

Artigo Original

EFEITO MICROBICIDA DO OZÔNIO GASOSO EM PSEUDOMONAS AERUGINOSA, STAPHYLOCOCCUS AUREUS E CANDIDA ALBICANS

(MICROBICIDE EFFECT OF GASEOUS OZONE ON PSEUDOMONAS AERUGINOSA, STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND CANDIDA ALBICANS)

Autores: Cláudia Wollheim¹; Edilaine da Silva Gonçalves¹; Kallianne Cristina Lopes²; Armando Bega^{3,A}¹Universidade de Caxias do Sul – Caxias do Sul – Rio Grande do Sul - Brasil²Universidade Anhembi Morumbi- São Paulo – Brasil.³Coordenador do Curso de Podologia da Universidade Anhembi Morumbi – São Paulo – Brasil.

Informações do artigo

Palavras chave:*Pseudomonas aeruginosa*,
Staphylococcus aureus,
Candida albicans,
ozônio, *in vitro*.**Resumo**

Objetivo: Avaliar o efeito microbicida do ozônio gasoso em diferentes concentrações e tempos perante aos micro-organismos patogênicos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* cultivadas em placas de Petri. **Material e Métodos:** O efeito do gás de ozônio perante cepas padronizadas das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e da levedura *Candida albicans* ATCC 10231 foi testado em seis concentrações diferentes utilizando um gerador de ozônio. Grupo 1: sem tratamento; grupos experimentais com tratamento: de ozônio: Grupo 2: 60 µg/ml a 10 minutos, Grupo 3: 40 µg/ml a 10 minutos, Grupo 4: 30 µg/ml a 10 minutos, Grupo 5: 20 µg/ml a 5 minutos e Grupo 6: 15 µg/ml a 5 minutos, Os micro-organismos foram inoculados em placas de Petri com ágar sangue e em seguida receberam o gás de ozônio. **Resultados:** O gás de ozônio mostrou atividade antimicrobiana na maioria das concentrações utilizadas. **Conclusão:** O gás de ozônio mostrou uma atividade antimicrobiana valiosa contra os microorganismos testados. Uma aplicação tópica única por nebulização de cada concentração utilizada de ozônio inibiu o crescimento da maioria das estirpes de bactérias potencialmente patogênicas com resistência conhecida a agentes antimicrobianos.

^Autor correspondente

Armando Bega – E-mail: armando.bega@gmail.com – ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9820-3943>

DOI: <https://doi.org/10.36271/iajp.v2i1.22> - Artigorecebido em: 16 de fevereiro de 2020; aceito em 29 de fevereiro de 2020; publicado em 20 de março de 2020. Revista Ibero-Americana de Podologia, Vol.2, N.1, março 2020. Disponível online a partir de 20 de março de 2020. ISSN 2674-8215. <http://journal.iajp.com.br> - Todos os autores contribuíram igualmente com o artigo. Este é um artigo de acesso aberto sob a licença CC - BY: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

Article ID

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa,
Staphylococcus aureus,
Candida albicans,
 ozone, *in vitro*.

Abstract

Objective: To evaluate the microbicidal effect of ozone gas at different concentrations and times before pathogenic microorganisms: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* grown in Petri dishes. **Material and Methods:** The effect of ozone gas against standardized strains of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and the yeast *Candida albicans* ATCC 10231 was tested in six different concentrations using an ozone generator. Group 1: without treatment; experimental groups with treatment: ozone: Group 2: 60 µg / ml at 10 minutes, Group 3: 40 µg / ml at 10 minutes, Group 4: 30 µg / ml at 10 minutes, Group 5: 20 µg / ml at 5 minutes and Group 6: 15 µg / ml at 5 minutes. The microorganisms were inoculated into Petri dishes with blood agar and then received the ozone gas. **Results:** Ozone gas showed antimicrobial activity in most of the concentrations used. **Conclusion:** Ozone gas showed a valuable antimicrobial activity against the microorganisms tested. A single topical spray application of each used ozone concentration inhibited the growth of most strains of potentially pathogenic bacteria with known resistance to antimicrobial agents.

Introdução

O ozônio é um oxidante poderoso, permitindo oxidar compostos orgânicos e inorgânicos e não é fonte de poluição, promove alto nível de desinfecção, possui atividade microbicida potente, sendo bactérias esporos e vírus sensíveis ao seu efeito com apenas alguns minutos de exposição, isso devido ao poder de ataque direto aos micro-organismos com a oxidação do material biológico. Aplicado principalmente como desinfetante de água potável e residual. O ozônio é um alótropo de oxigênio, um gás instável que se decompõe após aproximadamente 20 (vinte) minutos. Possui efeito sobre o metabolismo e tecidos ativando a resposta imune do corpo e destruindo bactérias. A terapia com ozônio é utilizada para tratar feridas infectadas, úlceras, queimaduras, ulcerações, inflamações na pele entre outros.

O uso excessivo de antibióticos no tratamento de infecções induz o aparecimento de bactérias multi resistentes. O ozônio não contamina o ambiente e não contribui para resistência bacteriana.

Muitas alternativas para o tratamento feridas crônicas infectadas são citadas na literatura. A aplicação tópica de antibióticos tem demonstrado eficácia limitada no tratamento de feridas infectadas, sem resultados conclusivos. Vários estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* tem se apresentado nos

últimos anos, afim de investigar o efeito bactericida da aplicação tópica de ozônio em diferentes situações, incluindo a administração em feridas infectadas. Tem sido relatado a utilização de O₃ como agente bactericida sob várias formas, tais como solução salina ozonizada, a água ozonizada, óleo ozonizado, o ozônio é associado com outras substâncias, e com maior frequência a mistura O₃ / O₂ gasoso. A utilização tópica de O₃ também tem sido relatada para a descontaminação ambiente em diversas situações: na agricultura para a descontaminação de alimentos, em odontologia, e em ambientes clínicos tal como no tratamento de feridas infectadas. Ozônio gasoso também foi potencialmente considerado para a desinfecção do ambiente hospitalar, que pode ser uma fonte de microrganismos para pacientes. Entretanto, uma mínima dose antibacteriana eficaz de ozônio gasoso durante aplicação tópica não foi claramente determinada. O objetivo deste estudo foi determinar qual concentração de O₃, de uma mistura gasosa de O₃ / O₂, aplicado a placas de Petri uma única vez, contendo cultura bacteriana elimina completamente o crescimento de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Material e Método

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório

de Microbiologia Clínica - LMC da Universidade de Caxias do Sul – UCS. Duas cepas bacterianas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e uma cepa de levedura (*Candida albicans* ATCC 10231) foram submetidas *in vitro* a diferentes concentrações e tempos de gás de ozônio utilizando um ozonizador adaptado (ver **Figura 1.**)

Figura 1. Ozonizador adaptado para o estudo.



Fonte LMC-UCS

O gás ozônio foi produzido a partir oxigênio medicinal (oxigênio líquido com um grau de pureza de 98%). O produto final foi uma mistura gasosa de O_3/O_2 , em que a concentração foi regulada por variação de fluxo de oxigênio e a tensão aplicada aos eletrodos.

As cepas microbianas foram cultivadas aerobicamente em ágar sangue a $35\pm 2^\circ C$ por 18 a 24h e após foram preparados inóculos utilizando suspensões de colônias diretas em solução salina estéril numa concentração padrão de turbidez de 0,5 da McFarland (1 a 2×10^8 UFC/mL). Cada suspensão foi diluída a 1:1000 em solução salina estéril, contendo cerca de 10^5 UFC/mL. Uma alíquota de $10\mu L$ desta suspensão foi inoculada em outra placa de ágar sangue, numa concentração final de 10^3 UFC/mL, e espalhada com um alça de Drigalski, conforme metodologia modificada de Fontes et al (2012).

Seis grupos de experimento foram realizados em triplicata: o grupo controle (Grupo 1) sem tratamento, o e os grupos experimentais com tratamento: (Grupo 2) concentração de O_3/O_2 60 $\mu g/ml$ a 10 minutos,

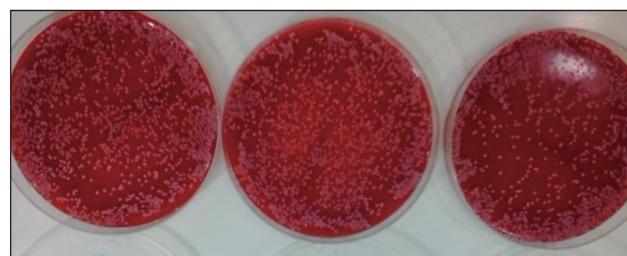
(Grupo 3) concentração de O_3/O_2 40 $\mu g/ml$ a 10 minutos, (Grupo 4) concentração de O_3/O_2 30 $\mu g/ml$ a 10 minutos, (Grupo 5) concentração de O_3/O_2 20 $\mu g/ml$ a 5 minutos, (Grupo 6) concentração de O_3/O_2 15 $\mu g/ml$ a 5 minutos. A cepa de *C. albicans* foi testada somente no Grupo 1.

Após a aplicação do gás de ozônio, as placas foram cultivadas aerobicamente a $35\pm 2^\circ C$ por 18 a 24h e submetidas a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em equipamento de contador de colônias.

Resultados

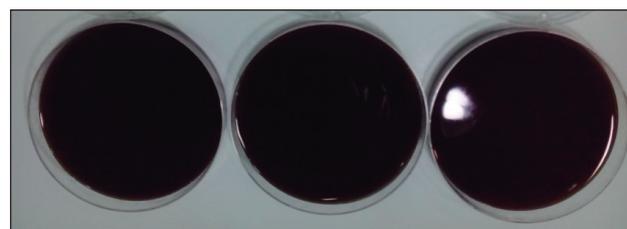
Os testes com a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* demonstraram que doses ≥ 30 $\mu g/ml$ de O_3/O_2 durante 10 minutos impediram totalmente o crescimento destas cepas bacterianas. Para a levedura *Candida albicans* quando submetida a concentração de O_3/O_2 60 $\mu g/ml$ durante 10 minutos também não observado crescimento após a incubação.

Figura 2. Grupo Controle *Staphylococcus aureus* – Observa-se crescimento de Unidades Formadoras de Colônia -UFC.



Fonte LMC-UCS

Figura 3. Grupo com tratamento (60 $\mu g/ml$ durante 10 minutos) *Staphylococcus aureus* O3 – Não se observa Unidades Formadoras de Colônia - UFC.



Fonte LMC-UCS

Para as cepas bacterianas, entretanto, na aplicação

de O₃/O₂ a 20 µg/ml por 10 e 5 minutos e a numa concentração de 15 µg/ml por 5 minutos, foi observado crescimento de colônias de *Pseudomonas aeruginosa*

e *Staphylococcus aureus* após 24h de incubação (ver **Tabela1**).

Tabela1. Resultados obtidos com três cepas microbianas sob ação de diferentes concentrações e tempos.

Cepas microbianas	*UFC/placa						
	Grupo Controle	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
		O ₃ /O ₂ 60 µg/ mL (10 min)	O ₃ /O ₂ 40 µg/ mL (10 min)	O ₃ /O ₂ 30 µg/ mL (10 min)	O ₃ /O ₂ 20 µg/ mL (10 min)	O ₃ /O ₂ 20 µg/ mL (5 min)	O ₃ /O ₂ 15 µg/ mL (5 min)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	548	0	0	0	**	557	630
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1806	0	0	0	2129	1897	2085
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1250	0	NR	NR	NR	NR	NR

*Unidade Formadora de Colônia - ** Foi observado crescimento em experimento isolado. NR: não realizado.

Discussão

Os três micro-organismos patogênicos utilizados neste estudo foram selecionados por apresentarem-se comumente como agentes de piodermites e infecções de ferida tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes hospitalizados, inclusive apresentando com fenótipo de multirresistência.

Segundo a Declaração de Madri (2015), para o uso de ozônio em bolsa, de acordo com o estágio e evolução da lesão são recomendadas as concentrações de ozônio de 60, 40, 30 e 20 µg/ml e de 60 e 70 µg/ml apenas em infecções purulentas por 20 a 30 minutos. Os nossos resultados mostraram que a aplicação de uma dose única de O₃/O₂ de 30 µg/ml por 10 minutos de ozônio gasoso impediu totalmente o crescimento *in vitro* das cepas bacterianas analisadas.

Ao entrar em contato com a célula, o O₃ promove uma combinação bioquímica gerada por oxidação, que permite o aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana desencadeando

a coagulação do citoplasma das bactérias (desnaturação). (ZHANG, 2011).

Experimentos *in vitro*, realizados por Fontes et. el (2012) mostraram que uma dose de 20 µg/ml em uma única aplicação tópica por nebulização durante 5 minutos efetivamente inibiu o crescimento de todas as cepas bacterianas patogênicas, tais como, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e de *Staphylococcus aureus*.

Contudo, estudos *in vitro* apresentam limitações, considerando que as cepas bacteriana são semeadas superficialmente sobre o meios de cultura e na prática clínica outros fatores tais como, fluxo sanguíneo variável, isquemia e tecido necrótico com altas concentrações bacterianas podem influenciar na ação do gás de ozônio, especialmente considerando lesões em pacientes diabéticos.

Conclusão

No presente estudo as concentrações de ozônio

de 30, 40 e 60 µg/ml por 10 minutos impediram o crescimento *in vitro* das cepas microbianas patogênicas, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* testadas. Na concentração de 20 µg/ml por 10 e 5 minutos houve crescimento de colônias, bem como na concentração de 15 µg/ml por 5 minutos.

Referências

JUNIOR J. O. O., Lages G. V. **Ozonioterapia em lombociatalgia**. *Rev Dor*. São Paulo, 2012 jul-set;13(3):261-70.

ANDREULA C. **Ozone therapy**. *Neuroradiology*. 53 (Suppl 1): S207–S209 - DOI 10.1007/s00234-011-0930-7

SOUSA C. S., Torres L. M., Azevedo M. P. F., Camargo T. C., Graziano K. U., Lacerda R. A., Turrini R. N. T. **Ozônio na esterilização de produtos para assistência à saúde: revisão integrativa da literatura**. *Rev Esc Enferm USP* 2011; 45(5):1243-9.

SCHAECHTER M., At al, **Microbiologia – Mecanismos das Doenças Infeciosas**. Editora Guanabara, 2002 , 3º ed.

ZAIT, Clarisse, at al – **Micologia Médica**. Editoria MEDISI, 1998, Rio de Janeiro

SIDRIM J. J.C, Rocha M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Editora Guaabara, 2004.

LEVINSON W., **Microbiologia Médica e Imunologia**. Editora Artmed, 2010, 10º ed, Porto Alegre- RS

ABOZ, **Ozonioterapia – Relatório Técnico**. 2014/2013, São Paulo

Declaração de Madri. **Ozonioterapia. 2ª ed. , 2015, Madrid (Espanha)**

FONTES at Al. **Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria**. *Bio Med Central*. 2012.

ZHANG at al. **Effect of ozone on membrane permeability and ultrastructure in Pseudomonas aeruginosa**. *Jornal of Applied Microbiology*, 2011.