

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DA ÁGUA OZONIZADA E
CLOREXIDINA 0,12% SOB A CAVIDADE ORAL DE EQUINOS**

MARYELLE FERNANDES DUARTE

**LAGES
2022**

MARYELLE FERNANDES DUARTE

**COMPARAÇÃO DO EFITO ANTIMICROBIANO DA ÁGUA OZONIZADA E
CLOREXIDINA 0,12% SOB A CAVIDADE ORAL DE EQUINOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque

Coorientador: Profa. Dra. Sandra Maria Ferraz.

**LAGES
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da Biblioteca Setorial do
CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Duarte, Maryelle Fernandes
Comparação do efeito antimicrobiano da água ozonizada e clorexidina ,12% sob a cavidade oral de equinos / Maryelle Fernandes Duarte – 2022. 44p

Orientador: Joandes Henrique Fonteque
Coorientadora: Sandra Maria Ferraz
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2022.

1. Cavidade oral. 2. Bacteremia. 3. Antimicrobiano. 4. Equinos.
I. Fonteque, Jaondes Hernique. II. Ferraz, Sandra Maria. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
IV. Título

MARYELLE FERNANDES DUARTE

COMPARAÇÃO DO EFITO ANTIMICROBIANO DA ÁGUA OZONIZADA E CLOREXIDINA 0,12% SOB A CAVIDADE ORAL DE EQUINOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Joandes Henrique Fonteque
UDESC

Membros:

Profa. Dra. Ana Karina Couto Hack
UDESC

Membros:

Prof. Dr. Luiz Flávio Nepomuceno do Nascimento
UNIPAM

Lages, dezembro de 2022

Dedico este trabalho a toda egrégora espiritual, aos meus pais, e ao meu irmão. Sem eles não teria conseguido chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a toda a Egrégora Espiritual que abriu portas e me sustentou até o exato momento, me dando força e caminhos abertos, sempre dando colo, afagando mesmo que de longe, estando comigo me guardando e amparando.

Agradeço, aos meus pais, Eunápio Luiz Duarte e Simone de Fátima Fernandes, e ao meu irmão Hélio Fernandes Canedo Neto, que não mediram esforços para que eu corresse atrás dos meus sonhos, por mais que tivemos tantas desavenças, sempre sabíamos que poderíamos contar um com o outro.

A minha casa, Centro Espiritualista de Umbanda Anjos de Luz, a qual é meu pedaço do céu e que sempre me imaginava presente quando precisava de força.

Aos meus zeladores de santo, Pai Rodrigo Claudino do Amaral, e mãe Nathalia Gonçalves do Amaral, que dividiram comigo não somente os momentos de felicidade, de realizações, mas também, momentos ruins, de angústia, saudade, choro, e principalmente por se fazerem presentes mesmo que de longe.

Não podendo também de deixar de agradecer aos meus irmãos de santo, que não irei citar cada um, para não cometer o erro de esquecer algum, mas agradeço por todo apoio.

Agradeço as médicas veterinárias e amigas Paloma de Souza Carvalho e Thaís Coelho Valente, por estarem sempre presente nessa caminhada, agregando tanto no crescimento profissional, como no pessoal, saibam que sem a ajuda de vocês talvez não estaria findando esse ciclo agora. Agradeço também a Carol Barroco em nome dos demais amigos de Lages/SC que foram grandes parceiros na minha caminhada nessa cidade.

Ao meu orientador Dr. Joandes Henrique Fonteque, pela oportunidade de conseguir realizar um sonho, por toda a ajuda, por me fazer sair da minha zona de conforto e principalmente pelo apoio sempre que necessário.

A minha coorientadora, Dra. Sandra Maria Ferraz, por toda a troca profissional, pela disponibilidade de esclarecer dúvidas, e auxiliar quando necessário.

Ao professor Jefferson pelo auxílio nas análises estatísticas e por ajudar na interpretação dos resultados.

Ao CAV/UDESC por ter me abraçado e ter sido casa nesse ciclo, também a todos os alunos e pessoas conhecidas nesse local, meu muito obrigada por cada ensinamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro no fornecimento da bolsa de estudos necessária ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao Haras da Mata JW, Aline Ribeiro , Éder Botelho e Lucas Botelho, por terem cedidos todos os animais e auxílio para a realização do experimento.

E por fim, aos cavalos, que são minha paixão, também os animais que mostram tanta lealdade, docura, e companheirismo, meu muito obrigada.

“Sejas Forte e Corajoso! Não se apavore, nem desanime,
pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde
andar.”

Josué 1:9.

“A direção é mais importante que a velocidade!”
Preto Velho Pai Cipriano

RESUMO

A cavidade oral é composta por uma microbiota extensa, que em desequilíbrio podem ocasionar enfermidades. O surgimento de bactérias cada vez mais resistentes a medicamentos leva à constante prospecção e produção de fármacos. A clorexidina é um antimicrobiano de eleição para procedimentos orais, devido a sua ação bacteriostática e bactericida. O ozônio, como terapia alternativa é utilizado devido ao alto poder oxidativo. As doenças orais podem ocasionar sepse, capaz de levar o animal ao óbito. Devido a estes problemas, há uma necessidade estudos sobre a ação dos antimicrobianos para se obter melhor saúde bucal e bem-estar dos animais. O presente trabalho teve como objetivo a comparação da atividade antimicrobiana da clorexidina 0,12% e água para injeção ozonizada (100 μ /ml) na cavidade oral equina. Foram colhidas amostras de 50 equinos adultos (5-18 anos), machos e fêmeas, da raça Quarto de Milha, utilizando suabes com meio de conservação Stuart do sulco gengival e bochecha. Primeiramente, a cavidade oral foi limpa com água para injeção, e após a colheita das amostras, os animais foram divididos em grupo clorexidina (n=25) e grupo ozônio (n=25). Em seguida, a cavidade oral de cada equino foi lavada com 300 mililitros de solução de clorexidina 0,12% utilizando seringa de enxague bucal. Após cinco minutos, foi realizada nova colheita de amostra. No grupo ozônio, foi utilizado água para injeção ozonizada na concentração de 100 μ g/ml, após cinco minutos foi realizada a colheita de uma nova amostra da cavidade oral. Para obtenção da solução ozonizada, foi utilizado um equipo fazendo a ponte entre a bolsa e um equipamento gerador de ozônio através de um circuito fechado, pelo método de borbulhamento, com fluxo de 0,125 ou 1/8L/min de oxigênio durante 16 minutos, em temperatura ambiente. A solução ozonizada foi utilizada imediatamente após a sua produção. Os suabes foram refrigerados e encaminhados até o laboratório, onde após diluição das amostras foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e identificação dos microrganismos. Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste t student ($P < 0,05$). Houve diferença na contagem de UFC antes e após o tratamento no grupo clorexidina, e após tratamento entre o grupo clorexidina e ozônio. Houve crescimento de gram positivos *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus* spp, seguidos por gram negativos *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Psedomonas* spp, e células leveduriformes antes dos tratamentos, e após tratamento o grupo clorexidina um maior poder sob os gêneros isolados. A clorexidina 0,12% têm poder antimicrobiano maior do que a água para injeção ozonizada 100 μ /ml.

Palavras chaves: microbiota oral, ozônio, antimicrobiano, equinos.

ABSTRACT

The oral cavity is composed of an extensive microbiota, which in unbalance can cause diseases. The emergence of bacteria increasingly resistant to drugs leads to constant research and production of drugs. Chlorhexidine is an antimicrobial of choice for oral procedures, due to its bacteriostatic and bactericidal action. Ozone, as an alternative therapy, is used due to its high oxidative power. Oral diseases can cause sepsis, capable of leading the animal to death. Due to these problems, there is a need for studies on the action of antimicrobials to obtain better oral health and welfare of the animals. The present study aimed at comparing the antimicrobial activity of chlorhexidine 0,12% and ozonated water for injection (100 µ/ml) in the equine oral cavity. Samples were collected from 50 adult horses (5-18 years old), male and female, of the Quarter Horse breed, using Stuart preservation medium swabs from the gingival sulcus and cheek. First, the oral cavity was cleaned with water for injection, and after sampling, the animals were divided into chlorhexidine group (n=25) and ozone group (n=25). Then, the oral cavity of each horse was rinsed with 300 milliliters of 0,12% chlorhexidine solution using a mouth rinse syringe. After five minutes, a new sample was collected. In the ozone group, ozonated injection water at a concentration of 100 µg/ml was used, and after five minutes a new sample was collected from the oral cavity. To obtain the ozonated solution, a syringe was used between the bag and an ozone generator equipment through a closed circuit, using the bubbling method, with a flow of 0.125 or 1/8 L/min of oxygen for 16 minutes, at room temperature. The ozonated solution was used immediately after its production. The suabes were refrigerated and sent to the laboratory, where after dilution of the samples the colony forming units (CFU) were counted and the microorganisms were identified. For the statistical analyses, the t student test was used ($P < 0.05$). There was a difference in the CFU count before and after treatment in the chlorhexidine group, and after treatment between the chlorhexidine and ozone groups. There was growth of gram positive *Staphylococcus* coagulase negative, *Streptococcus* spp, followed by gram negative *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Psedomonas* spp, and yeast cells before treatments, and after treatment the chlorhexidine group a greater power over the isolated genera. It is concluded that chlorhexidine 0,12% has a greater antimicrobial power than ozonated injection water 100µ/ml.

Key words: oral microbiota, ozone, antimicrobial, horses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da clorexidina (Hortense et al, 2010)	22
Figura 2: Produção do Ozônio (Noagles, 2008).....	24
Figura 3: Frequência de isolamento das bactérias do gênero <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.	36
Figura 4: Figura 3: Frequência de isolamento das bactérias do gênero <i>Streptococcus spp.</i> da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.....	37
Figura 5: Frequência de isolamento das bactérias do gênero <i>Escherichia coli</i> da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.....	38
Figura 6: Frequência de isolamento das bactérias do gênero <i>Klebsiella spp</i> da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.	39
Figura 7: Frequência de isolamento das bactérias do gênero <i>Pseudomonas spp</i> da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.....	40
Figura 8: Frequência de isolamento das bactérias do gênero Células Leveduriformes da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.....	41
Figura 9: Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) da cavidade oral de equinos antes e após o tratamento com clorexidina 0,12% e ozônio a 100 μ /ml.	42

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Frequência das bactérias identificadas na cavidade oral de equinos adultos da raça Quarto de Milha.....	35
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

% porcentagem

μ l – microlitro

CEUA – Comitê de ética de uso de animais

GC – Grupo Clorexidina

GO – Grupo Ozônio

L - Litro

Mg - Miligramas

ml – mililitros

UFC – Unidades Formadoras de Colonias

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
OBJETIVOS.....	17
Objetivo Geral	17
Objetivo específico	17
HIPÓTESE	18
REVISÃO DE LITERATURA	19
CLOREXIDINA	21
OZÔNIO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CLOREXIDINA É SUPERIOR A ÁGUA OZONIZADA NA REDUÇÃO DA MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL DE EQUINOS	30
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAS E METODOS.....	33
COMITÊ DE ÉTICA.....	33
LOCAL.....	33
ANIMAIS	33
ALIMENTAÇÃO.....	33
SOLUÇÃO DE ÁGUA DE INJEÇÃO OZONIZADA.....	33
CLOREXIDINA 0,12%	33
DESING DO ESTUDO.....	34
ANÁLISES DE AMOSTRAS.....	34
Identificação	34
Contagem de Unidades Formadoras de Colonias.....	35
Análise estatística	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

INTRODUÇÃO

As superfícies da cavidade oral são colonizadas por uma infinidade de microrganismos, o quais encontram nos tecidos bucais meio favorável à sua multiplicação. *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Fusobacterium spp.* e *Prevotella spp.* são algumas espécies que dominam a microflora cultivável da cavidade oral equina (BIENERT et al., 2003).

O perigo do desequilíbrio da flora bacteriana reside no fato dessas bactérias poderem penetrar na circulação sanguínea e provocar infecções sistêmicas e em outros órgãos como coração, fígado, rins e articulações (BIENERT et al., 2003; SANTOS et al., 2014).

O estudo da microbiota oral dos equinos é importante uma vez que determinadas afecções na cavidade oral, desencadeiam efeito cascata que pode levar a perda total dos dentes até graves doenças sistêmicas. Mesmo os procedimentos cirúrgicos ou a odontoplastia podem ser portas de entrada desses microrganismos para a circulação sanguínea, causando bacteremia, colonização de outros órgãos e sepse, podendo levar o animal a óbito dependendo da severidade e o local de infecção (KERN, 2017).

De forma a minimizar a acumulação da placa bacteriana e as doenças associadas, recomenda-se o uso de antissépticos orais. A clorexidina é a principal substância química utilizada para manutenção da saúde bucal, uma vez que sua ação antibacteriana age contra bactérias gram positivas e gram negativas, sendo eficaz contra o *Streptococcus mutans*, agente iniciador da carie dentária (ALMEIDA; BASTOS, 2001; HORTENSE et al., 2010).

O desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos e a falta de novos fármacos é um problema presente tanto na medicina quanto na medicina veterinária (GORDON, 2021).

Devido a resistência, são necessárias novas alternativas antimicrobianas, como a ozonoterapia, para tratamento de afecções da cavidade oral. O emprego do ozônio como terapia no tratamento de enfermidades orais tem minimizado o percurso clínico de afecções. O ozônio apresenta alto potencial de oxidação quando utilizado como agente antimicrobiano contra protozoários, vírus, bactérias e fungos, promovendo excelentes resultados quando comparados a terapias convencionais. Essas características justificam o

interesse crescente na ozonoterapia aplicada à odontologia (NAGAYOSHI, 2004; HUTH et al., 2016).

Portanto, faz-se necessário mais estudos sobre novas alternativas antimicrobianas devido ao desenvolvimento de resistência das bactérias aos comumente utilizados na odontologia equina. Neste contexto, o objetivo do presente estudo, foi comparar o poder antimicrobiano da água para injeção ozonizada ($100\mu\text{ml}$) e a clorexidina 0,12% na cavidade oral de equinos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito antimicrobiano da clorexidina 0,12% e solução de água para injeção ozonizada 100 μ /ml na cavidade oral de equinos.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Identificação dos microrganismos presentes na cavidade oral dos equinos.
- Comparar o efeito antimicrobiano da clorexidina 0,12% e a solução água para injeção ozonizada na concentração de 100 μ g/ml microbiota na cavidade oral de equinos.

HIPÓTESE

H0: A água para injeção ozonizada (100 μ /ml) terá maior poder antimicrobiano do que a clorexidina 0,12% na cavidade oral de equinos.

REVISÃO DE LITERATURA

A odontologia equina ganhou substancialmente mais atenção na medicina equina nas últimas duas décadas. É vista como prática preventiva, no entanto, as enfermidades dentárias frequentemente não são detectadas até que a doença presente esteja avançada. Os sinais clínicos podem estar ausentes ou serem sutis, como deixar cair alimentos parcialmente mastigados da boca (HOLMSTROM et al., 2013).

Perda gradual da condição corporal devido à alimentação ineficiente também pode ser observada. Outros sinais como halitose, hiper salivação, relutância em alimentar-se e embolsamento de alimentos bucais são alguns dos sinais clínicos observados em equinos acometidos por doenças na cavidade oral (DIXON et al. 2008).

A domesticação e a estabulação dos equinos limitaram o tamanho das áreas e o tempo destinado ao pastejo, além de preestabelecer os horários, quantidade, qualidade e o tipo do alimento oferecido. Essa condição de manejo ocasionou mudanças nos hábitos, surgimento de desequilíbrios oclusais e da microbiota oral dos equinos (DITTRICH et al., 2010).

Tanto nos homens, quanto nos animais, as superfícies da cavidade oral são colonizadas por uma infinidade de microrganismos. Alguns fazem parte da microbiota normal, sendo outros patogênicos, os quais encontram nos tecidos bucais um meio favorável à sua multiplicação (BIENERT et al., 2003).

O microbioma oral é um dos mais complexos do organismo animal, existindo várias comunidades bacterianas, que se encontram bem-organizadas e estruturadas. As bactérias desempenham papel fundamental na saúde do paciente, uma vez que contribui não só para o desenvolvimento do sistema imunitário, como também possui aspectos prejudiciais para os seres vivos (HE e SHI, 2009; SCANNAPIECO, 2013; WADE, 2013).

Embora o papel da cavidade oral como reservatórios para agentes patogênicos seja minimizado na medicina moderna, eles são, no entanto, grande preocupação, especialmente para pacientes imunocomprometidos ou vulneráveis. Os antissépticos orais podem desempenhar papel significativo na redução do risco de infecções bacterianas após procedimentos clínicos na cavidade oral, e também podem ter importância na redução da gravidade das infecções periodontais crônicas (RAUTEMAA et al., 2007).

O processo patológico das doenças da cavidade oral tem início com a modificação das populações da microbiota (ZHU et al., 2020). A superfície dental normalmente apresenta-se envolta por película adquirida, composta de glicoproteínas salivares e anticorpos, o que proporciona aderência bacteriana, mecanismo inicial que ocasiona infecção (WILSON, 2001).

O acúmulo de microrganismos na cavidade oral desencadeia a formação do que são conhecidos como biofilmes, que por sua vez dão origem a doenças infecciosas como as periodontites (BROOK, 2008).

Devido a origem multifatorial da doença periodontal causa alteração nos mecanismos de sustentação e manutenção da dentição. Sua gravidade, manifestação e progressão são principalmente determinadas pela composição do biofilme, podendo ser encontradas até 600 espécies de bactérias em uma única análise bucal (BROOK, 2008).

A doença dentária é uma grande preocupação para o bem-estar animal. A incidência de doenças odontológicas graves como diástema, e doenças periodontais é alta, mas pouca atenção tem sido dada a essas condições. De fato, é um problema comum que a maioria dos equinos não receba exames odontológicos e tratamentos preventivos regularmente, seja por razões econômicas dos tutores, falta de conhecimento da necessidade dos animais ou mesmo a falta da assistência odontológica (ZHU et al., 2020).

As bactérias têm se mostrado como agentes causadores em doenças periodontais felinas, caninas e humanas e, portanto, é altamente provável que elas tenham papel fundamental na patogênese também na espécie equina (SYKORA, 2014).

Há uma grande semelhança entre a microbiota sub-gengival de equinos, e a microbiota de homens, cães e gatos (KENNEDY, 2016). No decorrer do tratamento odontológico, as bactérias orais podem penetrar na circulação sanguínea e, assim, causar bacteremia. A bacteremia transitória pode progredir para sepse ou, se as bactérias orais se estabelecerem em outros órgãos, podem causar infecções em locais distantes, como endocardite, meningite e abscessos cerebrais ou hepáticos (PARAHITIYAWA et al., 2009; KERN, 2017).

Essas potenciais complicações são significativas quando se considera que a exodontia é frequentemente realizada em pacientes idosos que têm risco significativamente maior de infecção disseminada como resultado de condições imuno-debilitantes (GLICKMAN et al., 2009).

Os locais específicos de residências dessas bactérias encontram-se principalmente em superfícies de tecidos duros, em vez de moles, uma vez que a afinidades pelos dentes, principalmente na parte sub-gengival, é particularmente alta devido a impactação crônica de alimentos, resultando em acumulação dessas bactérias, mais conhecida como placa (DEWHIRST et al., 2010; GAO et al., 2016).

Sabe-se que antibióticos, administrados por via sistêmica, são disponibilizados em sua forma ativa, no fluido gengival e fluxo salivar, possibilitando, dessa forma, que essas drogas no

sulco gengival exerçam efeito bactericida ou bacteriostático sobre os microrganismos da placa subgengival. Geralmente, quando há condições, inicia-se a antibioticoterapia antes do procedimento odontológico, devido a supremacia da profilaxia ao tratamento (OBEROI et al., 2015).

Agentes antimicrobianos têm efeito direto na modulação da microbiota oral. Essas substâncias exercem sua atividade através de dois mecanismos de ação (sozinhos ou em combinação): efeito bacteriostático - agem em bactérias adesivas primárias inibindo sua proliferação e adesão à superfície, diminuindo a proliferação microbiana, a qual não irá permitir a ligação de outras bactérias ocultas, e efeito bactericida - eliminando espécies bacterianas já presentes (LIN et al., 2010).

A resistência dos microrganismos a medicamentos antimicrobianos tornou-se um grande problema mundial, uma vez que pode afetar a saúde humana, aumentando a exposição a bactérias resistentes, devido ao uso inadequado e excessivo em animais domésticos. Devido a essa resistência, vários adjuntos químicos têm sido estudados para melhorar o resultado da saúde bucal (FAZOLI et al., 2020).

A clorexidina é a solução mais utilizada e pesquisada nos últimos anos, que exibe eficácia no controle de bactérias patogênicas na cavidade oral. Mesmo baixas concentrações são suficientes para retardar ou eliminar o crescimento bacteriano (HORTENSE et al., 2010).

Outros métodos alternativos já estão sendo estudados para o controle de microrganismos na cavidade oral. A ozonoterapia na odontologia pode ser utilizada como recurso benéfico de forma preventiva ou como tratamento de alterações por conta de algumas propriedades como a ação antimicrobiana, analgésica, desintoxicante, imunoestimulante devido a sua biocompatibilidade com tecidos orais (DAS, 2011).

CLOREXIDINA

A clorexidina é formada por dois anéis cloro fenólicos e dois grupos bis-biguanida, unidos igualmente por cadeias de hexametilênica, e está disponível em três formas químicas: diglutamato, acetato e hidrocloreto. A forma comercial mais comum é o digluconato, que tem maior atividade devido à sua solubilidade, permitindo combinação com álcool (HORTENSE et al., 2010).

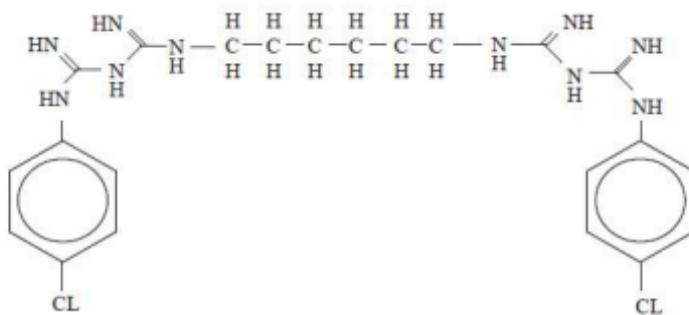


Figura 1: Estrutura química da clorexidina (Hortense et al., 2010)

A clorexidina foi desenvolvida na década de 1950 como antisséptico dérmico para uso em lesões cutâneas, mas rapidamente ganhou popularidade em outras áreas da medicina, como obstetrícia e ginecologia. Na odontologia, foi primeiramente utilizada como spray oral pré-cirúrgico, e em endodontia. É atualmente o padrão-ouro para antissépticos orais e um dos compostos mais pesquisados em medicina dentária (ANKOLA e al., 2008; KRAYER et, al., 2010).

Tem amplo espectro de ação sob os microrganismos, principalmente contra bactérias gram positivas e gram negativas, aeróbicas e anaeróbicas, leveduras, fundos, tendo vários estudos que relataram sua eficácia contra o *Streptococcus mutans* agente iniciador da carie dentária, e sob vírus, como o HIV, HBV e herpes simplex (ALMEIDA; BASTOS, 2001; HORTENSE et al, 2010, MAYA, et al., 2011).

Seu mecanismo de ação é direto nas membranas citoplasmáticas das bactérias, ocasionando o extravasamento do ácido nucleico e potássio, porém sem eficácia contra os esporos, mas caso seja submetida a altas temperaturas pode apresentar efetividade (BAMBACE et al, 2003).

Suas várias formas de apresentação, são focos de estudos, que avaliam os resultados na diminuição do desenvolvimento da placa dentária, no intuito de prevenir a doença periodontal e a carie. Em altas concentrações, o efeito é bactericida, enquanto em baixas concentrações, o efeito é bacteriostático (MATHUR et al, 2011; MAYA et al., 2011).

As soluções em concentração de 0,12% a 0,2% são comumente utilizadas para procedimentos odontológicos, inibindo o crescimento de bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Streptococcus mutans* (HORTENSE et al, 2010).

Também é utilizado no tratamento pré-operatório de feridas em uma concentração de 4%, diariamente porque não tem absorção pela pele. Para a desinfecção de instrumentos limpos, sua concentração é de 0,05% imersa por 30 minutos, e na desinfecção de superfícies, a concentração de 2% a clorexidina, tem sido eficiente (BAMBACE et al, 2003, HERRERA et al, 2007).

Com sua habilidade antisséptica combinada com sua capacidade de ligar-se à superfície oral e eliminá-la lentamente, devido a interação eletrostática, dos grupos com cargas negativas existentes na cavidade bucal, atraídas pelas cargas positivas da clorexidina, há aumento na permeabilidade celular, o que leva à quebra do citoplasma e morte celular. (HORTENSE et al, 2010).

A exposição da cavidade oral a clorexidina por 60 segundos, já é o suficiente para a prevenção da formação da placa e da gengivite superficial, com baixa toxicidade e mínimos efeitos colaterais (HORTENSE et al., 2010).

OZÔNIO

O gás ozônio (O₃) é uma partícula gasosa natural, constituído por três átomos de oxigênio, instável que se converte rapidamente em oxigênio. Seu nome é derivado da origem grega “ozein”, cheiro, devido ao seu forte odor (COSTANZO et al., 2015).

Encontrado naturalmente na atmosfera em forma gasosa pode ser produzido de duas maneiras: naturalmente pelos raios ultravioletas do sol ou artificialmente por um gerador que cria ozônio a partir de oxigênio puro através de uma descarga elétrica com alta tensão e alta frequência, sua meia-vida é de aproximadamente 40 min a 25° C, e a partir desse tempo, se decompõem em oxigênio em uma velocidade dependente da temperatura ambiente (BOCCI et al., 2011).

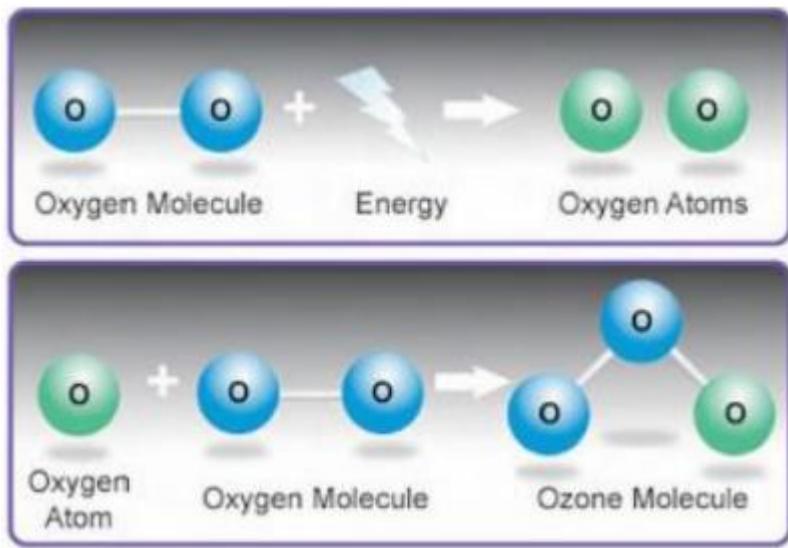


Figura 2: Produção do Ozônio (Noagles 2008)

Foi descoberto pelo alemão Friedrich Christian Schönbein no ano de 1840, usado pela primeira vez na Primeira Guerra Mundial, em soldados alemães para tratamento de gangrena gasosa, devido seu forte efeito bactericida sobre o *Clostridium* (ZENG; LU, 2018). Desde então, vem sendo frequentemente utilizado como modalidade terapêutica alternativa em várias enfermidades que acometem os humanos e animais domésticos, além de ser um procedimento economicamente acessível (VENDRUSCRULO, 2018).

Apesar do fato de que a inalação de ozônio é prejudicial aos pulmões, outras formas de uso têm mostrado alto valor terapêutico ao longo de um século de uso. O principal exemplo é o fato de que é a única medicação que tem pouco ou nenhum efeito colateral quando usado em doses terapêuticas (NAGAYOSHI, 2004).

Na medicina tal como na medicina veterinária, várias doenças estão sendo tratadas com a aplicação de gás oxigênio (O^3), que auxilia na oxigenação tecidual e reduz a inflamação. Inicialmente, o O^3 causa estresse oxidativo transitório no corpo interagindo com os lipídios da membrana citoplasmática, e essa interação desencadeia a produção de antioxidantes endógenos, melhorando a perfusão local e a oxigenação do tecido, e reduzindo respostas inflamatórias (BOCCI et al, 2011; ROSUL; PATSKAN, 2016; ZENG; LU, 2018).

Os métodos de administração direta de ozônio podem ser via subcutânea (SC), intramuscular (IM), intra retal, instradiscal, intracavitaria (espaços peritoneal e pleural), intravaginal, intrauretral e vesical, e auto-hemoterapia ozonizada (BOCCI, 2011).

Na natureza, o ozônio é o gás mais importante da estratosfera. Pode ser gerado espontaneamente em tempestades com tormentas elétricas, e também em fumaças onde várias

substâncias sob ação da luz ultravioleta reagem com oxigênio e formam o ozônio (SAINI, 2011).

Diferente de outros produtos farmacêuticos, o ozônio necessita ser preparado próximo ao local de sua utilização por seu limite de estabilidade, ou seja, volta a ser oxigênio em curto espaço de tempo quando usado por vias parenterais ou diretamente em forma de gás. Misturado com água e óleo é possível utilizar topicalmente em tempos mais prolongados (BOCCI et al., 2011).

O ozônio apresenta solubilidade em água 50% superior à do oxigênio. Quando dissolvido em água esterilizada ou pura, sua meia vida é de 9 a 10 horas em um pH=7 e a 20°C, e a 0°C este valor pode praticamente duplicar (BOCCI et al., 2006).

As doses terapêuticas são segmentadas em três tipos referentes a seu mecanismo de ação, doses baixas: de 5 a 20 µg/ml tem ação imunomoduladoras, bioestimuladoras e reparadora, as doses médias: 25 a 35 µg/ml, também imunomoduladoras além de estimuladoras do sistema enzimático de defesa antioxidante, e doses altas: 40 a 60 µg/ml ação antimicrobianas e antibióticas, empregadas especialmente em úlceras ou feridas infectadas (ESTRELA et al., 2006).

Em aplicações odontológicas, com água ou óleo ozonizado, seu uso é indicado, inibindo a formação de “biofilme” bacteriano (VELANO et al., 2001). Amostras de placas dentaria foram tratadas com 4 ml de água ozonizada por 10s-60s e foi observado que a substância é eficaz no combate de microrganismo orais gram positivos como *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii* e gram-negativos (NAGAYOSHI et al., 2004, JOHANSSON et al., 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, B. S; BASTOS, J. R. M. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de placa dentária de escolares. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 49, n. 3, p. 133-138, 2001.
- ANKOLA, A. V., HEBBAL, M., MOCHERLA, M. A review of efficacy of various modes of chlorhexidine delivery **Journal of Oral Biosciences**. v. 50, n. 4, p.239–242, 2008.
- BAMBACE, A. M. J. et al. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. **Revista Biociências**, v. 9, n. 2, p.73-81, 2008.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- BIENERT, A; BARTMANN, C.P; VERSPOHL, J; DEEGEN E; Bacteriological findings for endodontical and apical molar dental diseases in the horse. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**. v.110, n.9, p. 358-61, 2003.
- BOCCI V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research**. v. 37, n.4, p.25-35, 2006.
- BOCCI, V; ZANARDI, I; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical Gas Research**, v.1, n.1, p. 6-15, 2011.
- BROOK, A. N. Periodontal therapy. **Topics in Companion Animal Medicine** v. 23, n. 2, p. 81- 90, 2008.
- COSTANZO, M. et al. Low ozone concentrations stimulate cytoskeletal organization, mitochondrial activity and nuclear transcription. **European Journal of Histochemistry**, v. 59, n. 2515, p. 129–136, 2015.
- DAS, S. Application of ozone therapy in dentistry. **Indian Journal of Dental Advancements**. v. 3, n. 2, p. 538 – 542, 2011.
- DEWHIRST, F.E; CHEN, T; IZARD, J; PASTER, B.J; TANNER, A.C; YU, W.H; LAKSHMANAN, A; WADE, W.G; The human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**. v.192, n.19, p. 5002-17, 2010.
- DITTRICH, J.R.; MELO, H.A.; AFONSO, A.M.C.F. et al. Comportamento ingestivo de cavalos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.130-137, 2010.

- DIXON, P. M; BARAKZAI, S; COLLINS, N; YATES. J; Treatment of equine cheek teeth by mechanical widening of diastemata in 60 horses (2000–2006). **Equine Veterinary Journal**. v. 40, p. 22–28, 2008.
- 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 Dentistry Journal**. v.17, n.2, p. 134-138, 2006.
- FAZOLI, K.G.Z; DOS SANTOS, I.C; CAETANO, I.C.S. Resistencia a antibióticos em membros da família *Enterobacteriaceae* isolados de cavalos usados para tração. **Journal Pure and Applied Microbiology**. v.14, n.2, p.1149-1156, 2020.
- GAO, W; CHAN, Y; YOU, M; LACAP-BUGLER, D.C; LEUNG, W.K; WATT, R.M. In-depth snapshot of the equine subgingival microbiome. **Microbial Pathogenesis**. v.94, n.1, p.76-89, 2016.
- GLICKMAN, L.T; GLICKMAN, N.W; MOORE, G.E; GOLDSTEIN, G.S; LEWIS, H.B. Avaliação do risco de endocardite e outros eventos cardiovasculares com base na gravidade da doença periodontal em cães. **Veterinário**. v. 234, p.486-494, 2009.
- GORDON, J; ÁLVAREZ, S; PERONI, J. Antimicrobial effects of equine platelet lysate. **Frontiers in Veterinary Science**. v.8, n.1, p.955, 2021.
- HE, X; SHI, W. Oral microbiology: past, present and future. **International Journal of Oral Science**. v. 1, n. 2, p. 47–58, 2009.
- HERRERA, B. et al. O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no Distrito de São Carlos do Jamari – RO. **Revista de Periodontia**, v.17, n.4, p.60-64, 2007.
- HOLMSTROM, S.E et al. AAHA Dental care guidelines for dogs and cats. **Journal of American Animal Hospital Association, JAAHA**, v.49, p.75 - 82, 2013.
- HORTENSE, S. R. Use of chlorhexidine as a preventive and therapeutic agent in dentistry. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.
- HUTH, K.C; JACOB, F.M; SAUGEL, B; CAPPELLO, C; PASCHOS, E. HOLLWOCK, R, et al. Effect of ozone oral cells compared with established antimicrobials. **European Journal of Oral Sciences**. v.114, n.5, p.135-40, 2006.
- JOHANSSON, E; CLAESSEN, R; VAN DIJKEN, J.W. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. **Journal of Dentistry**, v.37, n.6, p.449-53, 2009.
- KENNEDY, R; LAPPIN, D.F; DIXON, P.M. The microbiome associated with equine periodontitis and oral health. **Veterinary Research**. v.14, n.47, p.49, 2016.

- KERN, I; BARTMANN, C. P; VERSPOHL, J; ROHDE, J; BIENERT-ZEIT, A. Bacteraemia before, during and after tooth extraction in horses in the absence of antimicrobial administration. **Equine Veterinary Journal**. v.49, n.2, p. 178–182, 2017.
- KRAYER, J.W., et al. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**. v. 54, n.1, p.13–33, 2010.
- LIN, J; TE, et al. Clinical efficacy of phase I therapy combined with a triclosan/copolymer dentifrice on generalized chronic periodontitis. **Journal of Dental Sciences**. v.5, n.4 p.216–220, 2013.
- MATHUR, S., et al. Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**. v.1, n.2, p.45–50, 2011.
- MAYA, J., et al. Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. **Infectio**. v.15, n.2, p.98–107, 2011.
- NAGAYOSHI. M; et al; Effectiveness of ozone on the survival and permeability of oral microorganisms. **Oral Microbiol Immunology**. v.19, n.4 p.240-6, 2004.
- OBEROI, S. S; CHANDAN, D; GAURAV SHARMA, D, S; Antibiotics in dental practice: how justified are we. **International Dental Journal**, v.65, n.1, p.4-10, 2015.
- PARAHITIYAWA, N.B., JIN, L.J., LEUNG, W.K., YAM, W.C. SAMARANAYAKE, L.P. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. **Clinical Microbiology Reviews**. v.22, n.1, p.46-64, 2009.
- RAUTEMAA, R., et al. Oral infections and systemic disease - An emerging problem in medicine. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 13, n. 11, p.1041–1047, 2007.
- ROSUL, M. V.; PATSKAN, B. M. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus. **Wiadomosci Lekarskie**, v. 69, n. 1, p. 7–9, 2016.
- SAINI, R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**, v. 2, p.151, 2011.
- SANTOS, F. F. dos; ALEXANDRE, C. V.; PILEGI, R. A. S.; VIGNOTO, V. K. C.; RIBEIRO, M. G.; WOSIACKI, S. R. Identificação da microbiota da cavidade oral de equinos. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia**. v.17, n. 1, p. 27-30, 2014.
- SCANNAPIECO, F.A. The oral microbiome: Its role in health and in oral and systemic infections. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 35, n. 20, p. 163–169, 2013.
- SYKORA, S; PIEBER, K; SIMHOFER, H; HACKL, V; BRODESSER, D; BRANDT, S. Isolation of *Treponema* and *Tannerella* spp. from equine odontoclastic tooth resorption and

hypercementosis related periodontal disease. **Equine Veterinary Journal.** v. 46, n. 3, p. 358
2014

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.

VENDRUSCOLO, C.D.P; MOREIRA, J.J; SEIDEL, S.R.T; FU'LBER, J; NEUENSCHWANDER, H.M; BONAGURA, G. Effects of medical ozone upon healthy equine joints: Clinical and laboratorial aspects. **PLoS ONE** v.13, n.5. Article:0197736, 2018.

WADE, W.G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacological Research.** v.69, n.1, p.137–143, 2013.

WILSON, M; Bacterial biofilms and human disease. **Science Progress.** v.84, n.3 p.235- 254, 2001.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International Immunopharmacology**, v. 56, n. 138, p. 235–241, 2018.

ZHU, Y; JIANG, W; HOLYOAK, R; LIU, B; LI, J. Investigation of oral microbiome in donkeys e the effect of dental care on oral microbial composition. **Animals.** v.10, n.12, p.2245, 2020.

CLOREXIDINA É SUPERIOR A ÁGUA OZONIZADA NA REDUÇÃO DA MICROBIOTA DA CAVIDADE ORAL DE EQUINOS

RESUMO

Há uma microbiota diversificada presente na cavidade oral. Devido ao surgimento bactérias resistentes a medicamentos, há uma constante necessidade de estudo e produção de novos fármacos. A clorexidina é um produto usado para diminuir microbiota oral sendo empregada em diversas áreas da saúde, veterinária, farmacêutica e alimentícia. O ozônio, vem ganhando espaço como terapia alternativa, devido ao seu poder oxidativo, e ações bactericidas, fungicidas e viricidas. As bactérias da cavidade oral podem entrar na corrente sanguínea e causar bacteremia, sepse, capaz de levar o animal a óbito. Devido a estes problemas, há uma necessidade estudos sobre a ação dos antimicrobianos para se obter uma melhor saúde bucal e bem-estar dos animais. O presente trabalho teve como objetivo a comparação da atividade antimicrobiana da clorexidina 0,12% e água para injeção ozonizada (100 μ ml) na cavidade oral equina. Foram colhidas amostras de 50 equinos adultos (5-18 anos), machos e fêmeas, da raça Quarto de Milha, utilizando suabes com meio de conservação Stuart do sulco gengival e bochecha. Primeiramente, a cavidade oral foi limpa com água para injeção, e após a colheita das amostras, os animais foram divididos em grupo clorexidina (n=25) e grupo ozônio (n=25). Em seguida, a cavidade oral de cada equino foi lavada com 300 mililitros de solução de clorexidina 0,12% utilizando seringa de enxague bucal. Após cinco minutos, foi realizada nova colheita de amostra. No grupo ozônio, foi utilizado água para injeção ozonizada na concentração de 100 μ g/ml, após cinco minutos foi realizada a colheita de uma nova amostra da cavidade oral. Para obtenção da solução ozonizada, foi utilizado um equipo fazendo a ponte entre a bolsa e um equipamento gerador de ozônio através de um circuito fechado, pelo método de borbulhamento, com fluxo de 0,125 ou 1/8L/min de oxigênio durante 16 minutos, em temperatura ambiente. A solução ozonizada foi utilizada imediatamente após a sua produção. Os suabes foram refrigerados e encaminhados até o laboratório, onde após diluição das amostras foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) e identificação dos microrganismos. Para as análises estatísticas, foi utilizado o teste t student ($P<0,05$). Houve diferença na contagem de UFC antes e após o tratamento no grupo clorexidina, e após tratamento entre o grupo clorexidina e ozônio. Houve crescimento de gram positivos *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus* spp, seguidos por gram negativos *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas* spp, e células leveduriformes, leveduriformes antes dos tratamentos, e após tratamento o grupo clorexidina um maior poder sob os gêneros isolados. A clorexidina 0,12% têm poder antimicrobiano maior do que a água para injeção ozonizada 100 μ ml.

Palavras chaves: cavidade oral, ozônio, antimicrobiano, equinos

ABSTRACT

There is a diverse microbiota present in the oral cavity. Due to the emergence of drug-resistant bacteria, there is a constant need for study and production of new drugs. Chlorhexidine is a product used to reduce oral microbiota and is used in several areas of health, veterinary, pharmaceutical and food. Ozone is gaining space as an alternative therapy, due to its oxidative power, and bactericidal, fungicidal, and viricidal actions. Bacteria from the oral cavity can enter the bloodstream and cause bacteremia, sepsis, capable of leading the animal to death. Due to these problems, there is a need for studies on the action of antimicrobials to obtain better oral health and welfare of animals. The present work aimed at comparing the antimicrobial activity of chlorhexidine 0.12% and ozonated water for injection (100 μ /ml) in the equine oral cavity. Samples were collected from 50 adult horses (5-18 years old), male and female, of the Quarter Horse breed, using Stuart preservation medium swabs from the gingival sulcus and cheek. First, the oral cavity was cleaned with water for injection, and after sampling, the animals were divided into chlorhexidine group (n=25) and ozone group (n=25). Then, the oral cavity of each horse was rinsed with 300 milliliters of 0,12% chlorhexidine solution using a mouth rinse syringe. After five minutes, a new sample was collected. In the ozone group, ozonated injection water at a concentration of 100 μ /ml was used, and after five minutes a new sample was collected from the oral cavity. To obtain the ozonated solution, a syringe was used between the bag and an ozone generator equipment through a closed circuit, using the bubbling method, with a flow of 0.125 or 1/8 L/min of oxygen for 16 minutes, at room temperature. The ozonated solution was used immediately after its production. The suabes were refrigerated and sent to the laboratory, where after dilution of the samples the colony forming units (CFU) were counted and the microorganisms were identified. For the statistical analyses, the t student test was used ($P<0.05$). There was a difference in the CFU count before and after treatment in the chlorhexidine group, and after treatment between the chlorhexidine and ozone groups. There was growth of gram positive *Staphylococci* coagulase negative, *Streptococcus* spp, followed by gram negative *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas* spp, and yeast, yeast cells before treatments, and after treatment the chlorhexidine group a greater power over the isolated genera. That chlorhexidine 0.12% has greater antimicrobial power than ozonated injection water 100 μ /ml.

Key words: oral cavity, ozone, antimicrobial, equine

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde bucal equina é motivada principalmente pelo impacto direto das infecções dentárias no desempenho e na longevidade dos animais (KLUGH, 2005), bem como sua associação com infecções localizadas ou doenças infecciosas graves (BROOK, 2008).

A microbiota intraoral bacteriana é fisicamente diversificada, a colonização inicial é gram-positiva facultativa, seguida por gram-negativa, e uma colonização secundária com bactérias gram-negativo anaeróbicas estritas ocorrem à medida que as lesões avançam (LINDHE, 2003).

No transcorrer de tratamento dentários, as bactérias orais circulantes podem entrar na circulação sanguínea, e consequentemente causar bacteremia (TAKAI et al., 2005).

A ocorrência de bacteremia transitória é relatada na medicina desde 1930 durante manipulações e tratamentos dentários. Principalmente durante a extração dentaria, a qual tem maior poder de indução da bacteremia, podendo progredir para sepse e causar infecções em locais distantes (KERN, 2017)

A clorexidina é a solução mais utilizada e pesquisada nos últimos anos na odontologia, devido a sua eficácia na ação antibacteriana, boa estabilidade, baixa toxicidade e por possuir boa penetração (HORTESE et al, 2010, MOREIRA et al, 2010).

Uma das maiores ameaças à saúde de humanos e animais é o desenvolvimento de microrganismos resistentes à ação de drogas antimicrobianas e desinfetantes. Embora os incentivos para o desenvolvimento de novas drogas eficaz no controle de microrganismos, novas alternativas vêm sendo estudadas, como a utilização da ozonioterapia (PANDISELVAM et al., 2017).

Ozônio tem sido estudado em medicina e ciências biológicas por décadas, tornando-se um agente terapêutico versátil que auxilia no tratamento de várias doenças (BOCCI, 2011). Além disso, devido a suas propriedades germicidas, promove a destruição de espécies microbianas e atualmente é utilizada em uma variedade de campos (PANDISELVAM, 2018).

Há diversas formas de se empregar o ozônio, entretanto, as de maior interesse à área odontológica são: gás ozônio, água ozonizada, e óleo ozonizado (DAS, 2011).

O objetivo do presente estudo, foi comparar o poder antimicrobiano da água para injeção ozonizada e a clorexidina a 0,12% na cavidade oral de equinos.

MATERIAS E METODOS

COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), sob número de protocolo 9291131221.

LOCAL

O experimento foi realizado no Haras da Mata JW na cidade Patos de Minas-MG,
Latitude: -18.5721 Longitude: -46.4432

ANIMAIS

Foram selecionados 50 equinos, adultos (5-18 anos), machos e fêmeas, da raça Quarto de Milha que não receberam nenhum tratamento com antimicrobianos e nenhum tratamento odontológico por um período de pelo menos oito semanas.

ALIMENTAÇÃO

Os animais eram criados em sistema intensivo, e recebiam três quilos de ração granulada melaçada dividida em duas vezes ao dia, 20kg de feno tifton 85 a vontade por dia, e 20kg de silagem de milho divido em duas vezes ao dia, e água *ad libitum*.

SOLUÇÃO DE ÁGUA DE INJEÇÃO OZONIZADA

Foi utilizada solução de injeção comercial acondicionada em bolsas com conteúdo de 1.000mL em sistema fechado.

Para obtenção da solução ozonizada, foi utilizado a concentração de 100 µg/ml, ozonizada através de um circuito fechado, pelo método de borbulhamento, com fluxo de 0,125 ou 1/8L/min de fluxo de oxigênio e o dosador na posição 8 durante 16 minutos, com equipo fazendo a ponte entre a água para injeção e o equipamento gerador de ozônio (Ozone & Life®) em temperatura ambiente.

CLOREXIDINA 0,12%

Foi utilizada solução de clorexidina 0,12% adquirida comercialmente (Riohex Gard 0,12% ®).

DESING DO ESTUDO

Primeiramente foi realizada a limpeza da cavidade oral utilizando solução estéril de água para injeção comercial; utilizando seringa de enxague bucal de 300ml (Ortovet), para a retirada de restos de alimentos.

A colheita de amostras foi por meio de haste flexível descartável com pontas de algodão esterilizadas (suabes) com meio de conserva meio Stuart do sulco gengival dos dentes pré-molares inferiores e bochecha, do lado esquerdo, após abertura da boca por lateralização da língua.

Após a primeira colheita, os animais foram divididos em grupo clorexidina e grupo ozônio contendo 25 animais em cada grupo.

No grupo clorexidina foi realizada a limpeza com clorexidina 0,12%, utilizando seringa de enxague bucal de 300ml (Ortovet), após cinco minutos, foi realizada nova colheita.

No grupo ozônio, foi utilizado solução de água de injeção ozonizada na concentração de 100 µg/ml, obtido após 16 minutos de borbulhamento. Logo após o preparo da solução, foi realizado o mesmo procedimento anteriormente relatado.

Foram utilizadas três seringas de enxague bucal de 300ml, sendo uma para cada solução (solução de água de injeção pura, clorexidina, e água de solução de injeção ozonizada). Foi realizada a desinfecção das seringas a cada animal, deixando-as mergulhadas por cinco minutos em 10g solução desinfetante (Virkon® S) diluídos em dois litros de água morna, para que não ocorresse contaminação entre os animais.

Os suabes foram armazenados sob refrigeração até serem levados para o Laboratório de Patologia Clínica do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) para o processamento das amostras.

ANÁLISES DE AMOSTRAS

Identificação

Para a identificação dos microrganismos, o material foi inoculado nos meios Ágar Sangue e MacConkey, ambos incubados a 35°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) por 24 horas, sendo o primeiro em restrição de oxigênio (Jarra de Anaerobiose).

Após esse período foi analisado o crescimento dos microrganismos fazendo a triagem por meio da coloração de gram com subsequente análise em microscópio óptico. As colônias que apresentaram crescimento de células leveduriformes foram assim descritas.

As gram positivas foram submetidas à prova da catalase e, com as que manifestaram positividade, foram realizadas, ainda, a prova da coagulase. As que se mostravam gram negativas foram identificadas com o auxílio do sistema EPM-MILI-CITRATO®.

Contagem de Unidades Formadoras de Colonias

Para a contagem de unidades formadora de colônia (UFC), os suabes foram adicionados em micro tubos contendo 500 microlitros de solução salina a 0,85%.

Após agitação de cinco minutos em vórtex, a solução salina contendo o inoculo foi diluída na base de 10, variando de 1/10 ou 10⁻¹, 1/100 ou 10⁻², 1/1.000 a 10⁻³.

Aproximadamente 10 microlitros de cada solução foi então inoculado em placas de ágar Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, EUA), e suplementado com 5% de sangue ovino utilizando alça de Drigalski. A contagem foi realizada com 24-48 horas após a inoculação. Todas as colônias foram contadas e as placas contendo entre 30 e 300 colônias foram consideradas válidas para o cálculo final em UFC (unidades formadoras de colônia) total.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi utilizado o teste t student do programa The SAS Systems The GLM Procedure com nível de significância de probabilidade de 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados a partir das amostras, cocos gram-positivos, sendo *Staphylococcus coagulase negativa*, e *Streptococcus* spp. Juntamente, foram isolados cocos gram-negativos, representados pelo gênero *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp, residentes na região da gengiva equina (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência das bactérias identificadas na cavidade oral de equinos adultos da raça Quarto de Milha criados em regime intensivo.

Gênero	Antes do Tratamento	Após Tratamento	
		Clorexidina	Ozônio
<i>Staphylococcus</i> negativa	coagulase	25/25	25/25
		20/25	24/25

<i>Streptococcus</i>	2/25	-	1/25	-
<i>Klebsiella</i>	17/25	17/25	6/25	14/25
<i>Escherichia coli</i>	23/25	22/25	6/25	22/25
<i>Pseudomonas</i>	1/25	1/25	-	1/25
Células Leveduriformes	8/25	13/25	3/25	13/25

O crescimento de gram positivos do gênero *Staphylococcus* coagulase negativa foi de 100% (25/25) de colônias presentes nas amostras examinadas, antes do tratamento em ambos os grupos. No grupo clorexidina (GC) e grupo ozônio (GO), com pequena queda após tratamento, houve presença em 80% (20/25) dos animais no grupo clorexidina e 96% (24/25) no grupo ozônio (Figura 3).

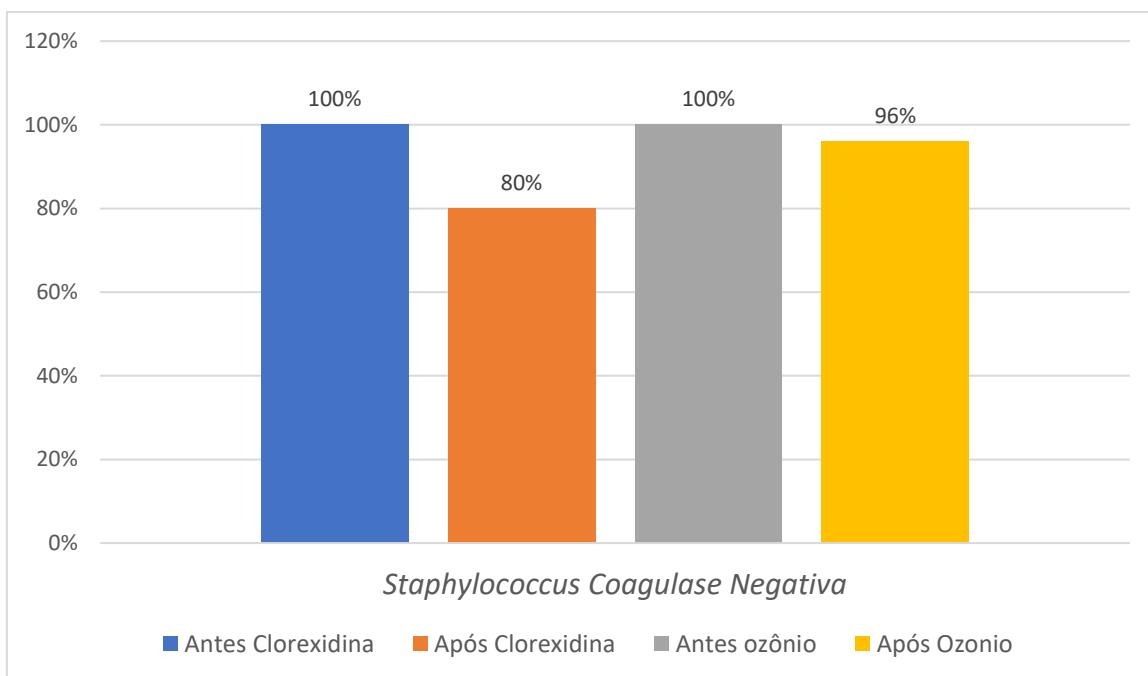


Figura 3: Frequência de isolamento das bactérias do gênero *Staphylococcus* coagulase negativa da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* coagulase negativa foram predominantemente encontradas nas amostras coletadas antes do tratamento nos grupos clorexidina e ozônio. Esses achados são consistentes com os relatados na literatura sobre microbiota oral humana, onde as espécies de *Staphylococcus* colonizam entre 90 e 94% dos adultos saudáveis (PERCIVAL et al., 1991; ELLIOTT, 2005), sendo a espécie *Staphylococcus epidermidis* o principal agente associado com as infecções, especialmente com a bacteremias (CUNHA et al., 2002; CHANG, 2003).

O gram positivo *Streptococcus* spp, foi identificado em apenas 2/25 (8%) dos animais observados do GC antes do tratamento (Figura 4), e após tratamento em apenas 1/25 (4%), esse gênero bacteriano não foi isolado antes nem após tratamento no GO.

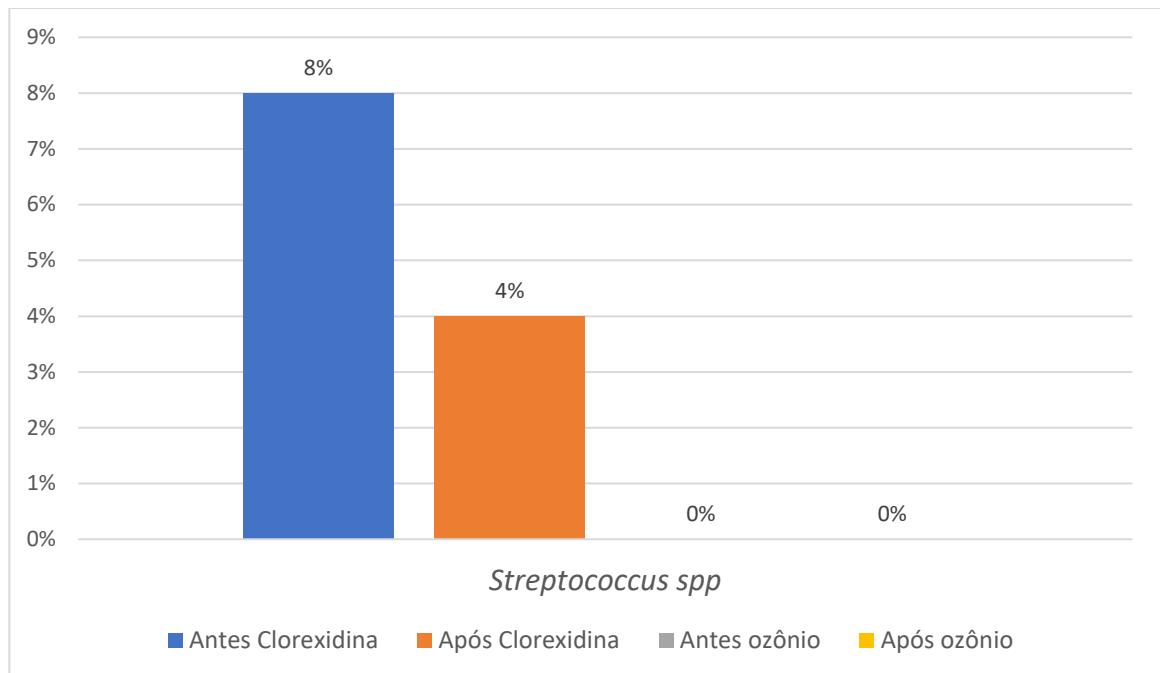


Figura 4: Figura 3: Frequência de isolamento das bactérias do gênero *Streptococcus* spp. da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com cloredixina e ozônio.

O isolamento de microrganismos, particularmente *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., que são agentes associados a várias doenças em humanos e animais, confirmaram e demonstraram semelhança com a microbiota oral humana. Da mesma forma que tais microrganismos são considerados transitivos da cavidade oral, sua frequente presença, pode ser apontada como potencial fonte de infecção, sendo sugerido melhor avaliação não apenas de animais saudáveis clinicamente (ELLIOTT, 2005).

Bactérias gram negativa do gênero *Escherichia coli* tiveram crescimento significativo em ambos os grupos, GC e GO, estando presente em 92% (23/25) e 88% (22/25) dos animais nos grupos respectivamente. Após tratamentos, o crescimento bacteriano foi inferior aos de antes do tratamento, o gênero *Escherichia coli* presente em 24% (6/25) no grupo cloredixina e 56% (14/25) das amostras analisadas no grupo ozônio pós-tratamento (Figura 5).

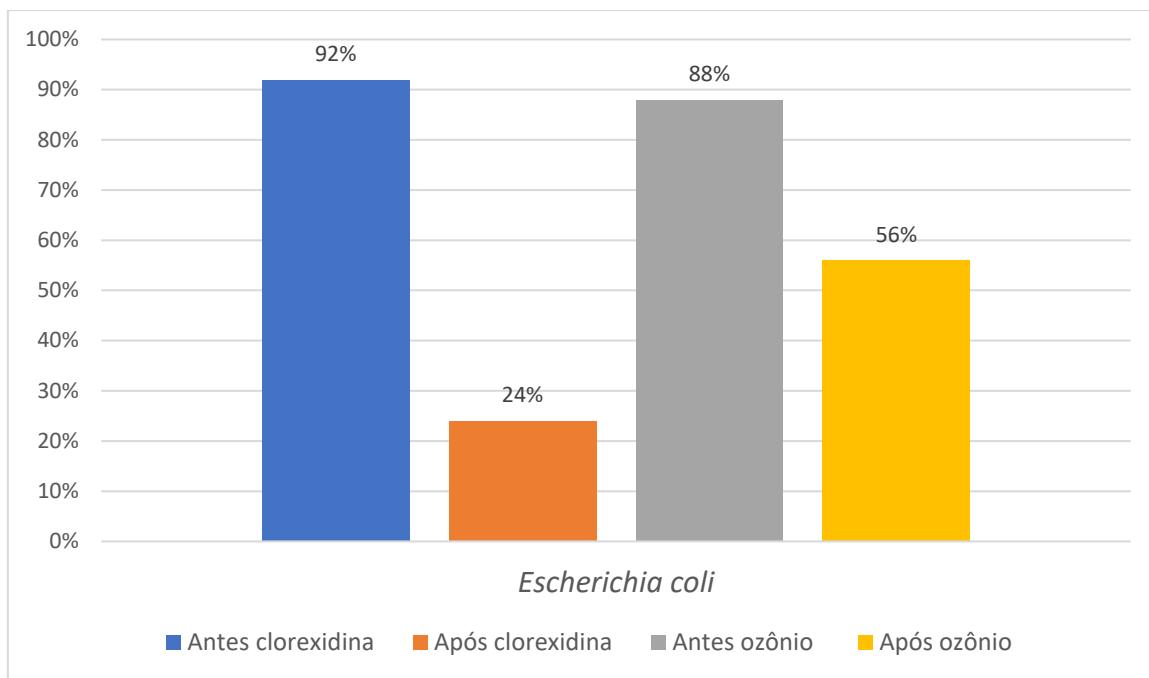


Figura 5: Frequência de isolamento das bactérias do gênero *Escherichia coli* da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.

Um dos principais patógenos da família Enterobacteriaceae é a *Escherichia coli*, o qual foi encontrada em 80% das amostras analisadas. Essa alta porcentagem provavelmente é devido esses microrganismos ter a colonização no trato digestivo de mamíferos logo após o nascimento, e persistirem como membro importante da microbiota normal (QUINN et al, 2005).

E também fatores predisponentes que permitem a colonização, tornando assim os animais mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença clínica, como idade, estado imunológico, natureza da dieta e grande exposição a linhagens patogênicas (QUINN et al, 2005).

Bactérias do gênero *Klebsiella* spp. foram isoladas em 68% (17/25) no GC e em 68% (17/25) no GO antes do tratamento, após o tratamento foi isolado em apenas 24% (6/25) no GC, e no grupo ozônio, 56% (14/25) (Figura 6).

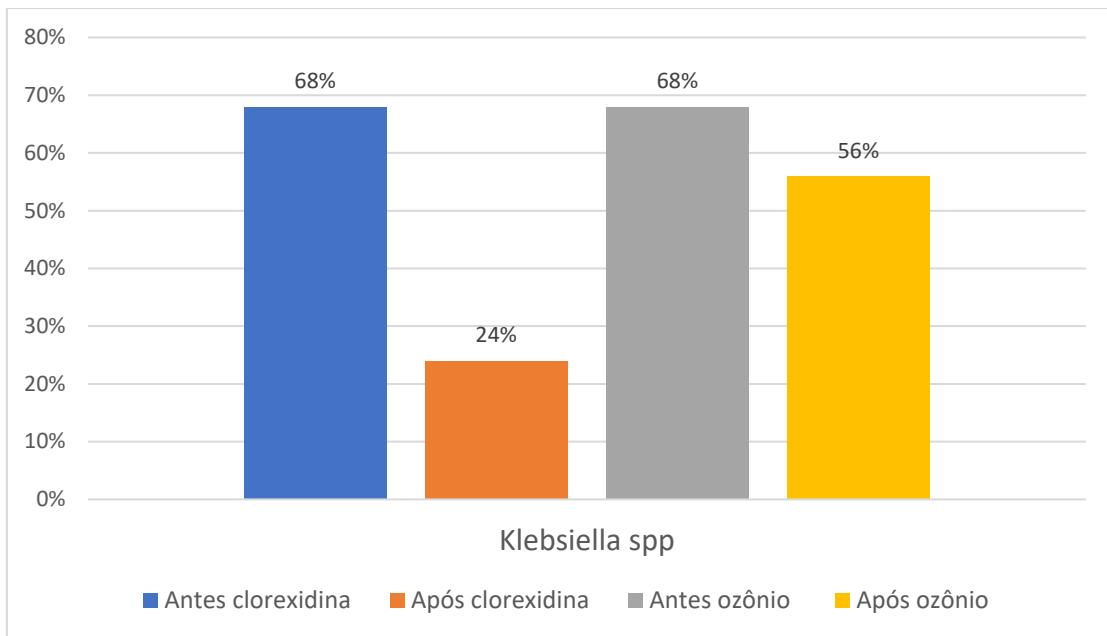


Figura 6: Frequência de isolamento das bactérias do gênero *Klebsiella* spp da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com cloredixina e ozônio.

A *Klebsiella* spp., é uma bactéria oportunista, da família Enterobacteriaceae, que é encontrada como causadora de mastite em vacas, penetram nas glândulas mamárias através da serragem utilizada como “cama” (QUINN et al., 2005). Podendo estar presente na cavidade oral nos animais estudados, devido ao uso do mesmo componente como “cama” nas baias onde são instalados.

O gênero *Pseudomonas* spp. esteve presente em 1/25 (4%) em ambos os grupos antes dos tratamentos. Esse gênero não foi isolado no grupo cloredixina após tratamento. Entretanto, no GO, esteve presente em 4% (1/25) dos animais. (Figura 7).

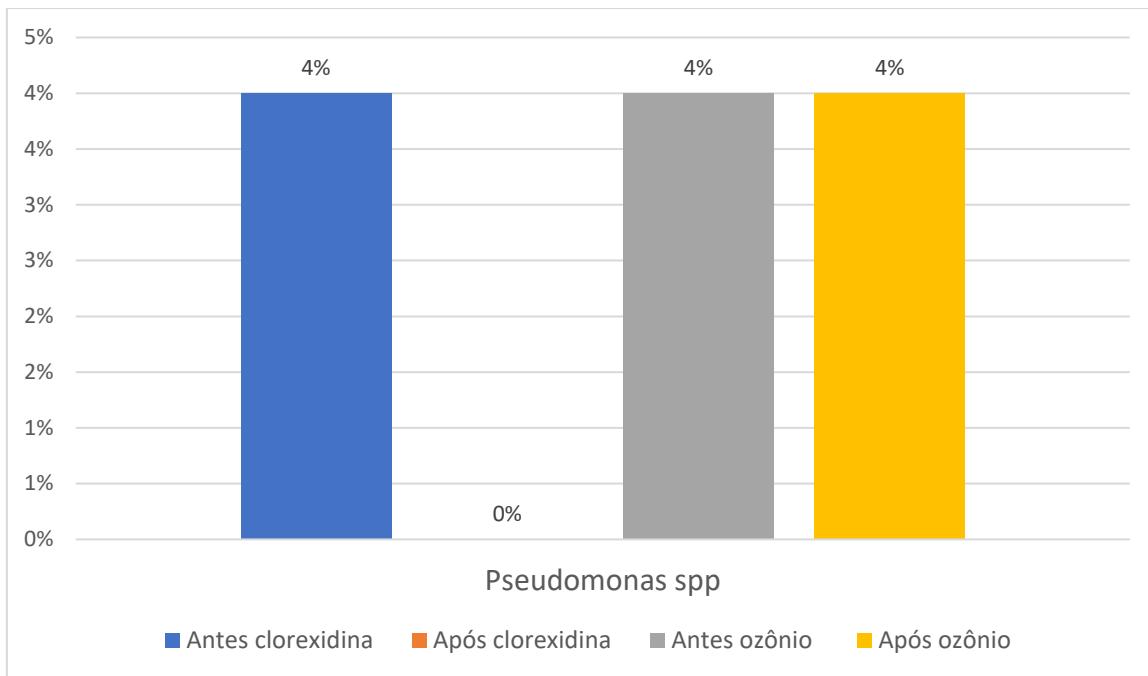


Figura 7: Frequência de isolamento das bactérias do gênero *Pseudomonas* spp da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.

Pseudomonas são microrganismos ambientais, presente tanto na água quanto no solo, que entram no organismo através de feridas, ou por inalação. Bactérias gram negativas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente são menos susceptíveis aos antissépticos e desinfetantes que bactérias gram positivas. Isso pode acontecer, devido à presença de componentes na membrana externa dessas bactérias, incluindo o lipopolissacarídeo. A qual é ausente nas bactérias gram positivas (NIKAIDO, 2003).

As células leveduriformes em 32% (8/25) no GC, com crescimento menor após tratamento sendo isolados em 12% (3/25) no grupo clorexidina, e 52% (13/25) no GO, no momento antes do tratamento e após tratamento (Figura 8).

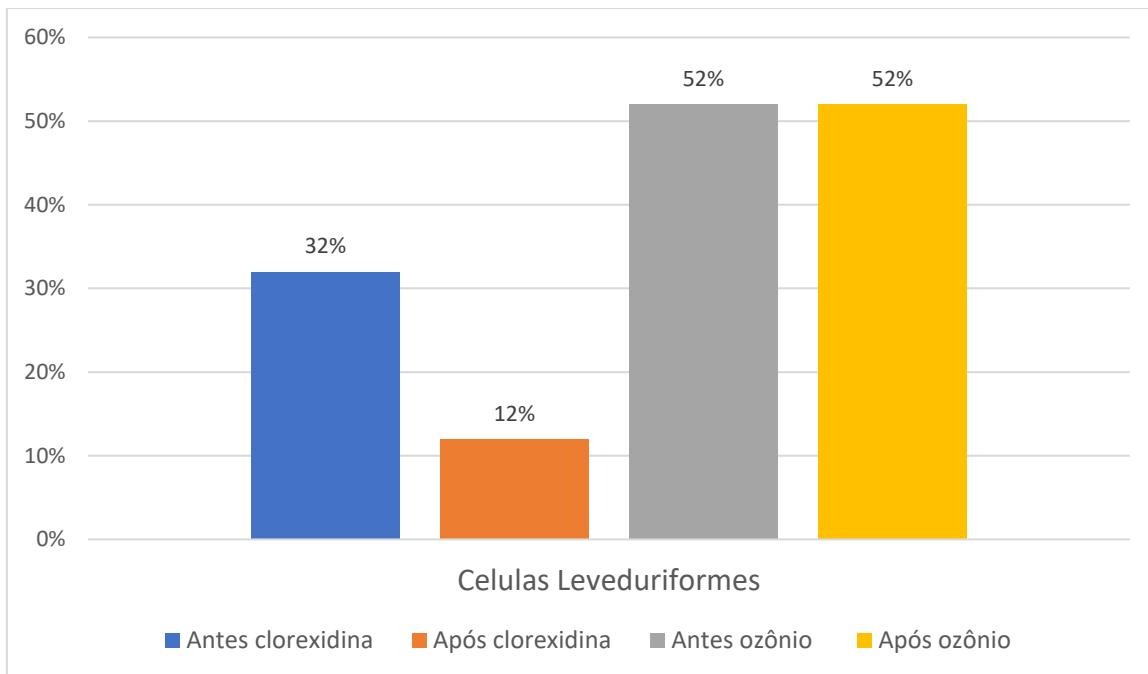


Figura 8: Frequência de isolamento das bactérias do gênero Células Leveduriformes da cavidade oral de equinos antes e após tratamento com clorexidina e ozônio.

Os fungos também fazem parte do habitat oral, mas devido à competição com as bactérias, associadas aos mecanismos de defesa do organismo, eles se mantêm em equilíbrio na microbiota oral, podendo ocasionar doenças em pacientes com imunossupressão, estressados ou debilitados (QUINN, 2005).

Os resultados, com o uso da clorexidina a 0,12% demonstram crescimento de microrganismos antes e após tratamento, dos quais pós-tratamento houve maior efetividade na redução das UFC's (Figura 9).

Segundo Kluk (2016), pequenos agrupamentos de sais de clorexidina são suficientes para retardar ou eliminar o crescimento bacteriano.

A clorexidina devido a sua alta afinidade com a parede celular do microrganismo induz mudanças na superfície dessa estrutura, resultando em perda do equilíbrio osmótico e precipitação do citoplasma. Além disso, a clorexidina se liga a superfícies aniónicas da cavidade bucal e é então liberada gradualmente, continuando assim a sua atividade bacteriostática (ARAUJO, et al., 2001).

Entretanto no grupo ozônio, tanto, antes do tratamento quanto, após, a efetividade da redução das UFC's foi menor (Figura 9). Entretanto, Deboni (2009), afirma, que a água ozonizada tem potencial de ser utilizada na redução de infecções causadas por microrganismos bucais, pelo seu efeito bacteriano, na redução da placa bacteriana.

Em comparação pós tratamento dos grupos clorexidina e ozônio, houve uma redução significativa da UFC dos indivíduos, e através da análise descritiva pode ser observado que o grupo clorexidina apresentava uma mediana antes em torno de 147 e o grupo ozônio uma mediana de 300 (Figura 9).

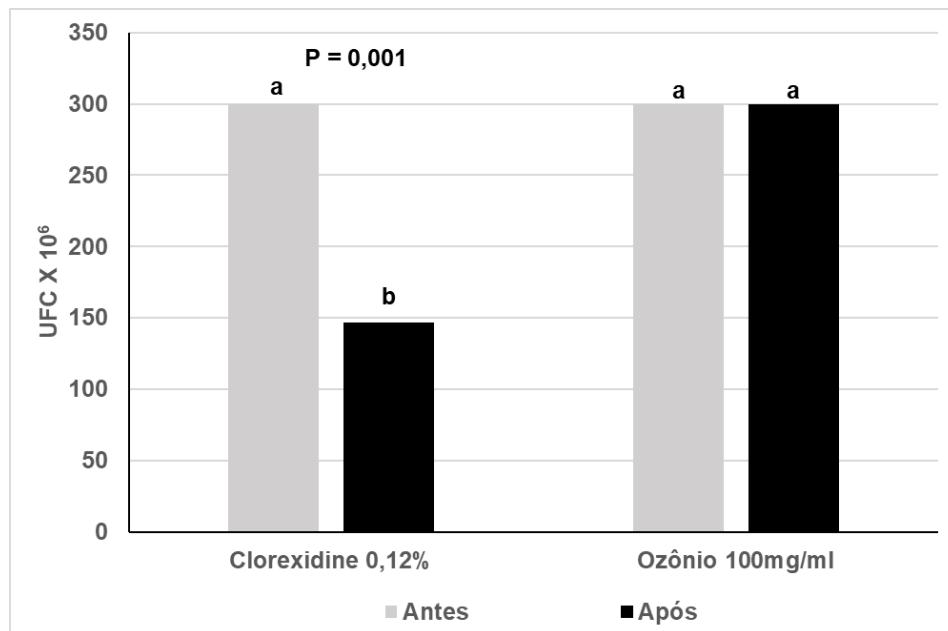


Figura 9: Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) da cavidade oral de equinos antes e após o tratamento com clorexidina 0,12% e ozônio a 100 µ/ml.

A estabilidade do ozônio em água decresce quando o pH do meio aumenta, quando superior a 8,0 praticamente metade do ozônio introduzido é decomposto em várias formas intermedias ao oxigênio, a temperatura abaixo de 20° C também determina a durabilidade do ozônio dissolvido, pois o frio estabiliza a molécula (KIM et al., 2003; BOCCI, et al., 2006). A água para injeção tem pH 5,0 a 7,0, porém retém menos ozônio, mas ainda é indicada para o processo de ozonização (KIM et al., 2003). No presente trabalho, a ozonização foi realizada em temperatura ambiente, com temperatura elevada 28° C, o que pode ter influenciado ao não sucesso da água para injeção ozonizada no trabalho.

O ozônio apresenta atividade bactericida contra bactérias gram negativas (Tordiglione et al., 2014) e positivas (Zhang et al., 2016). Nossos resultados demonstram pouco efeito bactericida do ozônio em bactérias gram positivas ou negativas.

O ozônio atua nas membranas das células bacterianas, por oxidação de seus componentes lipídicos e lipoproteicos, tornando os esporos defeituosos na germinação, devido aos danos na membrana interna (BOCCI, 2006).

A clorexidina foi eficiente comparada à água ozonizada 100 µ/ml em ação antimicrobiana de aglomerados bacterianos da cavidade oral de humanos (SARTIM, 2005).

Essa discrepância de resultados pode ser justificada, pelo fato que a clorexidina é o padrão ouro de solução antimicrobiana utilizada para tratamento de cavidade oral, sendo assim um produto específico para tal uso (HORTENSE, 2010).

A água de injeção ozonizada apresenta rápida degradação, perdendo rapidamente a ação antimicrobiana (NAGAYOSHI et al., 2004).

A clorexidina preveni o acúmulo de placa e periodontite (LOE, 1976) e reduz a bacteremia antes do tratamento odontológico. Maya et al., (2011) descrevem que a clorexidine 0,2% pode ser empregada como complemento da antibioticoterapia profilática em pacientes de risco.

Novos estudos são necessários para verificar a efetividades da água ozonizada como solução antimicrobiana da microbiota oral abordando um método de ozonização, e as diferentes concentrações, podem variar de 40-120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (HUTH, 2006).

CONCLUSÃO

A clorexidina 0,12% é mais eficiente na redução da microbiota da cavidade oral de equinos em comparação com a água para injeção ozonizada (100 μ /ml).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, M.T.B; ARAUJO, R.P.C; CAMPOS, E.J. Estudo in vitro e in vivo da atividade bactericida da clorexidina 0,12 por cento e a 0,2 por cento e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplax. **Revista Odonto Ciêncencia.** v.16, n. 33, p. 187-200, 2001.
- BOCCI, V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research** v.37, n.4, p.25-35, 2006.
- BOCCI, V; ZANARDI, I; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical Gas Research**, v.1, n.1, p. 6-15, 2011.
- BROOK, A.N. Periodontal therapy. **Topics in Companion Animal Medicine.** v.23, n.2, p.81-90, 2008.
- CHANG, W.N. et al. Epidemiology of adult staphylococcal meningitis in southern Taiwan: a clinical comparison of *Staphylococcus aureus* infection and coagulase-negative staphylococcal infection. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 60, n. 5, p. 262-266, 2007.
- CUNHA, M.L.R.S. et al. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolated from neonates. **J. Pediatr.**, v. 78, n. 8, p. 279-288, 2002.
- DAS S. Application of ozone therapy in dentistry. **Indian Journal of Dental Advancements;** v.3, n.2, p.538–542, 2011.
- DEBONI, M. C. Z. Antissepsia de alvéolos pós-exodontia empregando irrigações trans-operatórias de solução de ozônio diluído em água. 77 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Cirurgia Buco Maxilo Facial, **Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2009.
- ELLIOTT, D. R. et al; Cultivable oral microbiota of domestic dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5470-5476, 2005
- HORTENSE, S. R. Use of chlorhexidine as a preventive and therapeutic agent in dentistry. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.** v. 22, n. 2, p. 178-184, 2010.
- BOCCI, V. Ozone as a janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediator of inflammation.** V. 13, n.1, p.3-11, 2004.
- HUTH KC, JAKOB FM, SAUGEL B, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. **Eur J Oral Sci** v.114, n.2, p. 435–40, 2006.
- KIM S., SUNG M. Inadequate antioxidant nutrient intake and altered plasma antioxidant status of rheumatoid arthritis patients. **J. Am. Coll. Nutr.** V.22, n.4, p. 311, 2003.
- KLUGH, D.O. Equine periodontal disease. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, n.2, p.135–47, 2005.

- KLUK, E. et al. Uma abordagem sobre a clorexidina: ação antimicrobiana e modos de aplicação. **Revista Gestão & Saúde**, v. 14, n. 1, p. 07 – 13, 2016.
- LINDHE J, KARRING T, LANG NP. Clinical periodontology and implant dentistry. Copenhagen: **Blakwell Munskgaard**, v.4, n.1, p.1058, 2003.
- LOE, H. et al, Two Years oral use of chlrhexidine in man. **J periodontal RES**, v.11, n.3, p. 135-144, 1976.
- MAYA, J., ET AL. Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. **Infectio** v.15, n.2, p.98–107, 2011.
- MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 8, n. 2, p. 153-161, 2010.
- NAGAYOSHI M, et al; Effectiveness of ozone on the survival and permeability of oral microorganisms. **Oral Microbiol Immunology**. v. 19, n. 4, p. 240-6, 2004.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. v., 67 n. 4, p. 593-656, 2003.
- PANDISELVAM, P., SUBHASHINIB, S., BANUU PRIYAC, E. P., KOTHAKOTAD, A., RAMESHA, S. V; SHAHIRE, S. Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. **Ozone: Science & Engineering**, v. 41, n. 1, p. 17-34, 2018.
- PANDISELVAM, R., SUNOJ, S., MANIKANTAN, M., KOTHAKOTA, A; HEBBAR, K. Application and kinetics of ozone in food preservation. **Ozone: Science & Engineering**, v. 39, n. 2, p. 1-11, 2017.
- PERCIVAL, R. S. et al. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microbiota of healthy adults. **Jounal of Medical Microbiology**, v 35, p. 5-11, 1991.
- QUINN P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005b. p. 78-81.
- SARTIM, M. G. Efeito da água ozonizada e gluconato de clorexidina sobre propriedades mecânicas e microbiológicas de materiais utilizados para confecção de próteses odontológicas. 2015. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia, Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, Campus São José do Rio Preto., São José do Rio Preto-SP, 2015.
- TAKAI, S., KURIYAMA, T., YANAGISAWA, M., NAKAGAWA, K. AND KARASAWA, T. Incidence and bacteriology of bacteremia associated with various oral and maxillofacial surgical procedures. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiololgy Endodontics**, v. 99, p. 292-298, 2005.

TORDIGLIONE, P., MORSELLI, F. A., SCARPA, I., PUGGIONI, G., MANCINI, C. & GIORDANO, A. In vitro evaluation of ozone activity on recent clinically isolated bacterial strains. **Advances in Microbiology**, v.4, n.2, p.106-11, 2014.

ZHANG, Y., WU, Q., ZHANG, J. YANG, X. Alteration in Escherichia coli and *Streptococcus faecalis* cells induced by ozone. **Journal of Food Science & Technology**, v. 1, n. 3, p. 106-112, 2016.