

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/03/2028.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Breno Augusto Mackert Mourão

**Avaliação da ação antimicrobiana do óleo de uva e oliva ozonizados em
biofilmes bacterianos: estudo *in vitro***

Araraquara

2026



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Breno Augusto Mackert Mourão

**Avaliação da ação antimicrobiana do óleo de uva e oliva ozonizados em
biofilmes bacterianos: estudo *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Leal Zandim-Barcelos

Araraquara

2026

M929a Mourão, Breno Augusto Mackert
Avaliação da ação antimicrobiana do óleo de uva e oliva
ozonizados em biofilmes bacterianos : estudo in vitro / Breno
Augusto Mackert Mourão. -- Araraquara, 2026
39 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Daniela Leal Zandim-Barcelos

1. Ozonioterapia. 2. Biofilmes. 3. Doenças periodontais. I.
Título.

Breno Augusto Mackert Mourão

**Avaliação da ação antimicrobiana do óleo de uva e oliva ozonizados em
biofilmes bacterianos: estudo *in vitro***

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

2ª Examinadora: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli

3ª Examinadora: Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

Araraquara, 31 de março de 2026.

DADOS CURRICULARES

Breno Augusto Mackert Mourão

NASCIMENTO: 13/01/2001 – São Carlos - SP

FILIAÇÃO: Maria José Mackert e Carlos Alberto Mourão

2020-2023: Graduação em Odontologia – Universidade de Araraquara (UNIARA)

2024-2026: Pós-graduação em Odontologia. Área de concentração em Periodontia –
Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço-te, ó Deus, porque estou cheio de tua presença. Agradeço-te, porque vivo e me movo em Ti. Agradeço-te, porque vivo em Tua vida, verdade, saúde, prosperidade, paz, sabedoria, alegria e amor. Agradeço-te por todos que sentiram a sua presença.

Minha mãe Maria, meu pai Carlos e meu irmão Pietro, meu alicerce e base que me sustentaram e me apoiam até os dias de hoje. Assim como meus avós, Isabel, Walter, Ramiro, Jorge e Thereza. Amo cada um de vocês.

Minha orientadora Daniela, por sempre ter me apoiado e confiado no meu potencial como discente, saiba que já queria ser seu aluno orientado mesmo antes de prestar o processo seletivo. Sou muito grato por todo aprendizado e oportunidades nesses dois anos caminhando juntos.

Ao meu amigo e parceiro de laboratório Guilherme, muito obrigado por ter caminhado ao meu lado nesses dois anos e ter me apoiado nos experimentos, saiba que você teve um papel fundamental durante minha formação como aluno de mestrado.

A todos os professores e professoras, funcionários e funcionárias, amigos e amigas e pacientes que tive o privilégio de conviver dentro da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr/UNESP. Cada um (a), somaram no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Programa de Incentivo à Pesquisa Philozon (PIP 03) e à comissão científica da Philozon & Ozoncare pelo apoio técnico e pelo fornecimento de recursos materiais essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Este estudo contou ainda com o suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil (Código de financiamento 001; processo nº 88887.965059/2024-00).

Mourão BAM. Avaliação da ação antimicrobiana do óleo de oliva e uva ozonizados em biofilmes bacterianos: estudo in vitro [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2026.

RESUMO

O tratamento periodontal convencional baseia-se na raspagem e alisamento radicular (RAR), considerada a terapia padrão. Entretanto, a eficácia dessa abordagem pode ser limitada, principalmente em casos nos quais há dificuldade de acesso às superfícies radiculares, com persistência de periodontopatógenos em bolsas profundas, concavidades ou furcas, e pela capacidade de algumas bactérias de invadir os tecidos periodontais adjacentes. Diante dessas limitações, terapias complementares vêm sendo estudadas com o objetivo de potencializar os resultados da RAR. Entre essas alternativas, destaca-se a ozonioterapia, cuja aplicação tópica pode ocorrer por meio de gás, água ou óleos ozonizados. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos de oliva e de uva ozonizados, em diferentes concentrações, frente a biofilmes monoespécies formados por bactérias associadas às doenças periodontais. Para isso, foram cultivados biofilmes monoespécies de *Streptococcus oralis* (So) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) sob condições controladas de crescimento. Em seguida, os biofilmes foram expostos aos óleos ozonizados de oliva e uva nas concentrações de 100% e 50%, durante 1 minuto. As versões puras dos óleos também foram testadas com o mesmo tempo de exposição. Todos os experimentos foram realizados em três repetições independentes em triplicata, incluindo um controle negativo e um controle positivo com clorexidina a 0,12%. Após o tratamento, foi efetuada a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) por meio de contagem de colônias, sendo os resultados expressos em UFC/mL. Os resultados demonstraram que os óleos ozonizados promoveram redução significativa da contagem bacteriana em ambas as espécies avaliadas, especialmente nas formulações de maior concentração. O óleo de oliva ozonizado a 100% apresentou as menores médias de UFC/mL, com reduções aproximadas de 2,7 log₁₀ para Aa e 2,5 log₁₀ para So em relação ao controle negativo. O óleo de uva ozonizado a 100% também apresentou efeito antimicrobiano relevante, com reduções aproximadas de 2,4 log₁₀ para Aa e 1,4 log₁₀ para So em relação ao controle negativo. Além disso, os óleos ozonizados apresentaram maior atividade antimicrobiana quando comparados aos respectivos óleos não ozonizados e apenas o óleo de uva ozonizado diluído não apresentou desempenho superior ao controle positivo com clorexidina. Conclui-se que os óleos de oliva e de uva ozonizados sem diluição apresentam relevante atividade antimicrobiana após um curto período de exposição contra biofilmes bacterianos associados à doença periodontal, podendo representar uma alternativa promissora como terapia complementar no tratamento periodontal.

Palavras – chave: Ozonioterapia; Biofilmes; Doenças periodontais.

Mourão BAM. Evaluation of the antimicrobial activity of ozonated olive and grape oils on bacterial biofilms: in vitro study [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2026.

ABSTRACT

Conventional periodontal treatment is based on scaling and root planing (SRP), which is considered the gold-standard therapy. However, the effectiveness of this approach may be limited, particularly in cases where access to root surfaces is difficult, allowing the persistence of periodontopathogens in deep periodontal pockets, concavities, or furcation areas, as well as due to the ability of certain bacteria to invade adjacent periodontal tissues. In light of these limitations, adjunctive therapies have been investigated to enhance the outcomes of SRP. Among these alternatives, ozone therapy has emerged as a promising approach, which can be applied topically in the form of gas, ozonated water, or ozonized oils. In this context, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of ozonized olive and grape oils, at different concentrations, against monospecies biofilms formed by bacteria associated with periodontal disease. For this purpose, monospecies biofilms of *Streptococcus oralis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* were cultivated under controlled growth conditions. Subsequently, the biofilms were exposed to ozonized olive and grape oils at concentrations of 100% and 50% for 1 minute. The pure forms of the oils were also tested under the same exposure conditions. All experiments were performed in three independent repetitions in triplicate, including a negative control and a positive control with 0.12% chlorhexidine. After treatment, colony-forming units (CFU) were quantified by colony counting, and the results were expressed as CFU/mL. The results demonstrated that ozonized oils promoted a significant reduction in bacterial counts in both evaluated species, particularly in the higher concentration formulations, with 100% ozonized olive oil showing the lowest mean CFU/mL values, achieving approximate reductions of 2.7 log₁₀ for *A. actinomycetemcomitans* and 2.5 log₁₀ for *S. oralis*. Ozonized grape oil also exhibited relevant antimicrobial effects, with approximate reductions of 2.4 log₁₀ for *A. actinomycetemcomitans* and 1.4 log₁₀ for *S. oralis* compared to the negative control. Additionally, ozonized oils showed greater antimicrobial activity when compared to their respective non-ozonized counterparts, and only diluted ozonized grape oil did not demonstrate superior performance compared to the positive control with chlorhexidine. It can be concluded that undiluted ozonized olive and grape oils exhibit relevant antimicrobial activity after a short exposure time against bacterial biofilms associated with periodontal disease and may represent a promising adjunctive approach in periodontal therapy.

Keywords: Ozone therapy; Biofilms; Periodontal diseases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 PROPOSIÇÃO.....	12
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
3.1 Biofilme oral e as bactérias <i>S. oralis</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i>	13
3.2 Histórico da ozonioterapia.....	16
3.3 Mecanismos de ação do óleo ozonizado.....	17
3.4 Uso dos óleos ozonizados na periodontia	18
4 MATERIAL E MÉTODO	22
4.1 Cepas bacterianas, condições de crescimento e formação de biofilme.....	22
4.2 Óleos de oliva e uva ozonizados e diluições	22
4.3 Tratamento de biofilmes monoespécies	24
4.4 Análise de unidades formadoras de colônias (UFC).....	25
4.5 Análise estatística dos dados.....	25
5 RESULTADOS	26
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal está entre as doenças inflamatórias mais prevalentes em nível global, entre 20 e 50% de prevalência em todo mundo, podendo variar desde inflamação gengival reversível até uma destruição progressiva do osso alveolar¹⁻⁴. Sua etiologia é complexa e envolve a interação de microrganismos patogênicos com a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, sendo mediada por fatores de risco sistêmicos ou locais. Dentre os fatores modificadores e predisponentes pode-se destacar o tabagismo, hiperglicemia, fatores nutricionais, agentes farmacológicos, hormônios esteroides sexuais (puberdade; gravidez), condições hematológicas, secura bucal e fatores de retenção de biofilme dental¹⁻⁶. A doença periodontal tem como um dos seus principais fatores etiológicos a formação e acúmulo do biofilme dental, uma comunidade microbiana altamente complexa que pode abrigar diversas espécies bacterianas distintas. Esse biofilme não apenas se adere firmemente às superfícies dentárias e ao sulco gengival, como também estabelece um microambiente propício para a sobrevivência de microrganismos anaeróbios, favorecendo alterações na microbiota residente. Esse desequilíbrio, conhecido como disbiose, altera o estado de saúde bucal e pode desencadear processos inflamatórios crônicos que, quando não controlados, resultam na formação de bolsas periodontais e consequente destruição dos tecidos de suporte dental^{7,8}.

No manejo clínico da periodontite, a terapia periodontal não-cirúrgica ainda representa a primeira opção de tratamento. Essa abordagem envolve procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR) que visam a remoção mecânica do biofilme e depósitos de cálculo, podendo ser realizados com instrumentos manuais ou ultrassônicos. Apesar dos resultados clínicos positivos obtidos com RAR⁵⁻⁷, esta terapia pode apresentar limitações e insucessos quando abordada isoladamente em determinados casos clínicos. Assim, terapias adjuvantes têm sido investigadas em virtude do limitado acesso à superfície radicular durante RAR, da permanência de biofilme subgengival nas bolsas mais profundas, e da habilidade de algumas bactérias periodontopatogênicas em invadir tecido adjacente⁸⁻¹². Além disso, a condição sistêmica do paciente pode interferir na resolução do processo inflamatório após o procedimento de RAR. Terapias adjuvantes, como a antibioticoterapia e a aplicação de laser e produtos oxigenados, também têm sido incorporadas com o objetivo de potencializar os resultados, reduzindo a carga bacteriana subgengival e favorecendo

o equilíbrio microbiológico do periodonto⁹. Dentre estas terapias adjuvantes disponíveis, a ozonioterapia tem despertado grande interesse pela sua ação antimicrobiana, anti-inflamatória e potencial de estimular a reparação tecidual. Essa modalidade terapêutica pode ser aplicada de diferentes formas no contexto periodontal, incluindo a irrigação do sulco gengival com soluções aquosas ozonizadas, a insuflação direta de gás ozônio nas bolsas periodontais, a utilização conjunta da água ozonizada durante o desbridamento ultrassônico e até o uso tópico dos óleos vegetais ozonizados nos tecidos moles. Além de favorecer a desinfecção local, essas aplicações têm sido associadas a melhor cicatrização dos tecidos periodontais e ao alívio de sintomatologias dolorosas, configurando-se como uma alternativa promissora no suporte ao tratamento periodontal convencional⁹⁻¹³.

A utilização da ozonioterapia na prática odontológica foi oficialmente reconhecida e regulamentada pelo Conselho Federal de Odontologia (CFO) em 2015, através da resolução nº 166/2015, o que possibilitou sua inserção de forma segura e ética em diferentes especialidades¹⁴. Desde então, a aplicação clínica dessa terapia tem se mostrado bastante versátil, sendo mais frequentemente indicada no manejo de condições como úlceras aftosas recorrentes, mucosite oral associada a tratamentos oncológicos e distúrbios da articulação temporomandibular (DTM). Além dessas indicações mais consolidadas, o uso do ozônio também vem sendo explorado em múltiplas áreas da Odontologia, incluindo a Periodontia (como recurso adjuvante no controle da infecção e inflamação), a Prótese dentária (pela sua ação antimicrobiana na descontaminação de superfícies protéticas), a Implantodontia (auxiliando na desinfecção de implantes e cicatrização tecidual), a Odontologia restauradora (pela sua capacidade de reduzir a carga microbiana em lesões cariosas), a Endodontia (como coadjuvante na desinfecção do sistema de canais radiculares) e a Cirurgia Bucomaxilofacial (contribuindo para uma melhor reparação tecidual e redução do risco de infecção). Dessa forma, a ozonioterapia se apresenta como uma ferramenta terapêutica complementar, com amplo potencial de aplicação clínica na Odontologia moderna¹⁴⁻¹⁶.

A aplicação tópica do ozônio pode ser feita na forma de gás, água e óleo. O óleo ozonizado, é produzido por um processo industrial que resulta em uma maior biocompatibilidade quando comparado às outras formas de aplicação, pois durante o processo de insuflação do ozônio em um óleo monoinsaturado (ozonólise) cria-se uma forma estável dos subprodutos da molécula¹⁷. Além da estabilidade, o óleo possibilita

armazenamento por mais tempo, facilidade na aplicação, uso fora dos consultórios por parte do paciente e reduz os riscos quando comparado à aplicação do gás¹⁸.

Seu mecanismo de ação baseia-se na produção de radicais livres levando a um quadro agudo e estresse oxidativo controlado em células humanas, resultando na modulação da resposta antioxidante, metabolismo do oxigênio e energia celular, o que promove respostas biológicas positivas. Além disso, a alta solubilidade e instabilidade do ozônio garantem toda a sua absorção e previne a toxicidade nos tecidos¹⁹. Uma vez que a maioria das bactérias relacionadas às doenças periodontais são anaeróbicas, a liberação de oxidantes pode contribuir para redução do crescimento bacteriano pelo aumento da tensão de oxigênio no biofilme subgengival e por danos nos componentes intracelulares²⁰.

Até o momento, a literatura apresenta poucos estudos clínicos que investigaram os efeitos do óleo de oliva ozonizado no manejo da periodontite. No estudo conduzido por Patel et al.²¹ (2012), avaliou-se a eficácia desse óleo tanto como monoterapia quanto como terapia adjuvante à raspagem e alisamento radicular (RAR) em pacientes com periodontite crônica. Os resultados indicaram que a aplicação do óleo ozonizado após a RAR promoveu melhora significativa nos parâmetros clínicos e microbiológicos ao longo de todo o período de acompanhamento, quando comparado ao grupo controle. Além disso, observou-se que o óleo de oliva ozonizado apresentou eficácia até mesmo quando utilizado isoladamente. Embora não tenham sido registrados efeitos adversos relevantes, verificou-se aumento da hipersensibilidade dentinária cervical em pacientes submetidos à combinação de RAR com a aplicação do óleo. Em um estudo mais recente, Nambiar et al.²² (2022) compararam a eficácia da aplicação local de clorexidina e do óleo de oliva ozonizado como terapias adjuvantes à RAR. Após três meses de acompanhamento, ambos os grupos apresentaram melhorias clínicas significativas, sem diferenças estatísticas entre os tratamentos. Esses achados reforçam a possibilidade de que o óleo de oliva ozonizado possa ser um recurso terapêutico promissor, capaz de potencializar os efeitos da RAR no controle da periodontite. No entanto, esses estudos apresentam algumas limitações importantes, como amostras relativamente reduzidas, períodos de acompanhamento curtos e avaliação restrita principalmente a parâmetros clínicos periodontais. Além disso, ainda são escassas as investigações que analisam de forma mais detalhada a atividade antimicrobiana do óleo de oliva ozonizado sobre microrganismos específicos associados à doença periodontal, bem como os efeitos

de diferentes concentrações e formulações do produto sobre biofilmes bacterianos. Nesse sentido, estudos experimentais *in vitro* tornam-se relevantes, pois permitem avaliar de maneira controlada a ação antimicrobiana dessas substâncias sobre espécies bacterianas específicas, contribuindo para melhor compreensão de seus mecanismos de ação e para fundamentar futuras investigações clínicas.

Não foram encontrados na literatura trabalhos clínicos que investigaram o uso do óleo de uva ozonizado como terapia adjuvante à RAR. Da mesma forma, também não foram identificados estudos *in vitro* que avaliaram especificamente o efeito antimicrobiano desse óleo frente a microrganismos periodontopatogênicos de relevância clínica. Considerando essa lacuna, o presente estudo teve como objetivo analisar a atividade antimicrobiana tanto do óleo de oliva como do óleo de uva ozonizados sobre biofilmes monoespécies formados por *Streptococcus oralis* e por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, patógenos associados ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal. Outro ponto importante a destacar é que o efeito antimicrobiano e bioestimulador do ozônio pode variar dependendo das vias, concentração e métodos de aplicação utilizados. Como não existe na literatura protocolos padronizados de aplicação nem um consenso em relação aos parâmetros ideais da ozonioterapia para utilização como terapia adjunta no tratamento das doenças periodontais, propusemos o presente estudo *in vitro* para avaliar a ação antimicrobiana de dois óleos ozonizados contra biofilmes monoespécies de bactérias associadas às doenças periodontais. Biofilmes associados às doenças periodontais ainda representam um desafio significativo na prática clínica. Portanto, compreender a efetividade destes produtos ozonizados contra biofilmes periodontopatogênicos irá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e mais eficientes no combate às doenças periodontais.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os óleos de oliva e de uva ozonizados apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra os biofilmes de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Streptococcus oralis*. De modo geral, as formulações ozonizadas demonstraram maior eficácia na redução da contagem bacteriana quando comparadas aos respectivos óleos não ozonizados e aos controles, destacando-se especialmente o óleo de oliva ozonizado na concentração de 100%, que apresentou as maiores reduções de unidades formadoras de colônia em ambas as espécies bacterianas avaliadas. Adicionalmente, os resultados indicam que o óleo de uva ozonizado não apresentou desempenho superior ao óleo de oliva, não demonstrando vantagens em relação a este no contexto das condições experimentais analisadas.

REFERÊNCIAS*

1. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017; 11(2): 72-80.
2. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018; 45 (Supl 20): S1-S8.
3. Ng E, Tay JRH, Ong MMA. Minimally invasive periodontology: a treatment philosophy and suggested approach. *Int J Dent*. 2021; 22;2021: 2810264.
4. Rapone B, Ferrara E, Santacroce L, Topi S, Gnoni A, Dipalma G et al. The gaseous ozone therapy as a promising antiseptic adjuvant of periodontal treatment: a randomized controlled clinical trial. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(2): 985.
5. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 22;3: 17038.
6. Albandar JM, Susin C, Hughes FJ. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*. 2018; 45(Suppl 20): S171-S89.
7. Sen S, Sen S. Ozone therapy a new vista in dentistry: integrated review. *Med Gas Res*. 2020; 10(4):189-192.
8. Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith NL et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res*. 2019; 9(3): 163-7.
9. Rosa LR de O, Araújo JB, Aguiar KLF de, Costa MML, Ferreira VA, Marques DMC, et al. Benefícios da Ozonioterapia nas Patologias Bucomaxilofaciais. *Arch Health Invest* 2023; 12(7): 1488-94.
10. Kumar A, Bhagawati S, Tyagi P, Kumar P. Current interpretations, and scientific rationale of the ozone usage in dentistry: A systematic review of literature. *European J Gen Dent*. 2014; m3(03): 175-80.
11. Aimetti M. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Esthet Dent*. 2014; 9(2): 251-67.
12. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 324- 334.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence based perspective of scaling and root planning. *J Clin Periodontol*. 2002; 29 (Suppl. 2): 6- 16.
14. Pereira IF, Vasconcelos BCE. Estado atual da legislação acerca do uso da ozonioterapia na odontologia. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac*. 2021; 5: 5–5
15. Páez TT, Pereira PAI, Assis L, Santos L dos, Tim CR. Ozonioterapia e seus aspectos controvertidos. *Diálogos Interdisciplinares*. 2020; 9(5): 1–21.
16. Naik SV, K R, Kohli S, Zohabhasan S, Bhatia S. Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth????? *Open Dent J*. 2016;10: 196-206.
17. Sadowska J, Johansson B, Johannessen E, Friman R, Broniarz-Press L, Rosenholm JB. Characterization of ozonated vegetable oils by spectroscopic and chromatographic methods. *Chem Phys Lipids*. 2008; 151(2): 85-91.
18. Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapietra S, Dosio F. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications: their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules*. 2020; 25(2): 334.
19. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci*. 2006; 114(5): 435-40.
20. Eick S, Tigan M, Sculean A. Effect of ozone on periodontopathogenic species – An in vitro study. *Clin Oral Investig*. 2012; 16(2): 537-44.
21. Patel PV, Patel A, Kumar S, Holmes JC. Effect of subgingival application of topical ozonated olive oil in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled, double blind, clinical and microbiological study. *Minerva Stomatol*. 2012; 61(9): 381-98.
22. Nambiar S, Malothu S, Karmakar S, Varkey A, Chandra D, Chava VK. Comparison of ozonated olive oil and chlorhexidine gel as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy for the treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Pharm Bioallied Sci*. 2022; 14(Suppl 1): S94- S98.
23. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol*. 2005; 32 Suppl 6: 7-15.
24. Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, Franchi M. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol*. 2020; 20(1): 120.
25. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*. 2006;42: 47-79.

26. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*. 2009; 88(11): 982-90.
27. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000. 2006; 42: 80-7.
28. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*. 2011; 2(5): 435-44.
29. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66(3): 486-505
30. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res*. 2009; 88(11): 982-90.
31. Ellen RP, Lépine G, Nghiem PM. In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1): 33-42.
32. Maestre Vera JR, Gómez-Lus Centelles ML. Antimicrobial prophylaxis in oral surgery and dental procedures. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007; 12(1): E44-52.
33. Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam WC, Samaranayake LP. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1): 46-64.
34. Persson L, Vikerfors T, Sjöberg L, Engervall P, Tidefelt U. Increased incidence of bacteraemia due to viridans streptococci in an unselected population of patients with acute myeloid leukaemia. *Scand J Infect Dis*. 2000; 32(6): 615-21.
35. Ahmed R, Hassall T, Morland B, Gray J. Viridans streptococcus bacteremia in children on chemotherapy for cancer: an underestimated problem. *Pediatr Hematol Oncol*. 2003; 20(6): 439-44.
36. Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W. Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 55(1): 45-50.
37. Kazanci E, Oguz KK, Gurgey A, Topçu M. Streptococcus oralis as a risk factor for middle cerebral artery thrombosis. *J Child Neurol*. 2005; 20(7): 611-3.
38. Colville A, Davies W, Heneghan M, Goodwin A, Griffiths T. A rare complication of dental treatment: Streptococcus oralis meningitis. *Br Dent J*. 1993; 175(4): 133-4.
39. Gaudreau C, Delage G, Rousseau D, Cantor ED. Bacteremia caused by viridans streptococci in 71 children. *Can Med Assoc J*. 1981; 125(11): 1246-9.

40. Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol. 1985; 12(1): 1-20.
41. Christersson LA. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and localized juvenile periodontitis. Clinical, microbiologic and histologic studies. Swed Dent J Suppl. 1993; 90: 1-46.
42. Haubek D, DiRienzo JM, Tinoco EM, Westergaard J, López NJ, Chung CP, et al. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. J Clin Microbiol. 1997; 35(12): 3037-42.
43. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? Periodontol 2000. 2010; 54(1): 78-105.
44. Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. J Clin Microbiol. 2007; 45(12): 3859-69.
45. Nogales CG, Ferreira MB, Montemor AF, Rodrigues MF, Lage-Marques JL, Antoniazzi JH. Ozone therapy as an adjuvant for endodontic protocols: microbiological - ex vivo study and cytotoxicity analyses. J Appl Oral Sci. 2016; 24(6): 607-13.
46. Bitter K, Vlassakidis A, Niepel M, Hoedke D, Schulze J, Neumann K, Moter A, Noetzel J. Effects of diode laser, gaseous ozone, and medical dressings on *enterococcus faecalis* biofilms in the root canal ex vivo. Biomed Res Int. 2017; 2017: 6321850.
47. Bastos PL, Ottoboni GS, Karam AM, Sampieri MB da S, Araújo EF de. Ozone therapy in dentistry: a systematic review of literature. RSD. 2022; 11(4): e46711427474.
48. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 702, de 13 de março de 2018. Inclusão da ozonioterapia e de outras práticas integrativas e complementares no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União. (2018 mar 13) [acesso em 2025]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2018/prt0702_22_03_2018.htm
49. Bocci V. Physical-chemical properties of ozone – natural production of ozone: the toxicology of ozone. Ozone. 2010:1-4.
50. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Duprè I, Pinna A et al. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). J Appl Microbiol. 2001; 90(2): 279-84.
51. Silva V, Peirone C, Capelo JL, Igrejas G, Poeta P. Efficacy of ozonated oils: antimicrobial activity against staphylococcus aureus and candida albicans. Antibiotics (Basel). 2022; 11(11): 1642.

52. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone- generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res.* 2000; 34(6): 498-501.
53. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011; 2(1): 66-70.
54. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci.* 2009; 24(3): 368-374.
55. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J.* 2018; 15: 633–644.
56. Carmo RAD, Cörner ACO, Martins EF, Ouverney G, Thurler Júnior JC, Robbs BK et al. Effect of ozone oil and non-surgical periodontal treatment in patients with type 2 diabetes. In-vivo and in-vitro studies with fibroblasts and *Candida albicans*. *J Appl Oral Sci.* 2025; 33: e20240080.
57. Grassi R, Ciccone F, De Falco D, Castaldi M, Agneta MT, Nardi GM, Petruzzi M. Clinical and Microbiological Study on Local Application of an Ozonated Olive Oil Gel in the Periodontal Pockets: A Randomized Double-Blind Trial. *J Clin Med.* 2025; 14(15): 5182.
58. El Sheikh HM, El Gendy EA, Al Harthi SS, Al Jasser R, Alsharif LT. Clinical and Radiodensitometric Evaluation of Ozonated Olive Oil in the Management of Periodontal Condition in Smoker Patients. *Int J Pharm Res Health Dev.* 2020; 11(7): 1236-42.
59. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(5): 1461-8.