

Interação do ozônio com microrganismos: revisão da literatura

Ozone interaction with microorganisms: literature review

Interacción del ozono con microorganismos: revisión de la literatura

Recebido: 25/07/2022 | Revisado: 02/08/2022 | Aceito: 04/08/2022 | Publicado: 15/08/2022

Cleverson Marcelo Pilatti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8930-9113>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: cleversonpilatti@hotmail.com

Rafael Luiz Dias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1723-1417>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: rafael_dias13@hotmail.com

Célia Patrícia Müller Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-0560>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: pattymueller@hotmail.com

Eduardo Alexandre Loth

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9496-7268>
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil
E-mail: alefisio@unioeste.br

Rodrigo Sávio Pessoa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7600-9747>
Instituto Tecnológico de Aeronáutica, Brasil
E-mail: rodrigospessoa@gmail.com

Resumo

O ozônio (O₃) é uma molécula alotrópica que foi descoberta em meados do século XIX. Possui uma estrutura cíclica composta por três átomos de oxigênio que normalmente está presente como gás. O uso do ozônio na prática clínica foi introduzido no século passado por alguns clínicos pioneiros que desenvolveram trabalhos focados principalmente na área de ozônio medicinal aplicada localmente. Desde então, o uso terapêutico em medicina foi estendido a muitas doenças. O objetivo deste estudo é revisar a ação do ozônio sobre variados microrganismos. Para o cumprimento desse trabalho foi realizada uma revisão de literatura na qual foram utilizados artigos os quais abordam temas a respeito do ozônio em diversos aspectos biológicos. O ozônio inativa os microrganismos ao reagir com suas enzimas intracelulares, material nucleico e componentes de seu envelope celular, revestimentos de esporos ou capsídeos virais. Foi constatado que o ozônio é uma excelente opção para múltiplos usos, desde o tratamento de sanitização, quanto para uso medicinal de agentes patogênicos e também de purificação da água.

Palavras-chave: Ozônio; Microrganismos; Biofilme.

Abstract

Ozone (O₃) is an allotropic molecule that was discovered in the mid-19th century. It has a cyclic structure composed of three oxygen atoms which is normally present as a gas. The use of ozone in clinical practice was introduced in the last century by some pioneering clinicians who developed work mainly focused on the area of locally applied medicinal ozone. Since then, the therapeutic use in medicine has been extended to many diseases. The aim of this study is to review the action of ozone on various microorganisms. In order to carry out this work, a literature review was carried out in which articles were used that address topics about ozone in various biological aspects. Ozone inactivates microorganisms by reacting with their intracellular enzymes, nucleic material and components of their cell envelope, spore coats or viral capsids. It has been found that ozone is an excellent option for multiple uses, from sanitization treatment, to the medicinal use of pathogenic agents and also for water purification.

Keywords: Ozone; Microorganisms; Biofilm.

Resumen

El ozono (O₃) es una molécula alotrópica descubierta a mediados del siglo XIX. Tiene una estructura cíclica compuesta por tres átomos de oxígeno que normalmente está presente como gas. El uso del ozono en la práctica clínica fue introducido en el siglo pasado por algunos clínicos pioneros que desarrollaron un trabajo centrado principalmente en el área del ozono medicinal de aplicación local. Desde entonces, el uso terapéutico en medicina se ha extendido a muchas enfermedades. El objetivo de este estudio es revisar la acción del ozono sobre diversos microorganismos. Para llevar a

cabo este trabalho se realizou uma revisão bibliográfica em la que se utilizaron artículos que abordan temas sobre el ozono en diversos aspectos biológicos. El ozono inactiva los microorganismos al reaccionar con sus enzimas intracelulares, material nucleico y componentes de su envoltura celular, cubiertas de esporas o cápsides virales. Se ha comprobado que el ozono es una excelente opción para múltiples usos, desde el tratamiento de higienización, hasta el uso medicinal de agentes patógenos y también para la potabilización del agua.

Palabras clave: Ozono; Microorganismos; Biopelícula.

1. Introdução

O ozônio (O₃) é uma molécula que foi descoberta em meados do século XIX. Possui uma estrutura cíclica composta por três átomos de oxigênio que normalmente está presente como gás. O ozônio é relativamente instável devido à presença de estados mesoméricos em equilíbrio dinâmico. Na natureza, o ozônio é gerado durante tempestades devido às descargas elétricas dos raios que reagem com o oxigênio atmosférico para produzir ozônio. Além disso, o sistema imunológico também produz ozônio como agente antimicrobiano (Braidy et al., 2017 & Silva et al., 2011).

A primeira identificação do ozônio como um composto químico distinto foi feita em 1839, um pesquisador denotou que sujeitar a água à eletrólise produz um odor característico no eletrodo positivo descrito como "o odor de matéria elétrica". Na época, o estudioso propôs o nome ozônio, do grego ozein (odorante) para a nova substância. Foi considerado que o ozônio não só pode atuar como oxidante, mas também como um forte desinfetante. No final do século 19, vários relatórios mostraram que o ozônio era capaz de oxidar muitos compostos orgânicos e inativar contaminantes bacterianos no esgoto. Essas propriedades levaram ao uso do ozônio como uma alternativa à cloração da água. Em 1845, com o surgimento de novos estudos, foi sugerido que o ozônio é uma forma alotrópica de oxigênio. No século XX quando foi esclarecida sua estrutura molecular, estabelecendo o modelo angular agudo de ozônio (Braidy et al., 2017 & Mahmoud et al., 2007).

O uso do ozônio na prática clínica foi introduzido no século passado por alguns clínicos pioneiros que desenvolveram trabalhos focados principalmente na área de ozônio medicinal aplicada localmente. Dessa forma, durante a Primeira Guerra Mundial, foram tratadas com sucesso feridas gangrenadas, supuração de fraturas ósseas, inflamações e abscessos. Pesquisadores dessa época também foram os primeiros a usar ozônio por via intravenosa, expondo o sangue diretamente a uma mistura de oxigênio e ozônio. Na década de 50 foi desenvolvido o primeiro modelo confiável de gerador de ozônio medicinal, capaz de produzir uma mistura variável e estável de ozônio/oxigênio. Esta invenção é considerada o prelúdio para o procedimento de auto-hemoterapia ozonizada e serviu de base para a expansão da terapia de ozônio nos últimos 40 anos (Braidy et al., 2017 & Nesi., 2018).

Desde então, o uso terapêutico em medicina foi estendido a muitas doenças. O gás administrado em doses terapêuticas precisas é usado para desinfetar e tratar doenças devido à sua capacidade antimicrobiana, estimulação do metabolismo do oxigênio e ativação do sistema imunológico. Entretanto, o ozônio também tem o potencial de reagir e oxidar compostos orgânicos e, quando presente como poluente do ar, pode causar efeitos nocivos sobre o trato respiratório (Braidy et al., 2017; Oliveira & Lages., 2012).

Os microrganismos são seres invisíveis a olho nú, e estão diretamente relacionados com a vida humana, sendo favoráveis e apresentando inúmeros benefícios, porém também podem ser prejudiciais, e causadores de doenças (Albuquerque et al., 2012).

Nesse sentido, desde a década de 2000 foram surgindo inúmeros estudos investigando a ação esterilizante do ozônio em situações e episódios específicos. O objetivo deste estudo é revisar a ação do ozônio sobre variados microrganismos.

2. Metodologia

Para o cumprimento desse trabalho foi realizada uma revisão de literatura na qual foram utilizados artigos os quais abordam temas a respeito do ozônio em diversos aspectos biológicos, os quais são: Biofilmes de *Enterococcus faecalis*,

Microrganismos efluentes de águas residuais, Bactérias de efluentes sanitários, Norovírus humano, Vírus da Hepatite A e Norovírus Murino, Citotoxicidade da patulina após desintoxicação por Ozônio, Poliovírus, Biofilmes microbianos, *Listeria monocytogenes* e Vírus entéricos.

Os anos determinados para a pesquisa dos artigos foram de 2007 a 2022 sendo que as bases de dados utilizadas foram PubMed, Lilacs e Scielo. Para realizar a busca foram utilizadas as palavras chaves ozônio, microorganismos e biofilme, sendo que as buscas foram realizadas no idioma português e inglês.

Um total de 53 artigos foram encontrados, sendo que foram excluídas 16 publicações anteriores ao período estabelecido, 10 publicações foram excluídas por estarem duplicadas nas plataformas de pesquisa e 7 publicações foram excluídas por tratarem da interação do ozônio com a indústria alimentícia. Ao todo 20 artigos foram incluídos no estudo e estão discorridos a seguir.

3. Discussão

O ozônio inativa os microrganismos ao reagir com suas enzimas intracelulares, material nucleico e componentes de seu envelope celular, revestimentos de esporos ou capsídeos virais (Montenegro., 2021). A aplicação do ozônio para inativação de microrganismos é amplamente utilizada, sua eficácia é comprovada pelos trabalhos científicos descritos a seguir:

Biofilmes de *Enterococcus faecalis*

Em 2015, comparou-se os efeitos antibacterianos dos métodos de ozônio gasoso (O₃) e desinfecção fotoativada (PAD) contra biofilmes de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Os pesquisadores selecionaram 65 dentes pré-molares inferiores humanos com canais radiculares retos. Após a preparação do canal radicular, as amostras foram esterilizadas e colocadas em tubos eppendorf com 1 mL de caldo de infusão de coração cerebral contendo $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL de *E. faecalis*. As amostras contaminadas foram então divididas em quatro grupos (n = 15), de acordo com o método de desinfecção utilizado: Grupo 1, Solução Salina (controle positivo); Grupo 2, NaOCl (controle negativo); Grupo 3, O₃ gasoso; e Grupo 4, PAD. Três dentes não contaminados foram utilizados para administrar a infecção e processo de esterilização. As UFCs foram contadas e os dados analisados estatisticamente. Os pesquisadores denotaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle (P < 0,05). O grupo salino demonstrou o número superior de microrganismos remanescentes. A esterilização total foi alcançada no grupo NaOCl a 2,5%. Não existiu diferença estatística entre DAP e O₃ gasoso (P > 0,05), isto é, chegaram à conclusão de que o PAD e o O₃ gasoso têm um efeito antibacteriano importante nos canais radiculares infectados, mas, 2,5% de NaOCl sendo superior em termos de habilidades antimicrobianas em relação com os outros procedimentos de desinfecção (Tuncay et al., 2015).

Microrganismos efluentes de águas residuais

A radiação ionizante foi sugerida como um método alternativo aos processos de desinfecção, como cloro, UV e ozônio. Embora muitos estudos tenham demonstrado a eficácia da tecnologia de irradiação para a desinfecção microbiana, houve uma falta de informações sobre estudos de comparação de técnicas de desinfecção e um novo crescimento de cada tratamento. Neste estudo de 2015, uma radiação ionizante foi investigada para inativar microrganismos e determinar a dose crítica para prevenir o rebrota. Como resultado, os pesquisadores observaram que a eficiência da desinfecção por radiação ionizante não foi afetada pelas mudanças sazonais nas características das águas residuais, como temperatura e turbidez.

Quanto ao crescimento bacteriano após a desinfecção, a radiação ionizante mostrou uma resistência significativa ao crescimento, enquanto o tratamento UV no local é influenciado pelo sólido, temperatura ou precipitação em suspensão. A quantidade de consumo de energia elétrica também foi comparada para a viabilidade econômica de cada técnica em um

determinado valor de eficiência de desinfecção de 90%, mostrando 0,12, 36,80 e 96,53 Wh / (L/dia) para radiação ionizante, ozônio, e UV, respectivamente. A radiação ionizante requer duas ou três ordens de magnitude de consumo de energia menor que o UV e o ozônio. Conseqüentemente, a radiação ionizante pode ser aplicada como uma técnica alternativa econômica e eficaz para outros processos de desinfecção convencionais (Lee et al., 2015).

Bactérias de efluentes sanitários

Em 2015 estudou-se o processo sequencial de ozônio e cloro com relação à inativação de bactérias indicadoras e a formação de subprodutos da desinfecção do ozônio em efluentes sanitários. As doses escolhidas para aplicação de ozônio foram de 5, 8 e 10 mgO₃.L⁻¹, com a sequência de doses de cloro de 10, 20 e 30 mgL⁻¹, respectivamente. No fim desse processo sequencial de ozônio/cloro, a redução média na demanda química de oxigênio variou de 9 a 37%. A inativação total do coliforme variou de 1,59 a 3,73, e a E. coli sempre foi <1 UFC 100 mL. O resultado da ozonização na formação de aldeídos foi que, os mesmos não foram afetados pela dose subsequente de cloro (Ribeiro da Silva et al., 2015).

Norovírus humano

Brotos de alfafa foram associados a inúmeros surtos patológicos de origem alimentar. Alguns estudos prévios na literatura investigaram a eficácia do ozônio aquoso em sementes contaminadas por bactérias, mas pouco se sabe sobre a resposta do norovírus humano (huNoV). Em 2015, avaliou o ozônio aquoso para a desinfecção de sementes de alfafa contaminadas com huNoV e seus substitutos. Investigou-se também a inativação de vírus sem matriz alimentar. As sementes em questão, foram inoculadas com o genogrupo huNoV II, o vírus Tulane (TV) e o norovírus murino (MNV); os vírus isolados ou inoculados nas sementes foram tratados em água desionizada contendo 6,25 ppm de ozônio aquoso com agitação a 22°C por 0,5, 1, 5, 15 ou 30 min. Os dados encontrados pelos pesquisadores mostraram que o ozônio aquoso resultou em reduções da infectividade com MNV e TV de 1,66-1,15 a 5,601,11 log PFU/g de sementes; para todos os tempos de tratamento, observou-se reduções significativamente maiores no MNV (P, 0,05). Os genomas virais foram relativamente resistentes, com uma redução de 1,50 ± 0,14 para 3,00 ± 0,14 log de cópias genômicas/g de sementes; a redução da TV inoculada na água foi semelhante à do huNoV, enquanto o MNV teve reduções significativamente maiores nas cópias genômicas (P< 0,05).

Resultados semelhantes foram observados apenas nos vírus tratados com ozônio, com níveis mais altos de inativação (P< 0,05), especialmente com níveis reduzidos de infectividade para MNV e TV. A inativação significativa pelo ozônio aquoso indica que o ozônio pode ser uma alternativa para a substituição do cloro como um tratamento alternativo para as sementes. O comportamento da TV foi semelhante ao do huNoV, o que o torna um substituto promissor para esses tipos de cenários (Wang; et al., 2015).

Vírus da Hepatite A e Norovírus Murino

Framboesas são produtos sensíveis e vulneráveis para os quais as soluções de tratamento industrial que garantem a segurança alimentar e a qualidade sensorial não são facilmente administradas. As framboesas têm sido associadas a numerosos casos de doenças de origem alimentar nas últimas décadas. A ozonização tem se mostrado eficaz como tratamento de água potável contra microrganismos patogênicos. Em 2018 realizou-se uma comparação do efeito do ozônio gasoso no norovírus murino (MNV-1) e no vírus da hepatite A (HAV) adsorvido em framboesas frescas. O MNV-1 infeccioso foi altamente inativado pela ozonização.

A matriz de framboesa parece aumentar a inativação pelo ozônio em comparação à água. Os autores observaram que o mesmo tratamento tem pouco efeito no HAV, mesmo para a dose mais alta nas condições estudadas. O tratamento com ozônio

não afetou a aparência das framboesas, mesmo após três dias após a ozonização. Nenhum efeito de ozônio e derivados foi observado nos genomas detectados em ambos os vírus testados, independentemente da matriz ou das doses testadas utilizadas. Sendo assim, o ozônio gasoso pode ser um bom candidato à inativação do norovírus humano em framboesas, mas são necessárias novas condições para que ele tenha efeitos significativos na inativação do HAV (Brié et al., 2018).

Citotoxicidade da patulina após desintoxicação por Ozônio

A patulina frequentemente contamina frutas e produtos à base de frutas, o que ameaça seriamente a saúde dos consumidores. Um experimento também de 2018, usou o ozônio para degradar a patulina em solução aquosa e investigou a citotoxicidade da patulina após a desintoxicação do ozônio em células de carcinoma hepático humano (HepG2) usando o teste de apoptose. A patulina foi rapidamente degradada de 24,59 mg/L para 9,85 mg/L em 180 segundos por 10,60 mg/L de ozônio a uma taxa de fluxo de 90 mL/min e reduzida em 59,94%. A metade da concentração inibitória máxima (IC50) de patulina nas células HepG2 foi de 9,32 µmol/L após 24 h de exposição e mostrou um efeito dependente da dose. Após 90 segundos de desintoxicação do ozônio, a viabilidade celular das células HepG2 aumentou de 42,31% para 93,96%, e o total de células apoptóticas reduziu significativamente de 22,24% para 11,18% após 180 segundos de tratamento com ozônio. Os autores mostraram claramente o grande potencial do ozônio na degradação da patulina em alimentos líquidos (Diao et al., 2018).

Poliovírus

Em 2019 investigou-se os mecanismos subjacentes à inativação induzida por ozônio do poliovírus tipo 1 (PV1). No experimento, foram utilizados ensaios de cultura de células, RT-PCR de longa sobreposição e hibridação pontual para observar e localizar com precisão os locais de ação do ozônio que causam inativação do PV1, utilizaram também modelos de infecção por RNA do genoma viral recombinante. Os autores indicaram que o ozônio inativou o PV1 principalmente interrompendo a região 5' não codificante (5'-NCR) do genoma do PV1. Um estudo mais aprofundado revelou que o ozônio danificou especificamente o 80-124 região nucleotídica (nt) no 5'-NCR. Os modelos de infecção por RNA do genoma viral recombinante confirmaram que o PV1 sem essa região não é infeccioso. Neste estudo, não apenas elucidaram os mecanismos pelos quais o ozônio induz a inativação do PV1, mas também foi determinado que a região de 80-124 nt no 5'-NCR é direcionada pelo ozônio para atingir essa inativação (Ji et al., 2019).

Biofilmes microbianos

Uma pesquisa do ano de 2018 investigou a eficácia de tratamentos com ozônio na água e ozônio gasoso contra células ligadas e biofilmes microbianos de três espécies de origem alimentar, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Biofilmes formados em cupons de aço inoxidável (AISI 304) a partir de uma mistura de três linhagens (uma referência e duas linhagens silvestres) de cada espécie microbiana foram submetidos a três tipos de tratamento por tempos crescentes: (i) água ozonizada (0,5 ppm) por imersão em estática (ii) água ozonizada sob condições de fluxo e (iii) ozônio gasoso em diferentes concentrações (0,1–20 ppm). Independentemente do tratamento, o efeito antimicrobiano ocorreu nos primeiros minutos de tratamento, enquanto, aumentando o tempo de contato, provavelmente a população residual de biofilme adquiriu maior resistência à ozonização.

O tratamento com ozônio aquoso em condições estáticas resultou em uma redução de viabilidade após 20 min, enquanto os valores de redução foram maiores para biofilmes tratados em condições dinâmicas. *S. aureus* foi a espécie mais sensível ao ozônio aquoso em condições dinâmicas. Com relação ao uso de ozônio gasoso, em baixas concentrações (até 0,2 ppm), inativações estimadas foram obtidas após 60 minutos, enquanto nas concentrações mais altas uma inativação completa dos

biofilmes de *L. monocytogenes* e a redução de 5 de *P. fluorescens* e *S. aureus*, respectivamente, após 60 e 20 min. Considerando os resultados, o ozônio em forma de água pode ser usado em protocolos diários de saneamento no final do dia ou durante o tempo de inatividade do processo, enquanto o ozônio gasoso pode ser usado no tratamento de espaços confinados por períodos mais longos (por exemplo, durante a noite) e na ausência de pessoal, para permitir um controle ecológico dos biofilmes microbianos e, conseqüentemente, reduzir o risco de contaminação cruzada na alimentícia (Marino et al., 2018).

Listeria monocytogenes

Em 2018 avaliou-se a eficácia do uso de ozônio do ar forçado sequencial seguido de um processo de processo oxidativo avançado (AOP) para desativar a *Listeria monocytogenes* nas maçãs Empire e dentro delas. O tratamento de ozônio no ar forçado consistiu em um reator que introduziu o ozônio (6 g/h) em uma corrente de ar que fluía através de um canteiro de maçãs (cerca de 30 cm de profundidade). Antes do tratamento, as maçãs eram condicionadas a 48 ° C para garantir a formação de condensado antes de serem transferidas para o reator. O condensado garantiu umidade relativa suficiente para aumentar a ação antimicrobiana do ozônio.

O ar foi passado através do canteiro a 9,3 m/s e o ozônio foi introduzido após 10 minutos. A concentração de ozônio medida após sair do canteiro de maçãs atingiu um estado estacionário de 23 ppm. O tratamento de ozonização de 20 minutos suportou uma redução de *L. monocytogenes*, sem efeito significativo da posição da maçã no leito. O método baseado em AOP foi um processo contínuo em que o peróxido de hidrogênio foi introduzido como vapor em um reator iluminado por UV-C e lâmpadas emissoras de ozônio que coletivamente geravam radicais hidroxila.

Operar o reator AOP com luz UV-C, 6% de peróxido de hidrogênio, 2 g/h de ozônio e uma temperatura da câmara de 48°C resultou em uma redução de *L. monocytogenes* na superfície das maçãs e internamente dentro do tecido cicatricial. A aplicação de um revestimento de caramelo, a partir de uma solução derretida (a 80°C), resultou em uma redução de *L. monocytogenes* na superfície da maçã. Em maçãs tratadas com o processo sequencial, *L. monocytogenes* só pôde ser recuperada esporadicamente por enriquecimento e não sofreu crescimento quando as maçãs caramelo foram armazenadas a 22°C por 19 dias. No entanto, o crescimento de *L. monocytogenes* dentro do núcleo, mas não na superfície, foi observado em maçãs carameladas preparadas a partir de frutos controle não tratados (Murray et al., 2018).

Vírus entéricos

A ozonização da água é uma maneira eficaz de desinfetar este líquido de todos os tipos de patógenos. Porém, dados cinéticos precisos e quantitativos sobre a inativação de vírus pelo ozônio são escassos, isso se dá, devido aos desafios experimentais associados à alta reatividade do ozônio aos vírus. Neste estudo de 2018, foi estabelecido um sistema experimental de lotes que permite personalizar e quantificar exposições muito baixas ao ozônio e medir simultaneamente a inativação de um vírus. Constantes de taxa de inativação de ozônio de segunda ordem (vírus kO₃) de cinco vírus entéricos (laboratório e duas cepas ambientais do *coxsackievirus*, adenovírus humano e quatro bacteriófagos foram medidos em soluções tamponadas. A suscetibilidade dos vírus selecionados ao ozônio diminuiu. Com base nas medições do vírus KO₃ e nas exposições típicas ao ozônio aplicadas no tratamento de água e efluentes, os autores concluíram que o ozônio é um desinfetante altamente eficaz para o controle de vírus (Wolf et al., 2018).

4. Considerações Finais

O presente estudo de revisão demonstrou a eficácia na inativação de diferentes tipos de microrganismos sendo eles: Biofilmes de *Enterococcus faecalis*, Microrganismos efluentes de águas residuais, Bactérias de efluentes sanitários, Norovírus

humano, Vírus da Hepatite A e Norovírus Murino, Citotoxicidade da patulina após desintoxicação por Ozônio, Poliovírus, Biofilmes microbianos, *Listeria monocytogenes*, Bactérias multirresistentes e Vírus entéricos, com diferentes técnicas de aplicação do agente desinfetante. Foi constatado que o ozônio é uma excelente opção para múltiplos usos, desde o tratamento de sanitização, quanto para uso medicinal de agentes patogênicos e também de purificação da água.

O estudo cumpriu com seus objetivos, porém salienta-se a necessidade de mais estudos sobre padronização das técnicas, materiais e aplicação de ozônio.

Referências

- Albuquerque, G. G., da Silva Braga, R. P., & Gomes, V. (2012). Conhecimento dos alunos sobre microrganismos e seu uso no cotidiano. *Revista de Educação, Ciências e Matemática*, 2(1).
- Braidy, N., et al. Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: Focus on diabetes and spinal pain. *Journal of cellular physiology*, 233(4), 2705-2714, 2018.
- Brié, A., et al. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. *Food microbiology*, v. 70, p. 1-6, 2018.
- Diao, E., et al. Ozone detoxification of patulin in aqueous solution and cytotoxic evaluation using human hepatic carcinoma cells. *Toxicol*, v. 155, p. 21-26, 2018.
- Fall, C., et al. Sludge reduction by ozone: Insights and modeling of the dose-response effects. *Journal of environmental management*, v. 206, p. 103-112, 2018.
- Ji, J. H., et al. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. *Biomedical and Environmental Sciences*, 32(5), 324-333, 2019.
- Lee, O.-Mi., et al. A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process. *Journal of hazardous materials*, v. 295, p. 201-208, 2015.
- Mahmoud, A., & Freire, R. S. (2007). Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. *Química Nova*, 30, 198-205.
- Marino, M., et al. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2024, 2018.
- Montenegro, J. L. P. S. (2021). O uso e aplicação do ozônio em atividade residenciais: uma revisão de literatura. *Repositorio.ifpb.edu.br/handle/177683/1869*
- Murray, K., et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on and within apples destined for caramel apple production by using sequential forced air ozone gas followed by a continuous advanced oxidative process treatment. *Journal of food protection*, 81(3), 357-364, 2018.
- Nesi, A. K. (2018). Ozonioterapia: o uso do ozônio na odontologia. *Trabalho de conclusão de curso (TCC) na odontologia*.
- Oliveira Junior, J. O. D., & Lages, G. V. (2012). Ozonioterapia em lombociatalgia. *Revista Dor*, 13, 261-270.
- Pilatti, C. M., Franzes, D. B., Rangel, D. E. N., Loth, E. A., Genske, R. D., Cecatto, V., & Pessoa, R. S. (2022). Efeitos da ozonioterapia em modelo experimental murino de vulvovaginite por *Candida albicans*. *Research, Society and Development*, 11(5), e45511528354. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28354>
- Ribeiro da Silva, G. H., et al. UASB reactor effluent disinfection by ozone and chlorine. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(12), 1215-1222, 2015.
- Silva, S. B., de Mello Luvielmo, M., Geyer, M. C., & Prá, I. (2011). Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, 32(2), 659-68
- Tormin, S. C., Navarrini, A., de Almeida, J. O. C. F., Travassos, L. H. R., de Godoy Negri, M. V., & Silva, R. A. (2016). Análise do efeito bactericida do ozônio sobre bactérias multirresistentes/Analysis of bactericidal effect of ozone on multi-resistant bacteria. *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, 138-141.
- Tuncay, Ö., et al. Effect of gaseous ozone and light-activated disinfection on the surface hardness of resin-based root canal sealers. *Scanning*, 38(2), 141-147, 2016.
- Wang, Q., Markland, S., & Kniel, K. E. Inactivation of human norovirus and its surrogates on alfalfa seeds by aqueous ozone. *Journal of food protection*, 78(8), 1586-1591, 2015.
- Wolf, C., Von Gunten, U., & Kohn, T. Kinetics of inactivation of waterborne enteric viruses by ozone. *Environmental science & technology*, 52(4), 2170-2177, 2018.