

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/03/2027.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade De Odontologia De Araraquara



Guilherme Vieira Luvisoto Belotto

**Avaliação do efeito do óleo de girassol ozonizado em biofilmes
periodontopatogênicos: estudo *in vitro***

ARARAQUARA

2024



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade De Odontologia De Araraquara



Guilherme Vieira Luvisoto Belotto

**Avaliação do efeito do óleo de girassol ozonizado em biofilmes
periodontopatogênicos: 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 concentração de Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos

ARARAQUARA

2024

B452a Belotto, Guilherme Vieira Luvisoto
Avaliação do efeito do óleo de girassol ozonizado em
biofilmes periodontopatogênicos : estudo in vitro /
Guilherme Vieira Luvisoto Belotto. -- Araraquara, 2024
39 p. : il.

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

1. Ozonioterapia. 2. Óleos. 3. Periodontite. 4. Biofilmes.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia,
Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Guilherme Vieira Luvisoto Belotto

**Avaliação do efeito do óleo de girassol ozonizado em biofilmes
periodontopatogênicos: estudo *in vitro***

COMISSÃO JULGADORA

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Odontologia

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos – UNESP/FOAr

2ª Examinadora: Profa. Dra. Alessandra Nara de Souza Rastelli – UNESP/FOAr

3ª Examinadora: Profa. Dra. Chaine Pavone Gomes da Silva – Universidade Brasil - UB

Araraquara, 08 de março de 2024.

DADOS CURRICULARES

Guilherme Vieira Luvisoto Belotto

NASCIMENTO	02/12/1997 – Ourinhos/SP
FILIAÇÃO	Fabiana Vieira Luvisoto Alessandro Belotto
2017 - 2021	Graduação em Odontologia Universidade Brasil (UB) – Descalvado/SP
2023	Curso de Extensão em Formação em Cirurgia Bucal FAEPO – Araraquara/SP
2022 – Atual	Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração em Periodontia – Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por conceder saúde, sabedoria, forças e calma para realizar este curso do início ao fim.

À minha mãe Fabiana, avó Dagmar e tio Arthur que me criaram e foram essenciais para formação da pessoa que sou, meus agradecimentos por todo amor, carinho e compreensão dados, mesmo estando longe sinto vocês prezando por mim.

Ao meu avô Ricieri Luvisoto Filho que foi fundamental para a minha formação, muito obrigado pela paciência, cuidado e amor, serei eternamente grato pelo investimento, não só financeiro, mas também emocional que me fez ter forças para concluir cada etapa,

Aos meus tios Ricieri Neto e Camila, figuras paterna e materna para mim, sempre me aconselhando e me ajudando quando preciso, obrigado por todo apoio, carinho e amor.

À minha orientadora Professora Doutora Daniela Leal Zandim-Barcelos, por acreditar no meu potencial e me orientar durante todo o período de mestrado, agradeço por toda compreensão e acolhimento que me fizeram evoluir como pessoa e profissional.

À equipe da Professora Doutora Denise Spolidorio, Gabriel, Patrícia, Maria Júlia e Letícia que me receberam em seu laboratório e me auxiliaram durante a produção deste trabalho, meus agradecimentos por todo suporte e acolhimento.

À Professora Doutora Chaine Pavone Gomes da Silva que me acompanha desde a graduação e sempre foi uma inspiração como pessoa, profissional e professora para mim. Obrigado por todo suporte na graduação e agora no mestrado com a produção deste trabalho.

A todos os meus companheiros de Pós-graduação, que me acolheram e fizeram essa jornada ser mais leve e sempre estiveram presentes para me auxiliar. Obrigado por todos os momentos, sinto muito orgulho da trajetória de vocês, assim como sei que sentem o mesmo por mim.

Ao meu melhor amigo Leonardo, que mesmo longe sempre me apoiou durante a minha formação, lhe agradeço imensamente por me ouvir, aconselhar e incentivar sempre. Uma

pessoa maravilhosa que sinto muito orgulho e partilharei de muitas conquistas ao longo dos anos.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara FOAr– UNESP, pelo apoio institucional.

Ao Programa de Incentivo à Pesquisa Philozon (PIP O3) e toda comissão científica da Philozon & Ozoncare, pelo suporte material e científico fornecido durante a produção deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001; processo: 88887.679960/2022-00.

Belotto GVL. Avaliação do efeito do óleo de girassol ozonizado em biofilmes periodontopatogênicos: estudo *in vitro* [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

RESUMO

No contexto da periodontia, a ozonioterapia tem sido utilizada como uma abordagem complementar aos métodos convencionais de tratamento. A aplicação de ozônio pode ocorrer de diversas formas, como a insuflação do gás, água ozonizada, ou mesmo o uso de óleos ozonizados. No que diz respeito aos óleos ozonizados, este produto combina as propriedades antimicrobianas do ozônio com os benefícios dos óleos vegetais. Os óleos ozonizados têm sido estudados quanto à sua eficácia contra patógenos periodontais, demonstrando potencial na redução da carga bacteriana. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano de óleos de girassol ozonizado em diferentes concentrações sobre biofilmes periodontopatogênicos. Biofilmes simples de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus oralis* foram cultivados em suas respectivas condições de crescimento e tratados com exposição de 1 minuto ao óleo de girassol ozonizado nas concentrações: O₃G100%, O₃G50% e O₃G25%. Em seguida, foi realizada a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) dos grupos experimentais e do grupo controle negativo. Os resultados mostraram que a concentração O₃G100% foi a mais efetiva, promovendo uma redução significativa de colônias bacterianas para todos os biofilmes testados: *P. gingivalis* (3,78 Log₁₀ UFC/mL⁻¹), *F. nucleatum* (3,73 Log₁₀ UFC/mL⁻¹) e *S. oralis* (3,66 Log₁₀ UFC/mL⁻¹) ($p < 0,0001$). A concentração O₃G50% mostrou redução bacteriana apenas para as cepas de *P. gingivalis* (3,14 Log₁₀ UFC/mL⁻¹) e *S. oralis* (3,06 Log₁₀ UFC/mL⁻¹) ($p < 0,0001$). Enquanto a concentração O₃G25% não apresentou efeito antimicrobiano em nenhum biofilme testado ($p > 0,05$). Concluiu-se, então, que o óleo de girassol ozonizado sem diluição apresentou uma atividade antimicrobiana efetiva em biofilmes simples de bactérias periodontopatogênicas.

Palavras-chave: Ozonioterapia. Óleos. Periodontite. Biofilmes.

Belotto GVL. Effect of ozonized sunflower oil on periodontitis-related biofilms: *in vitro* study [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2024.

ABSTRACT

In the context of periodontics, ozone therapy has been used as a complementary or alternative approach to conventional treatment methods. Ozone can be applied in a variety of ways, such as gas insufflation, ozonated water, or even the use of ozonated oils. As far as ozonated oils are concerned, this product combines the antimicrobial properties of ozone with the benefits of vegetable oils. Ozonated oils have been studied for their efficacy against periodontal pathogens, showing potential in reducing the bacterial load. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of ozonized sunflower oils at different concentrations on periodontitis-related biofilms. Single biofilms of *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Streptococcus oralis* were cultivated in their respective growth conditions and treated with 1-minute exposure to ozonized sunflower oil at concentrations of: O₃G100%, O₃G50% and O₃G25%. The colony-forming units (CFU) of the experimental groups and the negative control group were then quantified. The results showed that the O₃G100% concentration was the most effective, promoting a significant reduction in bacterial colonies for all the biofilms tested: *P. gingivalis* (3.78 Log₁₀ CFU/mL⁻¹), *F. nucleatum* (3.73 Log₁₀ CFU/mL⁻¹) and *S. oralis* (3.66 Log₁₀ CFU/mL⁻¹) ($p < 0.0001$). The O₃G50% concentration showed bacterial reduction only for the strains of *P. gingivalis* (3.14 Log₁₀ CFU/mL⁻¹) and *S. oralis* (3.06 Log₁₀ CFU/mL⁻¹) ($p < 0.0001$). The O₃G25% concentration had no antimicrobial effect on any of the biofilms tested ($p > 0.05$). It was therefore concluded that undiluted ozonated sunflower oil showed effective antimicrobial activity on single-species periodontitis-related biofilms tested.

Keywords: Ozone therapy. Oils. Periodontitis. Biofilms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	PROPOSIÇÃO	13
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1	Histórico da ozonioterapia	14
3.2	Características e mecanismos de ação do ozônio medicinal.....	14
3.3	Formas de administração do ozônio medicinal	16
3.4	Utilização de óleos ozonizados em estudos <i>in vitro</i>	18
3.5	Uso dos óleos ozonizados no tratamento das doenças periodontais e peri-implantares	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Cepas bacterianas, condições de crescimento e formação de biofilme	23
4.2	Óleo de girassol ozonizado e diluições dos grupos	24
4.3	Tratamento dos biofilmes	25
4.4	Análise das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	26
4.5	Análise estatística dos dados	26
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais representam condições inflamatórias que afetam o tecido gengival e os tecidos de suporte dos dentes. A gengivite consiste em uma inflamação reversível no tecido gengival (periodonto de proteção), caracterizada por eritema, edema e sangramento gengival. Se não tratada a gengivite pode evoluir para uma periodontite e afetar o periodonto de sustentação (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar), podendo causar danos irreversíveis a esses tecidos e até a perda de elementos dentários¹.

O fator chave para o desenvolvimento dessas doenças é o acúmulo de biofilme bacteriano, podendo o mesmo ser influenciado por fatores locais, sistêmicos e demográficos. Sabe-se que o desequilíbrio que ocorre na microbiota periodontal promove uma disbiose que pode levar a modificações na resposta imune do hospedeiro. Microrganismos como *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (estes três últimos conhecidos como complexo vermelho), encontrados no biofilme subgengival, estão associados a uma resposta inflamatória exacerbada e à progressão das doenças periodontais. Outros fatores como, doenças sistêmicas, tabagismo e inadequada higienização da região, podem influenciar no desenvolvimento e progressão das doenças periodontais²⁻⁴.

Para prevenção e controle das doenças periodontais é essencial eliminar e modificar a microbiota presente no biofilme. A Raspagem e o Alisamento Radicular (RAR) é considerada a terapia não cirúrgica preferencial para tratamento da doença e manutenção da saúde periodontal⁵. Apesar dos resultados positivos observados com a RAR, essa abordagem pode ter limitações e não ser completamente bem-sucedida em certas situações clínicas. Por isso, terapias complementares estão sendo investigadas para a remoção do biofilme e eliminação das bactérias periodontopatogênicas. Esses métodos complementares buscam melhorar os resultados da terapia não cirúrgica devido à dificuldade de acesso às estruturas radiculares durante o procedimento de RAR, à presença de bactérias periodontopatogênicas em bolsas mais profundas e à capacidade de algumas bactérias invadirem tecidos adjacentes⁵. Quando se trata de casos com grande e rápida destruição, o uso de antibióticos locais ou sistêmicos é considerado como

uma opção de terapia adjuvante, mas seu uso contínuo pode levar a efeitos colaterais no organismo e ao desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos. A resistência aos antibióticos, causada pelo uso indiscriminado desta medicação, tem se tornado um dos grandes problemas de saúde pública a nível mundial, necessitando cada vez mais do desenvolvimento de novas drogas e abordagens terapêuticas complementares⁶.

A clorexidina é considerada o antimicrobiano padrão ouro como controle positivo de experimentos com antimicrobianos em Periodontia. Por ser um agente químico de amplo espectro, possuindo uma ação bactericida em altas concentrações e bacteriostático em baixas concentrações, é um antimicrobiano eficaz na eliminação de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Na prática clínica, a clorexidina pode ser implementada como terapia antimicrobiana auxiliar ao tratamento periodontal, sendo encontrada comercialmente nas formas de enxaguatórios bucais e géis. Alguns dos efeitos adversos mais frequentes da clorexidina incluem xerostomia, hipogeusia e descoloração da língua; bem como pigmentação dentária extrínseca quando utilizado a longo prazo, além da possibilidade de promover resistência antimicrobiana⁷.

Em virtude das propriedades antimicrobianas e bioestimuladoras do ozônio (O_3), a ozonioterapia tem um grande potencial para utilização no tratamento das afecções periodontais e peri-implantares, podendo reduzir a inflamação tecidual, impedir a destruição óssea e eliminar bactérias presentes nas bolsas periodontais sem apresentar efeitos adversos ou criar resistência antimicrobiana⁸. Além disso, estudos prévios demonstraram que o O_3 pode acelerar o processo inicial de cicatrização, estimular a formação óssea, aumentar a oxigenação dos tecidos, promover efeito anti-inflamatório, analgésico e bactericida, intervindo diretamente no equilíbrio das reações metabólicas de oxidação e redução, dependendo das vias, concentração e métodos de aplicação utilizados⁹⁻¹¹.

A aplicação tópica do O_3 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, pois durante o processo de insuflação do O_3 em um óleo monoinsaturado (ozonólise) cria-se uma forma estável dos

subprodutos da molécula¹². 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 gás¹³. Diferentes veículos têm sido utilizados para produção do óleo ozonizado, entre eles os mais utilizados são o óleo de girassol e o óleo de oliva. As características particulares destes óleos podem influenciar na formação dos subprodutos após a insuflação de ozônio. O óleo de girassol tem se mostrado mais eficaz em termos de atividade antimicrobiana. Sendo assim, a diferença na ação antimicrobiana dos óleos ozonizados pode estar relacionada às propriedades físico-químicas dos veículos após a ozonização¹⁴.

A eficácia do gás e água ozonizados em biofilmes contendo bactérias relacionadas às doenças periodontais já foi comprovada em estudos *in vitro*^{15,16}. Também já foi avaliado o efeito antimicrobiano do óleo de oliva ozonizado em bactérias relacionadas as doenças periodontais. No entanto, nenhuma inibição do crescimento bacteriano na cepa Gram-positiva foi observada e nenhum efeito antimicrobiano foi observado nas cepas Gram-negativas e positivas. Apesar do óleo demonstrar atividade antibacteriana, principalmente em relação a patógenos Gram-negativos, ele não foi mais eficaz que os géis de clorexidina a 0,2 e a 1% utilizados como controle positivo no estudo¹⁷.

Alguns estudo clínicos já foram realizados utilizando a ozonioterapia como terapia adjuvante no tratamento periodontal não cirúrgico. No entanto, os resultados obtidos na revisão sistemática e metanálise de Moraschini *et al.*¹⁸ (2020) não suportam a utilização da ozonioterapia. Nesta revisão apenas estudos utilizando água e gás ozonizado foram incluídos. Além disso, os autores destacam a grande heterogeneidade dos estudos que compromete uma conclusão definitiva em relação aos benefícios da ozonioterapia. Assim, estudos clínicos controlados e randomizados de alta qualidade são necessários para determinação da efetividade ozonioterapia.

Considerando que até o momento não há estudos *in vitro* disponíveis na literatura envolvendo a ação antimicrobiana do óleo de girassol ozonizado em biofilmes periodontopatogênicos e que a ozonioterapia pode ser uma modalidade promissora para complementar e potencializar os resultados do tratamento das doenças periodontais, o presente estudo foi delineado para investigar os potenciais efeitos antimicrobianos do

óleo de girassol ozonizado em biofilmes periodontopatogênicos. Biofilmes associados a doenças periodontais ainda representam um desafio significativo na prática clínica. Portanto, compreender a eficácia do óleo de girassol ozonizado contra esses biofilmes pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras e mais eficientes no combate às doenças periodontais.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do presente estudo, pôde-se concluir que o óleo de girassol ozonizado puro apresentou efeito antimicrobiano significativo em biofilmes espécie única de *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus oralis* após um curto período de exposição.

REFERÊNCIAS*

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17038.
2. Dietrich T, Ower P, Tank M, West NX, Walter C, Needleman I et al. Periodontal diagnosis in the context of the 2017 classification system of periodontal diseases and conditions: implementation in clinical practice. *Br Dent J*. 2019; 226(1): 16-22. Erratum in: *Br Dent J*. 2019; 226(4): 295.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005; 38: 135-87.
4. Cortelli SC, Cortelli JR, Romeiro RL, Costa FO, Aquino DR, Orzechowski PR et al. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(1): 67-74.
5. Badersten A, Nilvéus R, Egelberg J. Effect of nonsurgical periodontal therapy: I: moderately advanced periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1981; 8(1): 57-72.
6. Carvalho LH, D'Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I: clinical results. *J Clin Periodontol*. 2004; 31(12):1070-6.
7. Poppolo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in dentistry: pharmacology, uses, and adverse effects. *Int Dent J*. 2022; 72(3): 269-77.
8. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques JL. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(4): 75-84.
9. Bocci V, Larini A, Micheli V. Restoration of normoxia by ozone therapy may control neoplastic growth: a review and a working hypothesis. *J Altern Complement Med*. 2005; 11(2): 257-65.
10. Beck E, Wasser G, Viabahn-Hansler R. Current status of ozone therapy: empirical developments and basic research. *Forsch Komplementarmed*. 1998; 5: 61-75.

* 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>

11. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 2009; 29(4): 646-82.
12. 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.
13. 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.
14. Puxeddu S, Scano A, Scorciapino MA, Delogu I, Vascellari S, Ennas G et al. Physico-chemical investigation and antimicrobial efficacy of ozonated oils: the case study of commercial ozonated olive and sunflower seed refined oils. *Preprints.* 2023; 2023120991. doi: 10.20944/preprints202312.0991.v1.
15. Eick S, Tigan M, Sculean A. Effect of ozone on periodontopathogenic species: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2012; 16(2): 537-44.
16. Huth KC, Quirling M, Lenzke S, Paschos E, Kamereck K, Brand K et al. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119(3): 204-10.
17. Pietrocola G, Ceci M, Preda F, Poggio C, Colombo M. Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. *J Clin Exp Dent.* 2018; 10(11): e1103-e1108.
18. Moraschini V, Kischinhevsky ICC, Calasans-Maia MD, Shibli JA, Sartoretto SC, Figueredo CM et al. Ineffectiveness of ozone therapy in nonsurgical periodontal treatment: a systematic review and metaanalysis of randomized clinical trials. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(6): 1877-88.
19. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy: state of the art. *Arch Med Res.* 2006; 37(4): 425-35.
20. Shete AV, Subramaniam AV, Sable DM, Patil SV, Chavan MS, Shete MV et al. Ozone therapy: healing properties of the blue gas. *Int J Oral Health Dent* 2016; 2(1): 35-38.
21. 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.

22. Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res.* 2017; 7(3): 212-9.
23. Elshinawy MI, Al-Madboly LA, Ghoneim WM, El-Deeb NM. Synergistic effect of newly introduced root canal medicaments; ozonated olive oil and chitosan nanoparticles, against persistent endodontic pathogens. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1371.
24. Günaydın Y, Sevim H, Tanyolaç D, Gürpınar ÖA. Ozonated olive oil with a high peroxide value for topical applications: In-vitro cytotoxicity analysis with L929 cells. *Ozone Sci Eng.* 2018; 40(1): 37-43.
25. Indurkar MS, Verma R. Effect of ozonated oil and chlorhexidine gel on plaque induced gingivitis: a randomized control clinical trial. *J Indian Soc Periodontol.* 2016; 20(1): 32-5.
26. 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.
27. Nardi GM, Cesarano F, Papa G, Chiavistelli L, Ardan R, Jedlinski M et al. Evaluation of salivary Matrix Metalloproteinase (MMP-8) in periodontal patients undergoing non-surgical periodontal therapy and mouthwash based on ozonated olive oil: a randomized clinical trial. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(18): 6619.
28. 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.
29. Choudhary A, Rajasekar A. Efficacy of ozonated olive oil gel in the management of peri-implant mucositis. *J Long-Term Eff Med Implants.* 2020; 11(4): 172.
30. Butera A, Pascadopoli M, Gallo S, Pérez-Albacete Martínez C, Maté Sánchez de Val JE et al. Ozonized hydrogels vs. 1% chlorhexidine gel for the clinical and domiciliary management of peri-implant mucositis: a randomized clinical trial. *J Clin Med.* 2023; 12(4): 1464.
31. Tavares LJ, Klein MI, Panariello BHD, Dorigatti de Avila E, Pavarina AC. An in vitro model of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* in single- and dual-species biofilms. *J Periodontal Implant Sci.* 2018; 48(1): 12-21.

32. Garcia de Carvalho G, Sanchez-Puetate JC, Donatoni MC, Maquera Huacho PM, de Souza Rastelli AN, de Oliveira KT et al. Photodynamic inactivation using a chlorin-based photosensitizer with blue or red-light irradiation against single-species biofilms related to periodontitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020; 31: 101916.
33. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis.* 200; 7(1): 11-7.
34. Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria: is there cause for concern? *Front Microbiol.* 2019; 22(10): 587.
35. Hembach N, Alexander J, Hiller C, Wieland A, Schwartz T. Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 12843