

**Efetividade da ozonioterapia contra microrganismos endopatogênicos:
revisão de literatura**

**Effectiveness of ozone therapy against endopathogenic microorganisms:
literature review**

Lucas Lappe Moreira^a <https://orcid.org/0000-0002-6560-4433>

Roberto Zimmer^b <https://orcid.org/0000-0003-4565-4756>

Mariana de Carlo Bello^c <https://orcid.org/0000-0002-1947-8958>

^aCirurgião-dentista, Universidade Luterana do Brasil, Cachoeira do Sul, RS, Brasil.

^bDoutorando em Odontologia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil.

^cProfessora Adjunta de Odontologia, Universidade Luterana do Brasil, Cachoeira do Sul, RS, Brasil.

Autor de correspondência:

Roberto Zimmer

E-mail: beto.zimmer@hotmail.com

RESUMO

Introdução: A comunidade científica está em constante busca por alternativas terapêuticas que promovam a desinfecção dos canais radiculares. Dentre os diversos protocolos existentes, a terapia com o ozônio tem se mostrado uma técnica viável para tal finalidade. Assim, o objetivo da presente revisão de literatura é descrever a efetividade da ozonioterapia na redução de microrganismos endopatogênicos. **Revisão de literatura e discussão:** A literatura apresenta, em sua maioria, estudos laboratoriais e carece de estudos clínicos sobre o tema. Esses estudos demonstram que o ozônio líquido e gasoso possui propriedades antimicrobianas e é eficiente na desinfecção do sistema de canais radiculares. No entanto, devido aos diferentes protocolos de

utilização da ozonioterapia, associado às diferenças metodológicas dos estudos, pode-se afirmar que a ozonioterapia parece ser eficiente na desinfecção dos canais radiculares, mas há controvérsias sobre a sua utilização como técnica complementar ou substituta às soluções irrigadoras tradicionais. **Conclusão:** Ainda não é possível afirmar que o ozônio pode ser um substituto ao hipoclorito de sódio. No entanto, alguns autores relatam que o ozônio pode ser utilizado como um agente coadjuvante na redução de microrganismos presentes nos canais radiculares e é uma alternativa viável para os casos em que o hipoclorito de sódio está contraindicado.

Palavras-chave: Endodontia. Desinfecção. Ozônio.

ABSTRACT

Introduction: The scientific community is in constant search for therapeutic alternatives that promote the disinfection of root canals. Among the various existing protocols, ozone therapy has been shown to be a viable technique for this purpose. Thus, the aim of the present literature review is to describe the effectiveness of ozone therapy on reduction of endopathogenic microorganisms. **Literature review and discussion:** Most part of the literature presents in vitro and clinical studies on the subject and demonstrate that the liquid and gaseous ozone have antimicrobial properties and are efficient in disinfecting the root canal system. However, due to the different protocols for ozone therapy use associated with the methodological differences from the studies, it can be indicated that ozone therapy seems to be an efficient disinfection of root canals, but there are controversies about its use as a complementary or substitute technique in place of traditional irrigation solutions. **Conclusion:** It is not yet possible to consider ozone as a substitute for hypochlorite sodium. However, some authors report that ozone can be used as a supporting agent on reduction of microorganisms present in the root canals and a viable alternative for cases in which hypochlorite is contraindicated.

Keywords: Endodontics. Disinfection. Ozone.

INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico é um procedimento razoavelmente previsível e com altas taxas de sucesso clínico, sendo dependente da eliminação de patógenos responsáveis por patologias pulpares, aliado ao reparo ósseo periapical¹. Entretanto, o tratamento de um dente com periodontite apical é um desafio para o endodontista, pois microrganismos causadores do processo infeccioso e inflamatório podem se abrigar nas complexidades anatômicas do sistema de canais radiculares, tornando-se difíceis de serem eliminados^{2,3}.

A instrumentação mecânica tem por objetivo remover a dentina infectada e facilitar a penetração da solução irrigadora a fim de reduzir a carga microbiana⁴. No entanto, algumas áreas da parede do canal radicular não são tocadas pelos instrumentos endodônticos e não há uma adequada desinfecção do sistema de canais radiculares⁵. Por conta disso, se faz necessário a agitação da solução irrigante, bem como o uso de coadjuvantes ao tratamento endodôntico, tal como a ozonioterapia^{5,6}.

O ozônio é um gás natural fortemente oxidante utilizado para fins terapêuticos nas formas de gás ozônio, água ozonizada e óleo ozonizado^{7,8}. Para a aplicação na sua forma gasosa, um gerador de ozônio acoplado a uma peça de mão que se adapta a uma cânula é diretamente levado ao interior do elemento dental, promovendo uma elevada concentração de ozônio nos canais radiculares⁷. Na sua forma aquosa, a ozonização da água ocorre pela passagem da água bidestilada por um gerador de ozônio, onde o gás é absorvido pela água e a mesma é utilizada como irrigante intracanal. Já na sua versão em óleo, o ozônio transforma-se em ozonídeos e as suas propriedades são utilizadas em situações de reparo e cicatrização a longo prazo, podendo também ser utilizado em lesões intra e extraorais⁸.

A ozonioterapia é capaz de inativar bactérias, vírus, fungos e protozoários pelo dano causado nas membranas celulares, alterando a estabilidade osmótica e a permeabilidade dos microrganismos³. Possui ação analgésica, anti-inflamatória e de reparo tecidual em situações de regeneração óssea, além de contribuir com um efeito biomodulador após a estabilização do processo infeccioso⁹. Além de não causar efeitos colaterais aos pacientes, é

segura ao meio ambiente, sendo uma excelente modalidade de tratamento para situações na odontologia¹⁰.

Assim, o objetivo do presente estudo é revisar a literatura a fim de elucidar os efeitos e resultados da ozonioterapia para a remoção de microrganismos endopatógenos.

REVISÃO DE LITERATURA

Nagayoshi et al.⁶ avaliaram, *in vitro*, a ação da água ozonizada frente ao *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. As amostras contaminadas foram divididas em 5 grupos e irrigadas com soluções de 4 mg/L de água ozonizada, 4 mg/L de água ozonizada associada à sonificação, água de destilada (controle negativo), água destilada associada à sonificação e hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% (controle positivo). A citotoxicidade das soluções foi determinada pelo teste de MTT. Os autores concluíram que a água ozonizada apresentou uma atividade antimicrobiana semelhante ao NaOCl 2,5% durante a irrigação dos canais radiculares, especialmente quando associada à sonificação e apresentou uma baixa toxicidade contra as células fibroblásticas.

Stoll et al.¹¹ investigaram, *in vitro*, o efeito desinfetante do gás ozônio em canais radiculares humanos inoculados com *Enterococcus faecalis*. Foi avaliada a eficácia do gás ozônio, cloreto de sódio (controle negativo), peróxido de hidrogênio 3%, digluconato de clorexidina (CLX) 0,2%, NaOCl 1,5% e NaOCl 3% (controle positivo). Após o preparo químico-mecânico foi realizada a aplicação do gás ozônio e dos irrigantes tradicionais. Todos os grupos testados apresentaram redução do número de microrganismos, sendo que o NaOCl 3% apresentou significativamente a menor concentração bacteriana. Os autores concluíram que o gás ozônio pode ser considerado um substituto para a desinfecção dos canais radiculares nos casos em que o NaOCl não está indicado.

Huth et al.¹⁰ avaliaram, *in vitro*, a ação o ozônio aquoso (1.25-20 µg/mL⁻¹) e ozônio gasoso (1-53 g/m⁻³) como uma alternativa antisséptica contra *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Peptostreptococcus micros* e

Pseudomonas aeruginosa em suspensão e em biofilmes. Em comparação com a ozonioterapia, NaOCl 5,25% e 2,25%, CLX 2%, peróxido de hidrogênio 3% e tampão fosfato-salino foram testados. Baixas concentrações de ozônio e o peróxido de hidrogênio foram os menos eficazes. Concentrações de ozônio gasoso de até $1\text{g}/\text{m}^{-3}$ e aquoso de até $5\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ eliminaram completamente os microrganismos em suspensão, assim como o NaOCl e a CLX. O ozônio aquoso de alta concentração e a CLX eliminaram quase completamente as células do biofilme, enquanto o peróxido de hidrogênio foi o menos eficaz. Os autores concluíram que o ozônio gasoso e aquoso foram eficazes contra os microrganismos testados em suspensão e em biofilme, dependendo da dose, da tensão e do tempo de aplicação. No entanto, o NaOCl foi o único método que eliminou completamente todos os tipos de microrganismos.

Case et al.¹² avaliaram, *in vitro*, a ação do ozônio gasoso liberado em solução salina em diferentes biofilmes de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares com ou sem a agitação ultrassônica passiva. Os dentes foram tratados com solução salina (controle negativo), NaOCl 1% por 120 segundos (controle positivo), ozônio (140 ppm de ozônio no ar a 2L/min entregue à solução salina usando uma cânula por 120 segundos), solução salina com ativação ultrassônica passiva (70 kHz e $200\text{ mW}/\text{cm}^2$ mantido passivamente dentro do canal por 120 segundos) e ozônio seguido imediatamente por agitação ultrassônica. A análise revelou que o NaOCl 1% foi o tratamento mais eficaz para a desinfecção, seguido do ozônio combinado com agitação ultrassônica. Os autores concluíram que embora nenhum dos regimes de tratamento tenha sido capaz de eliminar completamente o biofilme, o gás ozônio pode ser útil como um agente coadjuvante na desinfecção endodôntica.

Jankovic et al.¹³ avaliaram, em um estudo transversal, a quantidade de bactérias anaeróbicas e aeróbicas de dentes unirradiculares com lesão periapical. A análise microbiológica foi realizada antes e após a instrumentação mecânica e irrigação com NaOCl 2,5% e após a aplicação adicional de ozônio gasoso. As bactérias foram coletadas, cultivadas e as colônias bacterianas foram quantificadas. A concentração bacteriana reduziu significativamente após a aplicação adicional da ozonioterapia e os autores concluíram que a terapia

com ozônio é capaz de diminuir o número de bactérias aeróbicas e anaeróbicas do canal radicular.

Hubbezoglu et al.¹⁴ avaliaram, *in vitro*, a eficácia do ozônio aquoso em diferentes concentrações e técnicas de aplicação frente ao *Enterococcus faecalis*. Após a contaminação bacteriana, 80 pré-molares inferiores foram divididos em diferentes grupos: NaOCl (controle positivo), 8 ppm de água ozonizada, 12 ppm de água ozonizada e 16 ppm de água ozonizada. Metade das amostras foi descontaminada com água ozonizada pela técnica manual e a outra metade com o auxílio da técnica ultrassônica, ambas duraram 180 segundos. Pontas de papel foram inseridas no canal radicular para coletar as bactérias remanescentes e após a cultura, as unidades formadoras de colônia foram contadas. Os autores concluíram que o ozônio aquoso combinado com a aplicação ultrassônica apresentou eficácia similar ao NaOCl 5,25% para a descontaminação dos canais radiculares.

Noites et al.¹⁵ avaliaram, *in vitro*, a eficácia da irrigação com NaOCl, CLX e ozônio gasoso, isoladamente ou combinados, frente ao *Enterococcus faecalis* e a *Candida albicans*. As formulações de NaOCl 1%, 3% e 5%, CLX 0,2% e 2% e ozônio gasoso e as combinações de NaOCl 5% e CLX 2%, com o gás ozônio foram testadas em diferentes tempos. O presente estudo observou que todas as formulações utilizadas de forma independente foram ineficazes para a eliminação completa dos microrganismos. No entanto, a combinação de CLX 2% e gás ozônio por 24 segundos promoveu uma eliminação completa dos microrganismos testados. Os autores concluíram que a combinação de CLX e gás ozônio pode ser vantajosa na desinfecção dos canais radiculares.

Boch et al.¹⁶ avaliaram, *in vitro*, a eficácia antimicrobiana do ozônio gasoso comparado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 20%, NaOCl 3%, EDTA 20% associado ao ozônio e NaOCl 3% associado ao ozônio contra o *Enterococcus faecalis*. Após o tratamento, as amostras foram coletadas com cones de papel e cultivadas por 24 horas e as colônias bacterianas foram contadas. Todos os grupos apresentaram uma redução significativa na contagem de bactérias, sendo que a maior redução aconteceu no grupo NaOCl (99,95%). Os autores concluíram que o ozônio gasoso apresenta uma eficácia

inferior ao NaOCl e sugere que o mesmo seja empregado como coadjuvante ao NaOCl, especialmente em infecções persistentes e em situações clínicas em que o NaOCl não é indicado, como em casos de ápice aberto e de ápice reabsorvido.

Nogales et al.¹⁷ avaliaram, *in vitro*, a eficácia antimicrobiana da ozonioterapia em dentes contaminados com *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e o seu efeito citotóxico sobre células fibroblásticas. Os dentes foram preparados seguindo um protocolo padrão e grupos experimentais receberam a aplicação de gás ozônio 40 µg/mL e ozônio aquoso 8 µg/mL. O estudo também avaliou o efeito tóxico de ozônio aquoso nas concentrações de 2 µg/mL, 5 µg/mL e 8 µg/mL sobre fibroblastos gengivais humanos. O estudo concluiu que a ozonioterapia promove uma descontaminação do canal radicular e apresenta viabilidade celular em todas as concentrações testadas.

Kist et al.¹⁸, em um ensaio clínico randomizado, avaliaram a eficácia do protocolo de desinfecção com gás ozônio em comparação com NaOCl e CLX no tratamento endodôntico de periodontite apical. Os pacientes foram avaliados clínica e radiograficamente e 60 dentes foram alocados aleatoriamente. A câmara pulpar foi acessada e o terço cervical foi preparado com brocas Gates-Glidden para permitir a inserção direta das limas. Após a odontometria, foi realizado o preparo químico-mecânico com limas rotatórias Mtwo (VDW), a irrigação com pelo menos 2 mL de NaOCl 0,9% e a remoção da smear layer com 5 mL de EDTA 17%. Após a secagem dos condutos, os dentes do grupo ozônio receberam desinfecção química do canal radicular com gás ozônio 32g/m³ durante 120 segundos e os dentes do grupo NaOCl/CLX receberam a aplicação de 15 mL de NaOCl 3% durante 15 minutos na primeira sessão. Todos os dentes receberam a aplicação de pasta de hidróxido de cálcio durante 7 dias. Na segunda consulta, o grupo ozônio recebeu o mesmo protocolo, enquanto o grupo NaOCl/CLX recebeu lavagem com 5 mL de CLX 2%. Com auxílio de cones de papel estéreis, amostras microbianas foram coletadas após o acesso à cavidade, após o preparo químico-mecânico e após medicação intracanal. A redução bacteriana entre os grupos não apresentou

diferença significativa nos períodos analisados. Da mesma forma, ambos os grupos apresentaram semelhante redução das lesões periapicais após 6 e 12 meses e as taxas de sucesso clínico do grupo ozônio (96,20% após 6 meses e 95,5% após 12 meses) e do grupo NaOCl/CLX (95,5% após 6 meses e 95,2% após 12 meses) não apresentaram diferença entre si.

Pinheiro et al.¹⁹ avaliaram, *in vitro*, a eficácia do NaOCl 2,5% (controle positivo), CLX 2%, água ozonizada e água destilada (controle negativo) como soluções irrigadoras em biofilmes de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na raiz mesiolingual de molares inferiores com severa curvatura radicular. Os dentes foram divididos aleatoriamente e cada grupo teve o canal instrumentado com o sistema recíprocante Wave One Gold Primary. Após a irrigação e o preparo do canal radicular, todos os grupos apresentaram uma significativa redução do biofilme. O grupo NaOCl apresentou uma redução de 98,07% do biofilme, enquanto os grupos CLX e água ozonizada apresentaram uma redução de 98,31% e 98,02%, respectivamente, sendo estatisticamente superiores ao controle negativo, que apresentou uma redução de 72,98% do biofilme. Os autores concluíram que os três irrigantes apresentaram uma atividade antimicrobiana similar e que a água ozonizada pode ser uma alternativa para a redução microbiana em canais radiculares.

Em uma revisão sistemática da literatura, Silva et al.²⁰ analisaram o efeito da ozonioterapia na desinfecção de canais radiculares. Seguindo os critérios de elegibilidade, oito estudos foram selecionados e foi demonstrado que, quando comparado ao NaOCl, a ozonioterapia proporciona uma redução microbiana significativamente inferior e que a terapia com ozônio foi ineficaz. No entanto, esta revisão sistemática avaliou os resultados de estudos laboratoriais e de apenas um ensaio clínico randomizado. Além do pequeno número de artigos selecionados para a revisão, observou-se falhas metodológicas nos estudos incluídos e grande variabilidade no protocolo de utilização da ozonioterapia e da concentração do NaOCl (1%-5,25%). Mesmo com as evidências encontradas até o momento, há a necessidade de novos ensaios clínicos randomizados controlados para que se tenha uma evidência

mais robusta a respeito da utilização da ozonioterapia na desinfecção de canais radiculares.

DISCUSSÃO

A comunidade científica está em constante busca por alternativas terapêuticas que promovam a desinfecção dos canais radiculares de uma maneira tão eficaz ou até mesmo superior ao NaOCl, considerada a solução irrigadora padrão-ouro²¹. Lynch⁸ afirma que os microrganismos encontrados na cavidade bucal são os principais desencadeadores das alterações patológicas que acometem a polpa e tecidos perirradiculares. A eliminação desses patógenos e a neutralização de endotoxinas é o principal foco do tratamento endodôntico. No entanto, esses microrganismos apresentam propriedades de autopoiese (capacidade de se auto-organizar), homeostase (adaptação e resistência às ações antimicrobianas), sinergismo (tornam-se mais eficazes associados a um grupo do que isolados), além da capacidade de sobreviverem em sítios com baixo nível de nutrientes, o que os tornam mais resistentes às soluções irrigadoras⁹. A principal causa do insucesso endodôntico é a persistência de microrganismos em regiões intrarradiculares de difícil acesso, o que justifica a preocupação com protocolos de desinfecção⁵.

A espécie bacteriana mais utilizada nos estudos que avaliaram a eficácia da ozonioterapia foi o *Enterococcus faecalis*. Trata-se de uma bactéria Gram-positiva, oportunista, anaeróbia facultativa, sendo o microrganismo mais prevalente e resistente em casos de insucessos endodônticos²². Este microrganismo, além de ser capaz de crescer em ambientes sem oxigênio, é capaz de sobreviver por longos períodos com escassez de nutrientes e de invadir e aderir-se à dentina²³. Outros microrganismos abordados foram a *Candida albicans* e o *Streptococcus mutans*. O primeiro trata-se de um fungo que está presente na cavidade oral, que tem capacidade de penetrar em tecidos mineralizados e está relacionado com lesões primárias e secundárias^{24,25} e o segundo trata-se de uma bactéria Gram-positiva e anaeróbica, que está presente em menor proporção, porém tendo prevalência nas infecções pulpares decorrentes da cárie dentária²⁶.

Os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares tem a capacidade de formar biofilme, definido como uma comunidade microbiana séssil multicelular, caracterizada por células ligadas a uma superfície e enredadas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que permite uma melhor fixação aos sítios e uma maior resistência a procedimentos antimicrobianos¹. Por conta disso, a utilização do ozônio, isolado ou combinado a outros agentes irrigadores, pode ser um método auxiliar a fim de aumentar as taxas de sucesso da terapia endodôntica devido ao seu poder antimicrobiano, analgésico, imunoestimulante, antibacteriano e cicatrizante, além de ser biocompatível a tecidos moles e duros²⁷. Nagayoshi et al.⁶ demonstraram que a água ozonizada apresenta uma baixa citotoxicidade quando comparada ao NaOCl. Dessa forma, a terapia com ozônio também pode ser uma alternativa empregada em casos em que a utilização do NaOCl está contraindicada, como ápice aberto e reabsorção radicular¹⁶.

Os estudos *in vitro* apresentam resultados conflitantes sobre a capacidade da ozonioterapia na eliminação de endopatógenos. Enquanto Nagayoshi et al.⁶, Hubbezoglu et al.¹⁴ e Pinheiro et al.¹⁹ demonstraram que o ozônio aquoso apresenta uma capacidade de eliminação de microrganismos similar ao NaOCl, Hurt et al.¹⁰ observaram que o NaOCl apresenta um efeito superior à água ozonizada. Nos estudos de Stoll et al.¹¹, Case et al.¹², e Boch et al.¹⁶, o ozônio gasoso apresentou efeito inferior ao NaOCl, enquanto Noites et al.¹⁵ perceberam um efeito superior do gás ozônio associado a CLX quando comparado ao NaOCl.

A literatura apresenta apenas um ensaio clínico randomizado a respeito da ação antimicrobiana da ozonioterapia¹⁸. Neste estudo, o gás ozônio foi capaz de regredir as lesões periapicais de forma similar ao grupo NaOCl/CLX, que recebeu a aplicação NaOCl 3% na primeira sessão e CLX 2% na segunda sessão, não mostrando diferença estatística na redução bacteriana dos grupos testados após o preparo químico-mecânico e após a medicação intracanal. Da mesma maneira, ambas as técnicas apresentaram sucesso clínico similar após 6 e 12 meses, e os autores consideram que a terapia com ozônio parece ser uma alternativa para o tratamento de dentes com periodontite apical. Apesar de

o gás ozônio ter apresentado efeito similar ao grupo NaOCl/CLX, deve-se levar em conta o efeito do preparo químico-mecânico e da medicação intracanal, visto que essas etapas são fundamentais para o sucesso da terapia endodôntica⁴. O emprego da ozonioterapia na endodontia é um tema que necessita ser abordados em mais ensaios clínicos randomizados para que se tenham evidências fortes a respeito da sua efetividade. Em outro estudo clínico, Jankovic et al.¹³ demonstraram que o gás ozônio foi capaz de reduzir o número de bactérias aeróbicas e anaeróbicas. Possivelmente, o efeito positivo da ozonioterapia em bactérias anaeróbicas, predominantes em infecções endodônticas primárias, ocorreu pela capacidade do oxigênio em inativá-las³. No entanto, a literatura necessita de investigações a respeito da ação do ozônio sobre diferentes biofilmes microbianos e na presença de bactérias aeróbicas. Da mesma forma, a falta de padronização de protocolos de utilização da técnica dificulta a avaliação do real efeito da técnica sobre os diferentes tipos de microrganismos, tanto isoladamente quanto em biofilme.

A revisão sistemática de Silva et al.²⁰, que refuta o uso da técnica, apresenta limitações, como a associação de resultados de estudos laboratoriais, que demonstram que a aplicação de NaOCl é mais efetiva que a ozonioterapia, com os resultados clínicos de um ensaio clínico randomizado, que demonstra que não há diferença estatística entre as terapias utilizadas para a desinfecção dos canais radiculares. O *JADA+ Clinical Scans*, sessão especial do periódico *The Journal of the American Dental Association*, que avalia criticamente os artigos publicados em odontologia com interesses clínicos, definiu que a revisão sistemática não apresenta evidências suficientes a respeito do tema, pelo fato do estudo possuir apenas um ensaio clínico randomizado com baixo nível de viés, mas com tamanho amostral pequeno, o que diminui a qualidade da evidência; pela metodologia do estudo não ter sido delineada para mostrar a não inferioridade do ozônio em comparação com o NaOCl; e por contar, em sua maioria, com estudos *in vitro*, seus resultados não podem ser extrapolados para a prática clínica²⁸.

CONCLUSÃO

Ao final desta revisão da literatura, concluiu-se que a terapia com ozônio apresenta resultados interessantes na desinfecção dos canais radiculares, sendo efetiva na eliminação de microrganismos endopatógenos. Devido à grande variação dos protocolos de aplicação da ozonioterapia, variabilidade metodológica dos estudos e escassez de estudos clínicos, não é possível afirmar que o ozônio pode ser considerado um substituto ao NaOCl. No entanto, alguns autores relatam que o ozônio pode ser utilizado como um agente coadjuvante na redução de microrganismos presentes nos canais radiculares e uma alternativa viável para os casos em que o NaOCl está contraindicado.

REFERÊNCIAS

1. Siqueira JF. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-93.
2. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(2):231-52.
3. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J.* 2007;40(2):85-93.
4. Estrela C, Holland R, Estrela CRA, Alencar AHG, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent J.* 2014;25(1):3-11.
5. Siqueira Junior JF, Rôças IDN, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz Oral Res.* 2018;32(supp1):e65.

6. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod.* 2004;30(11):778-81.
7. Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology.* 2003;20(2):106-14.
8. Lynch E. Evidence-based efficacy of ozone for root canal irrigation. *J Esthet Restor Dent.* 2008;20(5):287-93.
9. Cardoso MG, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(3):e85-91.
10. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J.* 2009;42(1):3-13.
11. Stoll R, Venne L, Jablonski-Momeni A, Mutters R, Stachniss V. The disinfecting effect of ozonized oxygen in an infected root canal: an in vitro study. *Quintessence Int.* 2008;39(3):231-6.
12. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *J Endod.* 2012;38(4):523-6.
13. Jankovic B, Klaric E, Prskalo K, Marovic D, Panduric V, Tarle Z. Antimicrobial effectiveness of intracanal ozone treatment. *Acta Stomatol Croat.* 2013;47(2):127-36.
14. Hubbezoglu I, Zan R, Tunc T, Sumer Z. Antibacterial efficacy of aqueous ozone in root canals infected by *Enterococcus faecalis*. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(7):e11411.

15. Noites R, Pina-Vaz C, Rocha R, Carvalho MF, Goncalves A, Pina-Vaz I. Synergistic antimicrobial action of chlorhexidine and ozone in endodontic treatment. *Biomed Res Int.* 2014;592423.
16. Boch T, Tennert C, Vach K, Al-Ahmad A, Hellwig E, Polydorou O. Effect of gaseous ozone on *Enterococcus faecalis* biofilm-an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2016;20(7):1733-9.
17. Nogales CG, Ferreira MB, Montemor AF, Rodrigues MFA, 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.
18. Kist S, Kollmuss M, Jung J, Schubert S, Hickel R, Huth KC. Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2017;21(4):995-1005.
19. Pinheiro SL, da Silva CC, da Silva LA, Cicotti MP, Bueno CES, Fontana CE, et al. Antimicrobial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, and ozonated water as irrigants in mesiobuccal root canals with severe curvature of mandibular molars. *Eur J Dent.* 2018;12(1):94-9.
20. Silva EJNL, Prado MC, Soares DN, Hecksher F, Martins JNR, Fidalgo TKS. The effect of ozone therapy in root canal disinfection: a systematic review. *IntEndod J.* 2020;53(3):317-32.
21. Plutzer B, Zilm P, Ratnayake J, Cathro P. Comparative efficacy of endodontic medicaments and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *AustDent J.* 2018;63(2):208-16.
22. Ricucci D, Siqueira Junior JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010;36(8):1277-88.

23. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18(4):267-80.
24. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Saiz-Manzano A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(3):364-72.
25. Alshanta OA, Shaban S, Nile CJ, McLean W, Ramage G. *Candida albicans* biofilm heterogeneity and tolerance of clinical isolates: implications for secondary endodontic infections. *Antibiotics (Basel).* 2019;8(4):204.
26. Guo X, Liu S, Zhou X, Hu H, Zhang K, Du X, et al.. Effect of D-cysteine on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Sci Rep.* 2019;9:6689.
27. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *IntEndod J.* 2005; 38(1):22–9.
28. Brignardello-Petersen R. Insufficient evidence regarding the effects of ozone when used as a disinfectant in root canal therapy. *JADA.* 2020;151(5): e43.