. Como resultado, constataram que o ozônio apresentou efeito antimicrobiano sobre as colônias, no entanto, a aspensão da água ozonizada e o ozônio sob a forma de gás não apresentaram efeito sobre o biofilme.

Baysan e Beighton (2007) não obtiveram sucesso com uso do ozônio sob a forma de gás sobre lesões não cavitárias, não havendo redução significativa dos microrganismos quando aplicado por 40 segundos.

Müller et al. (2007) compararam a ação do gás ozônio com a terapia fotodinâmica (PDT) sobre cáries dentárias, quando constaram que ambos os métodos foram ineficazes quando os microrganismos apresentavam-se sob a forma de um biofilme cariogênico; neste caso também foi utilizada a clorexidina a 2%,

hipoclorito de sódio a 0,5 e 5%, e apenas com este último houve redução das contagens de colônias.

Cruz et al. (2008) sugeriram a utilização do gás ozônio associado ao propilenoglicol, como veículo para medicação intra-radicular. Os resultados finais demonstraram que esta associação possuía grande afinidade; os autores sugeriram mais testes com ambos os produtos. A afinidade com o gás foi superior com o propilenoglicol quando em comparação com óleo ozonizado de girassol ou o extra-virgem.

Fagrell et al. (2008) utilizaram o ozônio para tratamento de cáries dentárias e optou pela utilização da microscopia eletrônica para demonstrar o efeito antimicrobiano do ozônio sob a forma de gás. As aplicações de 20, 40 e 60 segundos preveniram o crescimento dos microrganismos testados (diferentes cepas de *Streptococcus mutans* e uma cepa de *Lactobacillus sp.*).

#### **2.4.7 Água ozonizada**

A produção da água ozonizada envolve transferência por meio de bolhas. Quando o ozônio está dissolvido no meio líquido obedece a Lei de Henry, onde a concentração da saturação é proporcional à pressão parcial do ozônio em temperatura determinada. Mas isto só vale a uma temperatura estável e em água absolutamente pura. As capacidades de infiltração em pequenas áreas tornam as propriedades da água ozonizada ainda mais interessantes, promovendo limpeza e desinfecção de áreas de difícil acesso. A concentração da água pode ser medida pelo método colorimétrico do trissulfonato índico, que tem por base a oxidação seletiva de uma molécula orgânica colorida, pelo ozônio molecular (LAPOLLI et al., 2003).

Em estudos *in vitro* a ação da água ozonizada na concentração de 0,6mg/l levou à morte das cepas de *Staphylococcus aureus* com concentração de  $10^6$  a  $10^{16}$  microorganismos/ml; houve diferença entre o uso da água ozonizada previamente tratada com ozônio por 20 minutos antes da inoculação e a não tratada. A água ozonizada que sofreu processo de pré-ozonização inativou o *S. aureus* em 5

minutos e 25 segundos, em contrapartida, com o grupo sem a prévia ozonização, este tempo passou para 23 minutos e 45 segundos (VELANO et al., 2001).

Thanomsub et al. (2002) testaram a água ozonizada em diferentes concentrações e tempo sobre microrganismos (*Escherichia coli*; *Salmonella sp.*; *Staphylococcus aureus*) e na concentração de 0,167mg/min/l de ozônio foi capaz de esterilizar a água em concentração de bactérias de até  $10^5$ UFC/ml por trinta minutos. Em concentrações bacterianas superiores a essa a água ozonizada não se mostrou efetiva.

A água ozonizada foi descrita como uma forma de aplicação de alta potência, fácil manipulação, baixo índice de mutagenicidade e efeito microbicida rápido. Foi testada sobre microrganismos entre  $1 \times 10^6$ , com água ozonizada na concentração de 0,5mg, 2mg e 4mg/l nos tempos de 10, 30, 60 e 120 minutos. A viabilidade do *Streptococcus mutans* diminuiu em 58% após exposição a 0,5mg/l por 10 segundos. A sua inativação total deste microorganismo ocorreu nas concentrações de 2 e 4mg/l. De forma semelhante ocorreu com o *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. salivarius*. Quando submetidas às concentrações de 0,5mg/l, 2mg/l e 4mg/l, a *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis* e o *A. actinomycetemcomitans* também tiveram redução. A *Candida albicans* não foi completamente eliminada na concentração de 0,2mg/l por 120 segundos. Sobre o biofilme dental (induzido experimentalmente) a água ozonizada na concentração de 4mg/l por 120 minutos, apresentou significativa redução do *S. mutans*, não muito diferente do iodo-polvidine (2,3mg/ml) (NAGAYOSHI et al., 2004a).

Apresenta rápida degradação, portanto perde rapidamente a sua ação antimicrobiana. Fatores como contaminação por compostos orgânicos, temperatura e potencial hidrogeniônico (pH) aceleram este processo. A manutenção da água ozonizada em baixas temperaturas prolonga sua atividade bactericida por até 180 minutos quando armazenado no gelo (NAGAYOSHI et al., 2004a).

Nagayoshi et al. (2004b) estudaram a viabilidade do *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* presentes nos túbulos dentinários de dentes bovinos e descreveram uma significativa redução com a utilização da água ozonizada similar ao hipoclorito de sódio a 2,5%. A única diferença foi com relação à sua citotoxicidade sobre fibroblastos de ratos. Com a água ozonizada o metabolismo celular era maior, quando em comparação com o hipoclorito de sódio que reduziu o número de células significativamente.

Bocci (2005) descreveu sua meia vida a 5° C sendo de 110 horas e a 20° C sendo de apenas nove horas. Quando a água ozonizada é produzida com água monodestilada a duração cai para menos de uma hora. Por isso sugere-se que seja preparada com água bidestilada. O ozônio demora 5 minutos para atingir concentração máxima após início do borbulhamento, e devem ser utilizados frascos de vidro para não permitir que haja oxidação do material empregado para a manipulação.

Quando aplicado sob a forma de água ozonizada na desinfecção de próteses móveis apresentou maior poder anti-séptico na concentração de 2 a 4mg/l, quando a aplicação feita durante 1 minuto. Quase nenhuma colônia de *Candida albicans* foi encontrada posteriormente na cultura (ARITA et al., 2005).

Huth et al. (2006) dedicaram seus estudos no poder anti-séptico da água ozonizada, nas concentrações 1,25 a 20 µg/ml<sup>1</sup> e sob a forma de gás a 0,2-53 x 10<sup>6</sup> µg/ml<sup>-3</sup> que a clorexidina (2% e 0,2%), hipoclorito de sódio (NaOCl a 5,25%, 2,25%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%).

Estrela et al. (2006) utilizaram a água ozonizada para limpeza e desinfecção de instrumentos odontológicos junto aos sistemas de limpeza com ultra-som. As bactérias utilizadas neste estudo foram o *Staphylococcus aureus*. Os autores concluíram que neste modelo experimental não houve crescimento bacteriano com o uso do ozônio.

Estrela et al. (2007) em comparação ao efeito da água ozonizada com gás ozônio, hipoclorito de sódio a 2,5% e clorexidina a 2% sobre *Enterococcus faecalis* inoculados em canais radiculares de humanos. Não encontraram efeitos antimicrobianos positivos em nenhuma substância testada, mesmo após 20 minutos de exposição.

Huth et al. (2007) indicaram que a doença periodontal está relacionada à colonização do complexo dento-gengival, sendo esse um fator primário. A subsequente ativação da cascata molecular da inflamação leva a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, IL-1, IL-8 e TNF sendo este último responsável pela destruição do osso alveolar e tecido periodontal conectivo. A transcrição do fator NF-κB atua de maneira importante neste processo e na apoptose celular. A água ozonizada neste estudo quando em certas condições inibe a ação da NF-κB e com isso inibe a ação do TNF, segundo o autor essa pode caracterizar propriedades antiinflamatórias da água ozonizada.

Shinozuka et al. (2008) demonstraram que a água ozonizada quando aplicada na dose de 0,8mg/l induz uma redução na liberação de endotoxinas da *Escherichia coli* para um sexto, em comparação com a aminobenzilpenicilina, um dos antibióticos testado que menor induziu a liberação. Os outros antibióticos envolvidos neste experimento são a kanamicina, oxitetraciclina, sulfa metoxina ou enrofloxacina.

Cardoso et al. (2008) testaram o uso da água ozonizada sobre *Candida albicans*, *E. faecalis* e endotoxinas no interior do canal radicular (*in vitro*) e demonstraram uma redução significativa imediatamente após a aplicação sobre a *Candida albicans*, *E. Faecalis* não neutralizando as endotoxinas da *Escherichia coli*. Após 7 dias, notaram um crescimento da concentração destes microrganismos.

Bezirtzoglou et al. (2008) colocaram escovas de dente em solução de PBS (salina fosfatada tamponada) e ozônio por 5, 10, 15, 20 e 30 minutos e determinou que após exposição por 30 minutos o ozônio foi capaz de eliminar os microrganismos presentes (*Candida albicans*, *Streptococcus pyogenis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sobrinus*, *S. viridans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *Aerococcus viridans*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas sp* e *Enterococcus sp.*).

#### 2.4.8 Óleo ozonizado

Possui ação antimicrobiana quando na forma de óleo de girassol ozonizado, em microrganismos como Micobactérias, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* *Enterococcus sp.*, as concentrações aplicadas neste trabalho foram de 1,18 a 9,5mg/ml. Os autores destacaram que as micobactérias foram as mais sensíveis das bactérias testadas (SECHI et al., 2001).

Foi utilizado o ozônio com óleo de girassol, mostrando efeitos sobre o *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* *S. typhimurium* e *E. coli*. Em ratos o trabalho indicou ação antiinflamatória e efeitos protetores da pele (agindo nos tecidos conjuntivos), o que caracterizou potencial de cicatrização (RODRIGUES et al., 2004).

O ozônio misturado ao azeite de oliva ou girassol possui características antimicrobianas, ativação da oxigenação dos tecidos auxilia na regeneração tecidual e propriedades cicatrizantes. O mecanismo de ação ocorre através de tríozonídeos,

que são subprodutos do óleo ozonizado, que posteriormente gera peróxido de hidrogênio e produtos da peroxidação lipídica. Com a capacidade de armazenamento de até dois anos quando mantido refrigerado. Demora de uma hora até dois dias para atingir a concentração desejada, quando na temperatura ambiente. Um grama de óleo pode absorver até 160 miligramas de ozônio (BOCCI, 2005).

Recentemente foram demonstradas ação sobre *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*; o ozônio foi testado utilizando outros veículos além do óleo de girassol e óleo de oliva extra-virgem (CRUZ et al., 2008).

#### **2.4.9 Na Medicina Veterinária**

Na Medicina Veterinária, Ogata e Nagahata em 2000 estudaram o ozônio por via intramamária em vacas leiteiras com mastites. Relataram que a infusão do gás apresentou dificuldade em agir contra bactérias como *S. aureus*, *A. pyogenis* e *S. uberis*, principalmente nas mastites crônicas, no entanto, sessenta por cento dos animais tratados apresentaram melhora dos sinais clínicos e não apresentaram recidiva do quadro. Pereira et al. (2003) destacaram que o ozônio por ser rapidamente degradado, não permite resíduos no leite o que interessa muito à produção leiteira no Brasil, melhorando a qualidade do leite e com isso gerando renda aos produtores

Lake et al. (2004) induziram a endoftalmite em coelhos por *Staphylococcus epidermitis*, em seguida aplicaram 0,1ml de ozônio diluído em solução salina intravítrea. Notaram que a aplicação do ozônio não foi capaz de erradicar a bactéria, mas diminuiu a carga bacteriana reduzindo a reação inflamatória local.

#### **2.5 EFEITO CITOTÓXICO**

O ozônio sobre a forma de gás e água ozonizada tiveram seu efeito citotóxico testado e comparado com substâncias freqüentemente utilizadas na Odontologia ou

Odontologia Veterinária. Foram avaliadas contagens celulares, atividade metabólica, níveis de apoptose e citotoxicidade. A água ozonizada não promoveu alteração nas células epiteliais e fibroblastos, o ozônio sobre a forma de gás apresentou baixa ação sobre as células epiteliais e fibroblastos, em contraste com o uso do hipoclorito de sódio (2,25 e 5,25%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) que demonstraram alta citotoxicidade (NAGAYOSHI et al., 2004a).

A água ozonizada foi utilizada na concentração de 1,25-20µl/ml<sup>-1</sup> e demonstrou sua biocompatibilidade. Após o contato com o gluconato de clorexidina (2 e 0,2%) houve uma grande redução na atividade metabólica das células epiteliais e foi pouco tóxica para os fibroblastos. A atividade metabólica foi altamente inibida com o uso do hipoclorito de sódio nas concentrações 2,25 e 5,25% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%. O uso do metronidazol também foi testado neste mesmo experimento onde demonstrou também apresentar uma capacidade de redução da atividade da célula epitelial e não alterou a cultura dos fibroblastos (HUTH et al., 2006).

## 2.6 CONTRA-INDICAÇÕES

É contra-indicada a utilização do ozônio associado à solução salina (NaCl 0,9%), por formar ácido hipocloroso (HOCL), que pode provocar inflamação local como vasculites. Em humanos com deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (flavismo), não é indicado. A G6PD catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato, produzindo NADPH, que é crucial para a proteção das células contra o estresse oxidativo. A G6PD é expressa em todos os tecidos, mas a sua deficiência manifesta-se essencialmente nas hemácias. Também é contra-indicado em pacientes com hipertiroidismo, por aumentar metabolismo celular (BOCCI, 2005).

Os efeitos tóxicos da inalação do ozônio sobre a forma de gás vão desde lacrimejamento excessivo e irritação das vias aéreas. Em doses superiores a morte, que pode acontecer em horas ou minutos. O tratamento instituído para os casos de intoxicação é a inalação de oxigênio umidecido. Administrações endovenosas de ácido ascórbico ou glutatona reduzida em soluções de glicose a 5% (BOCCI, 2005).

Atualmente é 100% contra indicada a inalação do gás ozônio, sabe-se que o efeito oxidativo nas células pode ser deletério às células, tanto que é utilizado como

método para testar agentes broncoconstritores (SOMMER et al., 2001). Ele faz com que as vias aéreas fiquem hiperresponsivas e promove uma neutrofilia (WAGNER et al., 2003), bem como exacerbar doenças previamente existentes como asma, doenças obstrutivas crônicas e síndrome do desconforto respiratório (WILLIAMS et al., 2007). Ciencewicky et al. (2008) descreveram de forma geral que os antioxidantes de maneira geral podem produzir impactos no trato respiratório.

# ***Discussão***

### 3 DISCUSSÃO

Após a sua descoberta pelo químico alemão Christian Friedrich Schönbein em 1834 as propriedades do ozônio passaram a ser aplicadas na desinfecção da água, função esta que se espalhou rapidamente pelo mundo inteiro. Revendo a literatura não demorou a perceber as propriedades terapêuticas desta variedade alotrópica do oxigênio. Em 1972 a Sociedade Médica de Ozônio criada por Joachim Hänsler e Hans Wolff, pretendia motivar pesquisas relacionadas com o assunto (BOCCI, 1996; BOCCI, 2005). Desde então a ação do ozônio tem sido investigada (BOCCI, 1996; LEÓN et al., 1998; BOCCI et al., 1999; AL-DALAIN et al., 2001; ALVES et al., 2004; BOCCI, 2005; BOCCI et al., 2005; MARTINEZ-SANCHEZ et al., 2005; ZAMORA et al., 2005; AGRILLO et al., 2006; BOCCI, 2007; CHEN et al., 2008; GALLARDO et al., 2008; LEÓN-HERNANDEZ et al., 2008).

O ozônio é uma molécula sabidamente instável (WICKRAMANAYAKE et al., 1984; BOCCI, 1996; LEÓN et al., 1998; BOCCI et al., 1999; AL-DALAIN et al., 2001; THANOMSUB et al., 2002; ALVES et al., 2004; LAKE et al., 2004; NAGAYOSHI et al., 2004a;b; YOUNG; SETLOW, 2004; ARITA et al., 2005; BOCCI, 2005; BOCCI et al., 2005; HEMS et al., 2005; MARTINEZ-SANCHEZ et al., 2005; AGRILLO et al., 2006; BOCCI, 2006; ESTRELA et al., 2006; HUTH et al., 2006; BOCCI, 2007; HUTH et al., 2007; BEZIRTZOGLU et al., 2008; CARDOSO et al., 2008; CHEN et al., 2008; GALLARDO et al., 2008; LEÓN-HERNANDEZ et al., 2008; SHARMA; HUDSON, 2008; SHINOZUKA et al., 2008), fato que resulta na sua rápida degradação e quando comparado ao cloro, não gera subprodutos danosos ao meio ambiente (BOCCI, 1996; BOCCI, 2005), informação importante para o uso clínico em animais.

É considerado o segundo elemento da natureza com alto poder oxidativo, garantindo que a baixa dosagem seja suficiente para a redução dos microrganismos, além de oxidar componentes orgânicos, inorgânicos e precipitar metais pesados (GLAZE, 1986; BOCCI, 1996; TORRES et al., 1996; LAPOLLI et al., 2003). O ozônio ao se degradar, volta a ser oxigênio. O que alguns autores descreveram como importante o uso no tratamento de mastites, o que se justifica pelo fato deste tratamento não interferir na produção leiteira (OGATA; NAGAHATA, 2000; PEREIRA et al., 2003).

Com base nestas informações foi possível caracterizar o ozônio como uma substância com ação oxidante, capaz de atuar nos microrganismos sem deixar resíduos. Propriedades estas que foram confirmadas por Cardoso et al. (2008) que demonstraram recolonização de *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis* 7 dias após a aplicação do ozônio no interior de canais radiculares.

No que se refere a sua produção, são utilizados catalisadores ou altas temperaturas para que o ozônio volte ao ambiente como oxigênio, após a sua utilização, impedindo a inalação do gás. A descarga corona é a forma de geração de ozônio mais empregada quando voltado ao uso médico. Nada mais é do que uma descarga elétrica produzida por diferença de potencial entre dois eletrodos, sobre as moléculas de oxigênio (LAPOLLI et al., 2003; BOCCI, 2005). Pode ser utilizado com ar comprimido ou oxigênio puro. Com o oxigênio, não são necessárias as etapas de filtração, compressão, resfriamento e desumidificação, o que reduz os custos e facilita a produção (VALACCHI; BOCCI, 1999; LAPOLLI et al., 2003; BOCCI, 2005).

Além das altas temperaturas e agentes catalisadores, relatos coincidentes tais como, luz ultravioleta e variações de potencial hidrogeniônico foram citados como fatores que aceleram o processo de degradação do ozônio (LAPOLLI et al., 2003; NAGAYOSHI et al., 2004a;b; BOCCI, 2005; HUTH et al., 2006; HUTH et al., 2007).

Fatores que permitem concluir que a molécula de ozônio requer manuseio sob condições estáveis.

Quando a água ozonizada é armazenada no gelo pode apresentar sua atividade microbida de até 180 minutos (NAGAYOSHI et al., 2004a). Diferentemente Bocci (2005) descreveu que a meia vida da água ozonizada quando armazenada a 5°C é de 110 horas e a 20°C apenas nove horas. Ambos os autores recomendam a utilização da água bidestilada para produção de água ozonizada reduzindo a possibilidade de reações químicas (NAGAYOSHI et al., 2004a;b). Com o emprego da monodestilada, os efeitos da água ozonizada podem durar por período de até 1 hora, porém com meia vida notadamente reduzida (BOCCI, 2005).

Essas informações indicam o curto tempo de trabalho. O que indica que o preparo da água ozonizada deva ser realizado imediatamente antes da sua utilização.

O uso médico do ozônio tem duas principais formas de ação: a imunomoduladora e a antimicrobiana. A imunomoduladora pode ser induzida a partir

do contato do ozônio com o sangue por técnicas como a autohemoterapia (maior e menor) e insuflação retal.

Na autohemoterapia maior, o sangue é colocado em contato, extracorpóreo, com uma mistura de oxigênio e ozônio, em quantidade de sangue de 225ml (BOCCI, 1996; IULIANO et al., 1997; BOCCI et al., 1999; VALACCHI; BOCCI, 1999; AL-DALAIN et al, 2001; ALVES et al., 2004; BOCCI, 2004; DIPAOLO et al., 2005).

Na autohemoterapia menor, a quantidade de sangue é pequena, após o contato com o mesmo tipo de mistura de gases, é reaplicado pela via intramuscular ou intravenosa (BOCCI, 2005); na insuflação retal, o gás é aplicado via sonda na ampola retal (BOCCI, 1996; CANDELARIO-JALIL et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2004; LI-JIE et al., 2007).

A autohemoterapia maior é um método que requer maior custo e cuidados, principalmente com a dose que não deve exceder os 80µg/ml, caso contrário é capaz de provocar hemólise. Se comparar com a autohemoterapia menor quando da aplicação reaplicado pela via intravenosa, mistura-se rapidamente ao sangue, e quando aplicado pela via intramuscular causa dor (BOCCI, 2005). A discussão dos achados sobre a autohemoterapia menor indica pouca utilização e por provocar dor, quando reaplicado pela via intramuscular, supõe-se dificuldades devido a este fato, para a aplicação em animais.

A insuflação retal apresenta baixo custo, fácil manipulação e baixo índice de efeitos colaterais, como intoxicação e inflamações no local da aplicação (GONZÁLEZ et al., 2004). Com relação a esses achados, parece apropriado para o uso em animais porque não exige muito do paciente, isto é, sem a possível necessidade de uma anestesia geral. Induz ao mesmo efeito que a autohemoterapia maior e menor que é a liberação de antioxidantes.

Aplicações intracavitárias foram indicadas quando não há risco de inalação do gás (BOCCI, 1996; PEREIRA et al., 2005). Intra-articulares e para tratamento de hérnias de disco sugeriram um efeito analgésico induzido pelo ozônio (ANDREULLA et al., 2003). A revisão de literatura apresentou poucos experimentos sobre o assunto, principalmente no que diz respeito à descrição do mecanismo de ação. Mas apresentou alguns resultados positivos no que diz respeito a pacientes recém transplantados ou que sofreram síndrome de reperfusão ao promover principalmente com uma espécie de tolerância (adaptação ao estresse oxidativo) do organismo às espécies reativas do oxigênio (LEÓN et al., 1998; AL-DALAIN et al., 2001; ZAMORA

et al., 2005; MARTÍNEZ-SANCHEZ et al., 2005; AGRILLO et al., 2006), fator ainda de pouca aplicação em animais.

Portanto, ao planejar a utilização desses dados em Medicina Veterinária, a escolha do melhor método para induzir a imunomodulação pode ser de acordo com a facilidade de aplicação. Sendo assim, a insuflação retal, pode ser uma boa indicação, pois promove os mesmos efeitos que a autohemoterapia. Ainda não são muitos autores que estudam a inibição da liberação das citocinas, o que torna um achado desta revisão, onde notadamente, existe a necessidade de novos experimentos que demonstrem mecanismo de ação.

Essas formas de aplicação (autohemoterapia e insuflação retal) induzem a liberação de espécies reativas do oxigênio (ERO), que irão desencadear reações e causar danos ao organismo. O ozônio atua exatamente nesta fase, levando a dois tipos de processos; a liberação de EROs, principalmente o peróxido de hidrogênio que serve de sinalizador para a produção de antioxidantes endógenos que são a superóxido desmutase e glutathione (BOCCI, 1996; LEÓN et al., 1998; BOCCI, 2005; BOCCI et al., 2005; MARTÍNEZ-SANCHEZ et al., 2005; BOCCI, 2007); e a peroxidação lipídica, que é a ação sobre a superfície dos ácidos graxos liberando também espécies reativas do oxigênio e aldeídos como o malondialdeído, 4-hidroxinonal e isoprostanos (LIMA e ABDALLA, 2001; NAOUM, 2001; BOCCI, 2005, BOCCI et al., 2005).

As espécies reativas do oxigênio irão induzir a liberação de citocinas como as interleucinas (IL-1; IL-2, IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ); estimular produção de antioxidantes endógenos (superóxido desmutase e a glutathione, principalmente) e ativar uma enzima chave chamada de 2,3 difosfoglicerato (BOCCI, 1996; LEÓN et al., 1998; BOCCI, 2005; BOCCI et al., 2005; MARTÍNEZ-SANCHEZ et al., 2005; BOCCI, 2007; ZAMORA et al., 2005; LEÓN-HERNANDEZ et al., 2008). A 2,3 difosfoglicerato atua na glicólise anaeróbica, dissociando a oxihemoglobina, promovendo oxigenação tecidual. No ATP induz aumento do metabolismo, responsável por estabilizar o potencial de membrana celular (VIEHNBAN-HAESLER, 2003; BOCCI, 2005). Isso é importante quando se trata da utilização do ozônio, em doenças isquêmicas. No choque séptico o ozônio atua contra a depleção do oxigênio atuando no metabolismo do lactato, prevenindo a acidose intracelular (GALLARDO et al., 2008), com possível uso em Medicina Veterinária.

Uma característica notada em trabalhos recentes merece destaque: o ozônio mostrou-se capaz de agir sobre a tirosina quinase, mantendo inibida a NFκB, principal responsável pela produção do TNF-α, que é um fator de destruição tecidual (ZAMORA et al., 2005; LEÓN-HERNANDEZ et al., 2008; HUTH et al., 2007). Com isso entende-se a capacidade de reduzir lesões provocadas por mediadores inflamatórios na aplicação sistêmica. Chen et al. (2008) citaram a ação do óxido nítrico como um mediador para a liberação dos antioxidantes, além do peróxido de hidrogênio destacado por outros autores (BOCCI, 1996; LEÓN et al., 1998; BOCCI, 2005; BOCCI et al., 2005; MARTINÉZ-SANCHEZ et al., 2005; BOCCI, 2007).

Os trabalhos descritos acima permitem concluir que o ozônio induz a liberação de antioxidantes, aumentam a oxigenação tecidual e o metabolismo celular, promovendo proteção celular. A utilização destas formas de aplicação são viáveis do ponto de vista clínico, no entanto a dose utilizada ainda não foi claramente estabelecida, e merece mais estudos, pois quando excede o limite já estipulado, pode induzir ações deletérias.

Alves et al. (2004) utilizaram o ozônio em solução salina para induzir o pré-condicionamento oxidativo na síndrome de reperfusão em jejuno de eqüinos, no entanto, o uso de solução salina é contra-indicado por Bocci em 2005, pela formação de ácido hipocloroso, que pode ocasionar inflamação como vasculites ou flebites. Em experimentos realizados por Al-Dalain et al. (2001) e Martínéz-Sanchez et al. (2005) foi descrito o uso do pré-condicionamento oxidativo em pacientes diabéticos, permitindo melhor controle da curva glicêmica e redução do aparecimento de lesões do pé diabético em humanos, estudo não encontrado para animais.

Contudo, ainda são poucos trabalhos que utilizam da mesma metodologia, que indicam a ação do pré-condicionamento oxidativo. Isso pode sugerir na Odontologia Veterinária a aplicação em doenças orais que promovem grande processo inflamatório, como a doença periodontal, estomatites plasmocíticas, tratamento endodônticos e neoplasias orais.

A segunda função, uma das mais importantes e promissoras é a antimicrobiana que, indica o quanto a utilização do ozônio é promissora, principalmente por atua sobre vírus, fungos, bactérias, esporos e protozoários (SCOTT; LESHER, 1962; WICKRAMANAYAKE et al., 1984; VAUGHN et al., 1990; FINCH et al., 1993; RICKLOFF, 1997; BAYSAN et al., 2000; LAPOLLI et al., 2003;

VELANO et al., 2001; THANOMSUB et al., 2002; BAYSAN; LINCH, 2004; LAKE et al., 2004; NAGAYOSHI et al., 2004a;b; YOUNG; SETLOW, 2004; ARITA et al., 2005; HUTH et al., 2006; BAYSAN; BEIGHTON, 2007; ESTRELA et al., 2007; HUTH et al., 2007; MÜLLER et al., 2007; CRUZ et al., 2008; FAGRELL et al., 2008; MURRAY et al., 2008; SHARMA; HUDSON, 2008).

Ainda nesta linha, o ozônio foi estudado para controle de infecções hospitalares. Demonstrando sucesso diante dos microrganismos como o *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, e também ao *Staphylococcus aureus* resistente a metilina, este assim denominado pela resistência a diversos tipos de antibióticos, altamente patogênicos (SHARMA; HUDSON, 2008).

A presente discussão permite ressaltar a possibilidade do emprego do ozônio no controle da contaminação hospitalar, com efeitos na promoção de saúde animal e melhor qualidade de vida, embora no Brasil o controle de infecção hospitalar ainda seja incipiente.

Nos vírus o ozônio atua sobre proteínas celulares e ácidos nucleicos (LAPOLLI et al., 2003; BOCCI, 2005); foram descritas ação sobre o vírus da Hepatite A (VAUGHN et al., 1990) e na inativação do herpesvírus, adenovírus e influenza (MURRAY et al., 2008).

Em protozoários, Wickramanayake et al. (1984), em seu trabalho, não descreveram a concentração utilizada, mas comentaram a sensibilidade a *Giardia lamblia*. Confirmada por Finch et al., em 1993 que além da *G. lamblia* também descreveram ação sobre *Giardia muris*.

Com essa discussão é permitido inferir que doenças virais e infecções por protozoários estão presentes diariamente na Medicina Veterinária, e apesar de não estarem voltadas diretamente ao plano deste estudo, são informações importantes para a utilização.

Já Kowalsky et al. (1998) sugeriram a realização de mais estudos que pudessem descrever a ação sobre esporos, pois a literatura nada esclarecia. Em 2004, por Young e Setlow caracterizaram evidências do ozônio por desencadear defeitos na germinação.

Vários autores descreveram que sobre as bactérias, o ozônio é capaz de atuar nos constituintes da membrana citoplasmática promovendo perda de ácidos graxos, alterando a permeabilidade e, como consequência, lise celular (BOCCI, 1996; LAPOLLI et al., 2003; BOCCI, 2004; 2005; BOCCI et al., 2005).

A ação do ozônio com função antimicrobiana pode ser empregada de três maneiras principais: sob a forma de gás, água ozonizada e óleo.

Assim deve-se salientar que a literatura estudada visou destacar entre outras informações, as contidas na Odontologia Humana. Para que os dados apresentados possam ser extrapolados para a Medicina Veterinária. Portanto, saber de que forma o ozônio se comporta diante de bactérias e fungos, especificamente na cavidade oral, constitui fator determinante para que possam ser definidos novos caminhos na pesquisa.

A presente discussão é fortemente justificada, pois a maior parte das alterações que envolvem a cavidade oral é de origem infecciosa, sendo que os microrganismos e seus subprodutos exercem importante papel na indução e evolução das doenças. É sabido que em dentes com alterações pulpares, periapicais ou periodontais, a infecção é invariavelmente induzida por combinações específicas de microbiota anaeróbica facultativa estrita e principalmente gram-negativa. As doenças que acometem a cavidade oral também em animais domésticos estão relacionadas a presença dos microrganismos, que na maioria são: *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp* (HARVEY et al., 1995; LIPPOLIS et al., 2004), *Pasteurela multocida*, *Escherichia coli* e *Fusobacterium russi* (ELLIOTT et al., 2005), *Bacteróides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* e *Prevotella* (HARVEY et al., 1995; RADICE et al., 2006).

Não há como negar a importância da correlação positiva que ocorre entre a doença periodontal que acomete cerca de 80% dos animais domésticos, com a ocorrência de lesões histológicas em rins, fígado e miocárdio, além de infecções pulpares, e outras doenças orais que podem levar a bacteremia (DEBOWES et al., 1996). Assim percebe-se que o ozônio pode ser usado para combater também estas lesões, embora estudos sejam necessários, para encontrar a forma mais adequada de aplicação.

Sob a forma de gás o ozônio foi responsável pela inativação de 99,99 % das colônias de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (KOWALSKY et al., 1998). Da mesma forma, Baysan et al. (2000) destacaram o efeito sobre *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Baysan e Linch (2004) indicaram ação em quase todos os microrganismos presentes em cáries dentárias.

Em contrapartida estes trabalhos contribuíram com a concepção de que a ação do ozônio sob a forma de gás, nos microrganismos organizados em um

biofilme, é pobre, confirmada por (HEMS et al., 2005; BAYSAN; BEIGHTON, 2007; MÜLLER et al., 2007). Sua ineficácia foi correlacionada à impossibilidade da total penetração, comprometendo a sua atuação (BAYSAN; BEIGHTON, 2007). Nagayoshi et al.(2004a) conseguiram resultados utilizando a água ozonizada, mas foram semelhantes ao iodo-polvidine sobre o biofilme.

Velano et al. (2001) demonstraram a ação da água ozonizada sobre 99% das cepas de *Staphylococcus aureus* testadas. Concluíram que a pré-ozonização da água garante um efeito mais rápido, reduzindo de 20 para 5 minutos o tempo de eliminação dos microrganismos. Thanomsub et al. (2002) obtiveram a esterilização da água infectada por *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e *Staphylococcus aureus* na concentração bacteriana de  $10^5$ UFC/ml. Acima desta concentração não conseguiram o mesmo efeito, fato que indica pouca ação sobre altas concentrações.

Para desinfecção dos materiais odontológicos e escovas de dente, a água ozonizada foi capaz de eliminar *Candida albicans*, *Streptococcus pyogenis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sobrinus*, *S. viridans*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *Aerococcus viridans*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.* e *Enterococcus sp* (ESTRELA et al., 2006; BEZIRTZOGLU et al., 2008). Estes trabalhos sugerem a utilização do ozônio em fômites no ponto de vista microbiológico na Medicina Veterinária.

Nagayoshi et al. (2004a) em estudo utilizando ozônio nas mais diferentes concentrações, quando a 0,5mg/l com exposição por 10 minutos, sobre diferentes tipos de *Streptococcus*, mostraram a redução bacteriana de 58%. Os mesmos autores testaram o *Enterococcus faecalis* e *S. mutans* no interior dos túbulos dentinários e descreveram redução similar ao hipoclorito de sódio a 2,5% (Nagayoshi et al., 2004b).

Cabe ressaltar, sob o ponto de vista endodôntico, visando a Veterinária, que esses trabalhos levam a crer que a água ozonizada no interior de canais radiculares é capaz de promover desinfecção sem induzir efeito citotóxico. Com isso os resultados obtidos sobre a viabilidade de microorganismos colonizando a dentina bovina experimentalmente, são animadores.

A água ozonizada nas concentrações 1,25 a  $20\mu\text{g/ml}^{-1}$  demonstrou melhor poder anti-séptico quando comparada às formas de gás, clorexidina, água oxigenada e hipoclorito de sódio (HUTH et al., 2006). Estrela et al. (2007) não obtiveram este mesmo fenômeno ao comparar a água ozonizada com o gás,

hipoclorito de sódio e clorexidina a 2% no interior do canal radicular. Neste caso nenhuma das formas testadas apresentou efeito antimicrobiano, nem mesmo após 20 minutos de contato.

Na medida em que esses valores foram testados, fez-se necessário o estudo do potencial citotóxico do ozônio. Foram verificadas as ações sobre células epiteliais e fibroblastos. De modo que o ozônio na forma de gás mostrou efeitos citotóxicos discretos sobre as células; o efeito citotóxico foi encontrado de forma substancial com o uso do hipoclorito de sódio a 5,25 e 2,25% e a água oxigenada a 3% (NAGAYOSHI et al., 2004a).

Com relação à água ozonizada, pode-se dizer que foi biocompatível com as células testadas (NAGAYOSHI et al., 2004a; HUTH et al., 2006). Shinosuka et al. (2008) concluíram que a água ozonizada promovia menor liberação de endotoxinas pela *E.coli*, em comparação com antibióticos como a aminobenzilpenicilina, oxitetraciclina, sulfa metoxina ou enrofloxacina.

A discussão dos achados de Shinosuka et al. (2008) permitem concluir que uma possível associação da água ozonizada em tratamentos com antibiótico possa ser empregada na redução dos efeitos causados pela liberação das endotoxinas, que estão relacionados ao aumento do processo inflamatório. Além disso, é permitido pensar na aplicação *in vivo*, uma vez que a água ozonizada apresentou sinais de biocompatibilidade com células epiteliais e fibroblastos. Outro fator importante, é que quando dispersado em água, o ozônio não pode ser inalado, o que reduz de maneira importante os riscos.

Com relação ao efeito sobre *Candida albicans*, Nagayoshi et al. (2004b) não obtiveram sua total inativação *in vitro* à 2mg/l, em exposição por 120 minutos. Por outro lado, Arita et al. (2005) aplicando doses de 2 a 4mg/l por 120 segundos, reduziram o crescimento pelo uso da água ozonizada. Cardoso et al. (2008) demonstraram resultado favorável sobre esse mesmo microrganismo. A discussão destes achados em nada difere quando da aplicação de qualquer nova tecnologia com vistas à ação antimicrobiana. A necessidade de buscar metodologia capaz de organizar os resultados organizados especialmente em modelo experimental que garanta a ideal interpretação dos resultados, ainda é um fato a ser estudado.

Com resultados interessantes, Huth et al. (2007) foram além e indicaram a capacidade de inibir o sistema NF-κB que induz liberação do fator de necrose tumoral (TNF-α) que na cavidade oral é responsável pela destruição alveolar e

tecido periodontal conjuntivo. Fator este que também está relacionado a destruição em casos de neoplasias, doenças que estão cada vez mais presentes na Medicina Veterinária

Segundo Huth et al. (2007) a inibição de liberação do TNF não ocorre em todas as condições da aplicação da água ozonizada. Para que isso aconteça supõe-se que a água ozonizada não promova um estresse oxidativo imediato. Age sobre aminoácidos levando uma produção de moléculas modificadas que interagem com os sistemas de sinalização celular prevenindo a liberação de subprodutos da peroxidação lipídica, como a 4-hidroxinonenal.

A discussão permite entender que os resultados foram semelhantes quando a ação da inibição da liberação do TNF, pela via sistêmica o que podem indicar um grande avanço conferindo ao ozônio propriedades antiinflamatórias.

Partindo para a ação do óleo ozonizado, ele atua através da formação dos triazonídeos (subprodutos do óleo ozonizado) que gera peróxidos de hidrogênio (SECHI et al., 2001; BOCCI, 2005). Seu preparo requer um tempo maior para incorporação do ozônio, por volta de um a dois dias, mas de forma muito vantajosa apresenta maior tempo de ação, chegando até 2 anos (BOCCI, 2005). Além da atividade antimicrobiana, foi reconhecida também a ação de reparação em feridas (RODRIGUES et al., 2004; CRUZ et al., 2008).

Os achados do óleo ozonizado aproximam-se aos da água ozonizada, tendo como vantagem o tempo de trabalho maior além das propriedades cicatriciais.

As contra-indicações estão relacionadas principalmente à inalação do ozônio sobre a forma de gás. Ele é usado como método para teste de substâncias broncoconstritoras por ter sua curva de dose-resposta conhecida (SOMMER et al., 2001); faz com que as vias aéreas fiquem hiperresponsivas e exacerbe doenças já existentes como asma, doenças obstrutivas crônicas e síndrome do desconforto respiratório (WAGNER et al., 2003; WILLIAMS et al., 2007; CIENCEWICKI et al., 2008). Tendo em vista essas informações, com a utilização da água e óleo ozonizados o risco de inalação é mínimo, o que torna o método seguro para sua utilização. Substâncias catalisadoras ou altas temperaturas já descritas anteriormente podem ser utilizadas para evitar a dispersão do gás no meio ambiente.

A discussão dos diferentes artigos descritos demonstrou a ação positiva do ozônio sobre alguns microrganismos que poderão ser encontrados na cavidade oral

de animais domésticos, permitindo a extrapolação dos dados. Algumas contradições poderão ter como justificativa o desconhecimento da dose e tempo ideal de aplicação.

Em resumo conclui-se que os efeitos biológicos e as possibilidades terapêuticas do ozônio podem ser obtidas nas mais variadas formas. Com relação ao efeito imunomodulador, sabe-se que há um aumento da produção de antioxidantes com objetivo principal de proteção contra as espécies reativas do oxigênio. Isso é importante em casos de doenças como diabetes, síndrome de reperfusão, no entanto, seus efeitos antiinflamatórios ainda não possuem seu mecanismo totalmente conhecido. Atualmente sabe-se que há inibição da liberação de fator de necrose tumoral, o que é um grande começo. Para a aplicação na Odontologia Veterinária, sugere-se o aperfeiçoamento dos estudos no que diz respeito a essa atividade.

A aplicação com objetivos antimicrobianos já apresenta resultados favoráveis na literatura. Esta revisão pôde confirmar que a água ozonizada e o óleo mostraram-se a melhor opção. O ozônio tem efeito antimicrobiano reconhecido, principalmente, em microrganismos suspensos e biocompatível com células orais e tem indicativo de desencadear ação antiinflamatória, além de baixo risco de inalação. Neste caso torna-se a proposta de uso na Medicina Veterinária, mais especificamente, Odontologia Veterinária.

# ***Conclusão***

## 4 CONCLUSÃO

A revisão da literatura sobre o assunto permitiu concluir que:

O ozônio apresenta duas principais formas de ação, a imunomodulação e ação antimicrobiana. A primeira relacionada à capacidade do ozônio em induzir liberação de antioxidantes e modular liberação de agentes pró-inflamatórios (como as citocinas). A segunda relacionada à propriedade de inativação de microrganismos. É um gás reativo e tóxico ao sistema respiratório que, sob condições controladas, apresenta evidências científicas que comprovam a contribuição para a qualidade de vida de indivíduos e populações. Sendo necessária a seleção da melhor forma de aplicação para o planejamento dos tratamentos e necessidades desejadas. Seu potencial terapêutico permite a aplicação de diversas formas. A ozonioterapia constitui então uma proposta coadjuvante altamente promissora diante da necessidade do controle da infecção.

Com vista nos trabalhos aqui agrupados, acredita-se que a água ozonizada e o óleo ozonizado são as melhores formas de utilização do ozônio, para a aplicação na Odontologia Veterinária. Sugere-se que novas pesquisas agora, voltadas a essa área possam ser desenvolvidas, principalmente no que visa a sua biocompatibilidade a possível ação antiinflamatória.

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

AGRILLO, A.; PETRUCCI, M. T.; TELDALDI, M.; MUSTAZZA, M. C.; MARINO, S. M. F.; GALLUCI, C.; IANNETTI, G. New therapeutic protocol in the treatment of avascular necrosis of the jaws. **Journal Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 6, p.1080-1083, 2006.

AL-DALAIN, S. M.; MARTINEZ, G.; CANDELARIO-JALIL, E.; MENÉNDEZ, S.; RE, L.; GIULIANI, A.; LEÓN, O. S. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. **Pharmacological Research**, v. 44, n. 5, p. 391-396, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA, Ozonioterapia, [200-]. Disponível em: <[http://aboz.org.br/Web/secoes\\_site.asp?id=1](http://aboz.org.br/Web/secoes_site.asp?id=1)>. Acesso em: dez. 2008.

ALVES, G. E. S.; ABREU, J. M. G.; RIBEIRO-FILHO, J. D.; MUZZI, L. A. L.; OLIVEIRA, H. P.; TANNUS, R. J.; BUCHANAN, T. Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 445-437, 2004.

ANDREULA, C. F.; SIMONETTI, L.; SANTIS, F.; AGATI, R.; RICCI, R.; LEONARDI, M. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. **American Journal of Neuroradiology**, v. 24, n. 5, p. 996-1000, 2003.

ARITA, M.; NAGAYOSHI, M.; FUKUIZUMI, T.; OKINAGA, T.; MASUMI, S.; MORIKAWA, M.; KAKINOK, Y.; NISHIHARA, T. Microbicidal efficacy of ozonated water against *Candida albicans* adhering to acrylic denture plates. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 4, p. 206-210, 2005.

BAYSAN, A.; BEIGHTON, D. Assessment of the ozone-mediated killing of bacteria in infected dentine associated with non-cavitated occlusal carious lesions. **Caries Research**, v. 41, n. 5, p. 337-341, 2007.

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

BAYSAN, A.; LYNCH, E. The use of ozone in dentistry and medicine, **Primary Dental Care**, v. 12, n. 2, p. 47-52, 2005.

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

BEZIRTZOGLU, E.; CRETOIU, S. M.; MOLDOVEANU, M.; ALEXPOULOS, A.; LAZAR, V.; NAKOU, M. A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. **Journal of Dentistry**, v. 36, n. 8, p. 600-605, 2008.

BOCCI, V. **Ozone: a new medical drug**. Dordrecht: The Netherlands, 2005.

BOCCI, V. Ozone as a bioregulator. Pharmacology and toxicology of ozonotherapy today. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, v. 19, n. 2/3, p. 31-53, 1996.

BOCCI, V. Ozone as a janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of inflammation**. v. 13, n. 1, p.3-11, 2004.

BOCCI, V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. **State of the Art. Archives of Medical Research**, v. 37, n. 4, p. 425-435, 2006.

BOCCI, V. The case for oxygen-ozonotherapy. **British Journal of Biomedical Science**, v. 64, n. 1, p. 44-49, 2007.

BOCCI, V.; ALDINUCCI, L.; BIANCHI, L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. **Rivista Italiana di Ossigeno-ozonoterapia**, v. 4, n. 1, p. 30-39, 2005.

BOCCI, V.; VALACCHI, G.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; PACCAGNINI, E.; PUCCI, A. M.; SIMPLICIO, P. Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. **Platelets**, v. 10, n. 2-3, p. 110-116, 1999.

CANDELARIO-JALIL, E.; MOHAMMED-AL-DALAIN, S.; FERNÁNDEZ, O. S.; MENÉNDEZ, S.; PÉREZ-DAVISON, G.; MERINO, N.; SAM, S.; AJAMIEH, H.H. Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 297-301, 2001.

CARDOSO, M. G.; de OLIVEIRA, L. D.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and

endotoxins. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 105, n. 3, p. 85-91, 2008.

CHEN, H.; XING, B.; LIU, X.; ZHAN, B.; ZHOU, J.; ZHU, H.; CHEN, Z. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide. **Journal of Surgical Research**, v. 149, n. 2, p. 287-295, 2008.

CIENCEWICKI, J.; TRIVEDI, S.; KLEEBERGER, S. R. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases, **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v. 122, n. 3, p. 456-468, 2008.

CRUZ, H. F. O.; BONETTI FILHO, I.; AMPUERO, B. P. L. Evaluación "in vitro" de la asociación del efecto antimicrobiano del ozono unido a vehículos y medicamentos de acción prolongada. **Acta Odontológica Venezolana**, v. 46, n. 2, p. 1-9, 2008.

DEBOWES, L. J. The effects of dental disease on systemic disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 28, n. 5, p.1057-1062, 1998.

DEBOWES, L. J.; MOSIER, D.; LOGAN, E.; HARVEY, C. E.; LOWRY, S.; RICHARDSON, D. C. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.13, n. 2, p. 57-60, 1996.

DI PAOLO, N.; GAGGIOTTI, E.; GALLI, F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. **Redox Report**, v. 10, n. 3, p. 121-130, 2005.

ELLIOTT, D. R.; WILSON, M.; BUCKLEY, C. M. F.; SPRATT, D. A. Cultivable oral microbiota of domestic dogs, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5470-5476, 2005.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; DECURCIO, D. A.; SILVA, J. A.; BAMMANN, L. L. Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 2, p. 134-138, 2006.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; DECURCIO, D. A.; HOLLANDA, A. C. B.; SILVA, J. A. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 2, p. 85-93, 2007.

FAGRELL, T. G.; DIETZ, W.; LINGSTRÖM, P.; STEINIGER, F.; NÓREN, J. G. Effect of ozone treatment on different cariogenic microorganisms *in vitro*. **Swedish Dental Journal**, v. 32, n. 3, p.139-147, 2008.

FINCH, G. R. ; BLACK, E. K.; LABATUK, C. W.; GYÜRÉK, L. BELOSEVIC, M. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyts inactivation by ozone. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3674-3680, 1993.

GALLARDO, D. G.; ULECIAL, K. M.; ÁLVAREZ, R. G. El acondicionamiento oxidativo con ozono como estrategia para restaurar el equilibrio redox em el Shock Séptico. **REDVET**, v. 9, n. 4, 2008. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040804.pdf> >. Acesso em: dez. 2008.

GLAZE, W. Reaction products of ozone: a review. **Environmental Health Perspectives**. v. 69, p.151-157, 1986.

GONZALÉZ, R.; BORREGO, A.; ZAMORA, Z.; ROMAY, C.; HERNÁNDEZ, F.; MENÉNDEZ, S.; MONTERO, T.; ROJOS, E. Reversion by ozone treatment of acute nephotoxicity induced by cisplatin in rats. **Mediators of Inflammation**, v. 13, n. 5/6, p. 307-312, 2004.

GUERRA, O. C.; CEPERO, S. M.; JORDÁN, M. E. M.; VÁZQUEZ, T. C. Aplicación de La ozonoterapia em el tratamiento de La alveolitis. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 34, n. 1, p. 21-24, 1997.

HARVEY, C. E.; THORNSBERRY, C.; MILLER, B. R. Subgingival bacteria – Comparison of culture results in dogs and cats with gingivitis, **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 12, n. 4, p. 147-150, 1995.

HEMS, R. S.; GULABIVALA, K.; NG, Y. L.; READY, D.; SPRATT, D. A. An *in vitro* evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 1, p. 22-29, 2005.

HUTH, K. C.; JAKOB, F. M.; SAUGEL, B.; CAPPELLO, C.; PASCHOS, E.; HOLLWECK, R.; HICKEL, R.; BRAND, K. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. **European Journal of Oral Sciences**, v. 114, p. 435-440, 2006.

HUTH, K. C.; SAUGEL, B.; JAKOB, F. M.; CAPPELLO, C.; QUIRLING, M.; PASCHOS, E.; ERN, K.; HICKEL, R.; BRAND, K. Effect of aqueous ozone on the NF $\kappa$ B system. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 5, p. 451-456. 2007.

IULIANO, L.; COLAVITA, A. R.; LEO, R.; PRATICÒ, D.; VIOLINI, F. Oxygen free radicals and platelet activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 6, p. 999-1006, 1997.

KOWALSKY, W. J.; BAHNFLETH, W.P.; WHITTAM, T. S. Bactericidal effects of high airborne ozone concentrations on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Ozone Science & Engineering**, v. 20, n. 3, p. 205-221, 1998.

LAKE, J. C.; FELBERG, S.; MALAVAZZI, G. R.; GOULART, D. A.; NISHIWAKI-DANTAS, M. C.; DANTAS, P. E. C. Efeito terapêutico da aplicação intra-ocular de ozônio em modelo experimental de endoftalmite por *Staphylococcus epidermitis* em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 4, p. 575-579, 2004.

LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HASSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio de ozonização. In: GONÇALVES, R. F. **Desinfecção de efluentes sanitários**. Rio de Janeiro: RiMa Artes e Textos, 2003. Projeto PROSAB, p. 170-209. Disponível em: <<http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabRicardo.pdf>> . Acesso em: 26 nov. 2008.

LEÓN, O. S.; MENÉNDEZ, S.; MERINO, N.; CASTILLO, R.; SAM, S.; PÉREZ, L.; CRUZ, E.; BOCCI, V. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals **Mediators of inflammation** v.7, n. 4, p. 289-294, 1998.

LEÓN-HERNANDEZ, O. S, AJAMIEH, H. H.; BERLANGA, L. MENÉNDEZ, S. VIEBAHN-HÁNSLER, R.; CARMONA, A. M. Ozone oxidative preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in a rat model of liver ischemia/reperfusion. **Transplant International**, v. 21, n. 1, p. 39-48, 2008.

LIE-JIE LI, YUN-GAO YANG; ZHI-LING ZHANG, SUI-FENG NIE, ZE LI, FENG LI, HE-YU HUA, YAN-JUN HU; HONG-SHUAN ZHANG, YA-BING GUO Protective effects of medical ozone combined with traditional chinese medicine against chemically-induced hepatic injury in dogs. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 45, p. 5989-5994, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIPPOLIS, M.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Avaliação da microbiota bacteriana aeróbia isolada da cavidade oral de cães errantes do município de Guarulhos, Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, supl., p. 243-518, 2004.

MARTINÉZ-SANCHEZ, G.; AL-DALAIN, S. M.; MENÉNDEZ, S.; RE, L.; GIULIANI, A.; CANDELARIO-JALIL, E.; ALVAREZ, H.; FERNÁNDEZ-MONTEQUIN, J. I.; LEÓN, O. S. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. **European Journal of Pharmacology**, v. 523, p. 151-161, 2005.

MÜLLER, P.; GUGGENHEIM, B.; SCHMIDLIN, P. R. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. **European Journal of Oral Sciences**, v. 115, n. 1, p. 77-80, 2007.

MURRAY, B. K.; OHMINE, S.; TOMER, D. P.; JENSEN, K. J.; JOHNSON, F. B.; KIIRSI, J. J.; ROBINSON, R. A.; O'NEILL, K. L. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. **Journal of Virological Methods**, v. 153, n. 1, p. 74-77, 2008.

NAGAYOSHI, M.; FUKUIZUMI, T.; KITAMURA, C.; YANO, J.; TERASHITA, M.; NISHIHARA, T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 4, p. 240-246, 2004a.

NAGAYOSHI, M.; KITAMURA, C.; FUKUIZUMI, T.; NISHIHARA, T.; TERASHITA, M.; Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 11, p. 778-781, 2004b.

NAOUM, P. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial, *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 23, n. 2, p. 15-23, 2001.

OGATA, A.; NAGAHATA, H. Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 7, p. 681-686, 2000.

PEREIRA, M. M. S.; NAVARINI, A.; MIMICA, L. M. J.; PACHECO JR., A. M.; ALTENFELDER, R. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano. Estudo experimental "*in vitro*". **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 1, p. 12-14, 2005.

PEREIRA, M. T. C.; RIBEIRA, S. C. A.; CARVALHO, S. F. M. Revisão sobre o uso do ozônio no tratamento da mastite bovina e a melhora da qualidade do leite. **Journal of Biosciences** v. 19, n. 2, p. 109-114, 2003.

RADICE, M.; MARTINO, P. A.; REITER, A. M. Evaluation of subgingival bacteria in the susceptibility to commonly used antibiotics. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 23, n. 4, p. 219-224, 2006.

RICKLOFF, J. R. An evaluation of the sporicidal activity of ozone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 683-686, 1987.

RODRIGUES, K. L.; CARDOSO, C. C.; CAPUTO, L. R.; CARVALHO, J. C.; FIORI, J. E.; SCHNEEDORF, J. M. Cicatrizing and antimicrobial properties of na ozonized oil from sunflower seeds. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 261-270, 2004.

RUBIN, M. B. The history of ozone. The Schönbein period, 1839-1868. **Bulletin of the History of Medicine**, v. 26, n. 1, p. 40-56, 2001.

SECHI, L. A. ; LEZCANO, I.; NUNEZ, N. ; ESPIM, M.; DUPRÈ, I.; PINNA, P. MOLICOTTI, G.; FADDA G.; ZANETTI, S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone) **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 279-284, 2001.

SHARMA, M.; HUDSON, J. B. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. **American Journal of Infection Control**, v. 36, n. 8, p. 559-563, 2008.

SHINOZUKA, Y.; UEMATSU, K.; TAKAGI, M.; TAURA, Y. Comparison of the amounts of endotoxin released from *Escherichia coli* after exposure to antibiotics and ozone: an *in vitro* evaluation. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 4, p. 419-422, 2008.

SCOTT, D. B.; LESHER, E. C. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, n. 3, p. 567-576, 1963.

SOMMER, B.; VARGAS, M. H.; CHAVEZ, J. CARBAJAL, V.; SEGURA, P.; MONTAÑO, L.M. Differences between inhaled and intravenous bronchial challenge to detect O<sub>3</sub> – induced hyperresponsiveness. **Journal of Applied Physiology**, v 91, n. 6, p. 2595-2601, 2001.

THANOMSUB, B.; ANUPUNPISIT, V.; CHANPHETCH, S.; WATCHARACHAIPONG, T.; POONKHUM, R.; SRISUKONTH, C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 48, p. 193-199, 2002.

TORRES, E. A. F. S.; REGÊ FERREIRA, A. F.; RÍMOLI, C. D. Estudo das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 42, p. 18-23, 1996.

VALACCHI, G.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. **Mediators of Inflammation**, v. 8, n.4-5, p. 205-209, 1999.

VAUGHN, J. M.; CHEN, Y. S.; NOVOTNY, J. F.; STROUT, D. Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 36, n. 8, p. 557-560, 1990.

VELANO, H. E.; NASCIMENTO, L. C. do; BARROS, L. M. de; PANZERI, H. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 18-22, 2001.

VIEHNBAN-HAESLER, R. The use of ozone in medicine: Mechanisms of action, 2003, p. 1-28, Munique. Disponível em: <<http://www.dreddyclinic.com/ozone/MechanismofAction.pdf>> . Acesso em: 20 nov. 2008.

WAGNER, J. G.; DYKEN, S. J. V.; WIRENGA, J. R.; HOTCHKISS, J. A.; HARKEMA, J. R. Ozone exposure enhances endotoxin-induced mucous cell metaplasia in rat pulmonary airways. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 2, p.437-446, 2003.

WEI, C. J.; LI, Y. H., CHEN, Y., WANG, J. Y.; ZENG, Q, L., ZHAO J. B. MEI, Q.L. Percutaneous intradiscal oxygen-ozone injection for lumbar disc herniation: no need of perioperative antibiotic prophylaxis. **Journal of Southern Medical University**, v. 27, n. 3, p. 384-386, 2007.

WICKRAMANAYAKE, G. B.; RUBIN, A. J.; SPROUL, O. J. Inactivation of giardia lamblia cysts with ozone, **Applied and environmental microbiology**, v.48, n. 3, p. 671-672, 1984.

WILLIAMS, A. S.; LEUNG, S. Y.; NATH, P.; KHORASANI, N. M.; BHAVSAR, P.; ISSA, R.; MITCHELL, J. A.; ADCOCK, I. M.; CHUNG, K. F. Role of TLR2, TLR4, and MyD88 in murine ozone-induced airway hyperresponsiveness and neutrophilia, **Journal of Applied Physiology**, v. 103, p. 1189-1195, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Air quality and health, 2008 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/>>. Acesso em: dez, 2008.

YOUNG, S. B.; SETLOW, P. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1133-1142, 2004.

ZAMORA, Z. B. ; BORREGO, A.; LÓPEZ, O. Y.; DELGADO, R.; GONZÁLEZ, R. MENÉNDEZ, S.; HERNÁNDEZ, F.; SCHULZ, S. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF- $\alpha$  release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. **Mediators of inflammation**, v. 2005, n. 1, p. 16-22, 2005.