

# Análise do efeito bactericida do ozônio sobre bactérias multirresistentes

Analysis of bactericidal effect of ozone on multi-resistant bacteria

Stephanie Corradini Tormin<sup>1</sup>, Alessandra Navarini<sup>2</sup>, José Otavio Cavani Ferraz de Almeida<sup>1</sup>, Luiz Henrique Ramos Travassos<sup>1</sup>, Marcus Vinícius de Godoy Negri<sup>1</sup>, Rodrigo Altenfelder Silva<sup>3</sup>

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o poder bactericida do ozônio gasoso sobre as bactérias multirresistentes: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina e *Pseudomonas aeruginosa*. **Método:** Em suspensões de *Pseudomonas aeruginosa* (Cepa Multirresistente), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 MRSA), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299 VRE) e *Acinetobacter baumannii* (Cepa Multirresistente) contendo 10<sup>8</sup> UFC/ml de bactérias na escala de 0,5 McFarland e 500 ml de água estéril bidestilada gelada realizamos infusões de ozônio gasoso nas concentrações de 10 µg/ml, 4 µg/ml e 3 µg/ml, durante 2 e 4 minutos. Uma amostra de 1 ml da solução foi colhida e acondicionada em frascos de Hemobac trifásico. Os frascos foram incubados em estufa à 36°C por 7 dias e feito leitura das colônias a cada 24 horas de incubação no período de 7 dias. **Resultados:** Foi possível observar que após infusão por 4 minutos de ozônio gasoso na concentração de 10 µg/ml não houve crescimento bacteriano nas leituras de 48hs e após 7 dias. Já nas concentrações de 4 µg/ml e 3 µg/ml, observamos crescimento bacteriano, embora em menores concentrações, mostrando ação bactericida parcial. **Conclusão:** O ozônio tem efeito bactericida sobre

bactérias multirresistentes, sendo este efeito proporcional à concentração e ao tempo de exposição.

**Descritores:** Antibacterianos, Farmacorresistência bacteriana múltipla, Ozônio, Infecção hospitalar/microbiologia, Infecção hospitalar/prevenção & controle

## Abstract

**Objective:** To assess the bactericidal effect of ozone gas on the following multi-resistant bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Method:** Suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* (multi-resistant strain), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 MRSA), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299 VRE) and *Acinetobacter baumannii* (multi-resistant strain) were inoculated with 10<sup>8</sup> UFC/mL of bacteria at 0.5 on the McFarland scale in different flasks containing 500 mL of ice-cold double-distilled sterile water. After preparation of the broths, ozone gas was infused at concentrations of 10 µg/mL, 4 µg/mL and 3 µg/mL for 2 and 4 minutes. A 1 ml sample of the solution was collected and stored in Hemobac triphasic flasks. The flasks were incubated in a chamber at 36°C for 7 days and colonies read every 24 hours of incubation over the 7-day period. **Results:** After bubbling the bacteria broths with ozone gas at a concentration of 10 µg/mL for 4 minutes, no bacterial growth was observed on readings at 48hs and after 7 days. However, at a concentration 4 µg/ml and 3 µg/ml, occurred partial bactericidal action. **Conclusion:** Ozone had a bactericidal effect on the multi-resistant bacteria that was dependent on gas concentration and exposure time.

**Keywords:** Anti-bacterial agents; Drug resistance, multiple, bacterial, Ozone; Cross infection/microbiology; Cross infection/ Prevention & control; Cross infection/ Microbiology

## Introdução

A incidência de infecção hospitalar varia de 5% a 15% nos doentes em unidades gerais de internação e de

1. Acadêmico da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – 5º Ano do Curso de Graduação em Medicina

2. Professora Assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Departamento de Ciências Patológicas

3. Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Departamento de Cirurgia

**Trabalho realizado:** Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo Departamento de Cirurgia e Departamento de Ciências Patológicas - Laboratório da Disciplina de Microbiologia / Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo - Centro de Pesquisa Unidade de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental  
**Endereço para correspondência:** Rodrigo Altenfelder Silva. Rua Teodoro Sampaio - 1424 - 181B - Pinheiros - 05406100 - São Paulo - SP - Brasil. Telefone: (+5511) 38153760/ (+5511) 21767271. Fax: (+5511) 21767271. E-mail: cir.pancreas@santacasasp.org.br; roaltenfelder@terra.com.br

**Conflito de interesse:** Não há.

9% a 37% em unidades de terapia intensiva<sup>(1)</sup>. Estudos recentes na Europa mostraram que anualmente cerca de 4 milhões de pacientes são comprometidos por infecção associada à transmissão por profissionais da saúde, com taxa de mortalidade de 1% (40.000 mortes/ano), com um gasto anual de 10 bilhões de dólares<sup>(1)</sup>. Nos Estados Unidos, em 2011, houve 75.000 mortes, com gasto adicional de 9,8 bilhões de dólares<sup>(1,2)</sup>.

Desde o final do século passado, têm merecido destaque as infecções por bactérias multirresistentes que, além de alterar a morbimortalidade das doenças e determinar resistência aos antibióticos, levam a aumentos expressivos dos custos hospitalares<sup>(3,4)</sup>.

A resistência aos antimicrobianos está relacionada ao uso indiscriminado desses medicamentos. Já em 1929, Fleming, ao descobrir a penicilina, foi o primeiro observador da resistência natural de microrganismos aos antibióticos<sup>(5)</sup>. Em 1944, após a difusão do uso clínico da penicilina, foram encontrados exemplares de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina devido à produção de penicilinase, como observado por Tavares<sup>(5)</sup>. Com o tempo, a resistência foi se ampliando para a meticilina, oxacilina, cefalosporinas, imipenem e aos aminoglicosídeos, sendo a mais comumente encontrada a *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), que decorre da presença do gene *mecA*<sup>(6-8)</sup>.

Os diferentes ambientes hospitalares se tornaram locais de maior incidência desses microrganismos, destacando-se a *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria considerada nosocomial e que facilmente desenvolve resistência a antimicrobianos (como antibióticos e desinfetantes)<sup>(9,10)</sup>. O *Acinetobacter baumannii*, que pela produção de metalo-beta-lactamases (MBL), torna-se resistente a várias drogas antimicrobianas<sup>(11)</sup> e o Enterococos um importante agente etiológico de infecção em doentes imunodeprimidos<sup>(12)</sup>.

O gás ozônio é um dos componentes da atmosfera e se apresenta em diferentes concentrações, dependendo da altitude em que se encontra. Isso é essencial, uma vez que na troposfera, havendo aumento da concentração de ozônio, há prejuízo aos seres vivos; por outro lado, sua concentração na estratosfera nos protege dos raios ultravioleta<sup>(13)</sup>.

Sabe-se que este gás atua como importante e potente agente oxidante<sup>(14)</sup>. Oxidando materiais biológicos, o ozônio tem poder bactericida mais rápido que o cloro<sup>(15)</sup>. Embora os mecanismos envolvidos não estejam totalmente esclarecidos, o ozônio provoca a lise das membranas celulares por meio de oxidação, com consequente morte celular<sup>(13-15)</sup>. Já foi demonstrado que bastam poucos minutos de exposição ao gás para que fungos (e seus esporos), bactérias e vírus sejam inativados<sup>(13-17)</sup>. Por sua capacidade oxidante, estima-se que o ozônio detenha o poder da antissepsia.

Na medicina, o ozônio já foi utilizado em diferen-

tes formas de aplicação (parenteral ou local), visando combater isquemias, doenças articulares, imunodepressão, doenças degenerativas e infecções<sup>(13)</sup>. No entanto, em concentrações elevadas ele se torna tóxico<sup>(15)</sup>. Se usado de modo correto e de forma controlada, podem-se obter diferentes efeitos benéficos.

Em função desses aspectos, houve um interesse em avaliar a ação bactericida do ozônio gasoso sobre essas bactérias multirresistentes, particularmente sobre as seguintes: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, Enterococos resistentes a vancomicina e *Pseudomonas aeruginosa*, obtidas no Laboratório da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

## Material e Método

Os experimentos foram realizados na Unidade de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental (UTECE) da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e no Laboratório da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, no período de maio de 2014 a junho de 2015.

Os procedimentos foram realizados separadamente com suspensões de *Pseudomonas aeruginosa* (Cepa Multirresistente), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300 MRSA), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299 VRE) e *Acinetobacter baumannii* (Cepa Multirresistente). Tais bactérias foram obtidas e preparadas pelo laboratório da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo sob fluxo laminar.

Foram inoculadas 10<sup>8</sup> UFC/ml de bactérias na escala de 0,5 McFarland em diferentes frascos contendo 500 ml de água estéril bidestilada gelada. Após a preparação dos caldos, os frascos foram transportados para a UTECE, onde foram realizadas as infusões de ozônio gasoso em cada recipiente.

Para isso, utilizou-se um ozonizador acoplado a um tubo de silicone e a um difusor de bolhas finas. Antes de iniciar a aplicação, a concentração de ozônio e o tempo de administração eram previamente estabelecidos no aparelho.

O experimento foi realizado em três etapas: na primeira, foi borbulhado o ozônio gasoso no frasco contendo o caldo da bactéria na concentração de 10 µg/ml durante 2 e 4 minutos. Na fase seguinte, foi infundido ozônio gasoso na concentração de 4 µg/ml durante os mesmos intervalos de tempo. Por fim, borbulhou-se o ozônio gasoso na concentração de 3 µg/ml por 2 e 4 minutos.

Após cada um desses procedimentos, uma amostra de 1 ml da solução foi colhida e acondicionada em frascos de Hemobac trifásico que continham 30 ml de caldo suplementado com TSB, Peridoxina, L-Cisteína estrato de levedura, capazes de promover o

Quadro 1

Crescimento bacteriano após exposição ao ozônio gasoso

Concentração de O <sub>3</sub>	Tempo de Exposição ao O <sub>3</sub>	Bactéria (UFC/ml)			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterococcus</i> sp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10 µg/ml	4 minutos	0	0	0	0
	2 minutos	0	0	0	10 <sup>3</sup>
4 µg/ml	4 minutos	10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>2</sup>	0	0
	2 minutos	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>
3 µg/ml	4 minutos	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	0	10 <sup>3</sup>
	2 minutos	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	0	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>

crescimento de micro-organismos devido à riqueza de seus nutrientes. Os frascos foram incubados em estufa à 36°C por 7 dias, realizando-se leitura das colônias a cada 24 horas de incubação no período de 7 dias.

### Resultados

Foi possível observar que, após infusão de ozônio gasoso por 4 minutos nos caldos contendo bactérias na concentração de 10 µg/ml, não houve crescimento bacteriano nas leituras de 48hs e após 7 dias, exceto com a *Pseudomonas aeruginosa*, que obteve crescimento na concentração de 10<sup>3</sup> UFC/ml, quando exposta ao ozônio por 2 minutos. Já nas infusões com concentrações de 4 µg/ml e 3 µg/ml, houve crescimento bacteriano, embora em menores quantidades, mostrando ação bactericida parcial (Quadro 1).

### Discussão

O uso medicinal do ozônio ainda é controverso<sup>(15)</sup>. Embora seu efeito bactericida seja conhecido há muitas décadas, sua ação terapêutica não despertou tanto interesse. Seu efeito tóxico parece desestimular a busca de novos conhecimentos que possibilitem descobrir métodos terapêuticos práticos e de baixo custo<sup>(18)</sup>. Um dos pioneiros nesse tipo de estudo analisou, em 1940, o efeito bactericida desse gás, sugerindo que o ozônio pudesse ser uma alternativa para o uso da penicilina<sup>(13)</sup>.

Em função do crescente problema do aparecimento de bactérias multirresistentes e da ação desinfetante e antisséptica do ozônio, avaliar o efeito bactericida frente a esses microrganismos tornou-se interessante e original.

Os resultados mostraram que o efeito bactericida foi maior quando utilizamos concentrações mais altas do ozônio, mesmo com menor tempo de exposição. No estudo conduzido por Nogales et al(2014)<sup>(19)</sup>, também se chegou à conclusão que maiores concentrações eram mais eficazes. Entretanto, diferente do presente estudo, no qual o ozônio gasoso foi borbulhado em soluções

contendo altas concentrações de bactérias, ele se utilizou de ozônio aquoso para obter seus resultados.

Um dos aspectos que merecem a atenção foi a necessidade do uso de micro difusores de bolhas. Sem a utilização deles, bolhas maiores formadas pelo fluxo de ozônio gasoso produzido pelo ozonizador passam rapidamente pela solução de bactérias, não permitindo sua diluição, resultando em menor eficiência e ação. Em trabalhos futuros, a utilização de micro difusores de bolhas com poros ainda mais finos poderá mostrar que a ação bactericida pode ser obtida com concentrações ainda menores de ozônio.

Devido ao crescente e preocupante problema do aparecimento de bactérias multirresistentes em ambientes hospitalares, os resultados estimulam a continuação das investigações, pois o uso de soluções contendo ozônio, ou mesmo a sua utilização na forma gasosa, quer como desinfetante, quer como substância asséptica, poderão contribuir para a redução da transmissão desses microrganismos e até no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

Já existem trabalhos indicando a aplicação do ozônio gasoso em pacientes portadores de úlceras, escaras, feridas abertas, lesões pós-operatórias, herpes, áreas infectadas e queda de cabelo<sup>(13)</sup>. Portanto, novos estudos com o ozônio devem ser incentivados.

Em função desses aspectos, nas condições do presente estudo podemos concluir que:

- 1- O ozônio tem efeito bactericida sobre as bactérias multirresistentes estudadas.
- 2- Esse efeito foi proporcional à concentração e ao tempo de exposição.

### Referências Bibliográficas

1. Simões AS, Couto I, Toscano C, Gonçalves E, Póvoa P, Viveiros M, et al. Prevention and control of antimicrobial resistant healthcare-associated infections: The Microbiology Laboratory Rocks! Front Microbiol. 2016, 7:855.
2. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA. Multistate point-prevalence survey of health care associated infections. N Engl J Med. 2016; 370: 1198-208.

3. Zimlichman E, Henderson D, Tamir O, Franz C, Song P, Yamin CK. Health care associated infections a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. *JAMA Int Med.* 2013; 173:281-301.
4. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: 82-9.
5. Tavares W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33:281-301.
6. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43:413-23.
7. Mimica MJ, Berezin EN. Staphylococcus aureus resistente à vancomicina: um problema emergente. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo.* 2006; 51:52-6.
8. Ratti RP, Sousa CP. Staphylococcus aureus metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009; 30:137-43.
9. Paviani ER, Stadnik CB, Heinek I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da Pseudomonas aeruginosa. *Infarma.* 2004;15:66-70.
10. Fuentefria DB, Ferreira AE, Graf T, Corção G. Pseudomonas aeruginosa: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41:470-3.
11. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15:1351-70
12. Sander HS. Enterococos resistentes a vancomicina: Infecção emergente iminente? *Rev Chil Infectol.* 2002; 19: 50-55.
13. Bocci V. Is ozone therapy therapeutic? *Perspect Biol Med.* 1998; 42:131-43.
14. Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs.* 2004; 27:168-75.
15. Silva RA, Garotti JER, Silva RSB, Navarini A, Pacheco Jr AM. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. *Acta Cir Bras.* 2009; 24:124-7.
16. Lake JC, Felberg S, Malavazzi GR, Goulart DA, Nishiwaki-Dantas MC, Dantas PEC. Efeito terapêutico da aplicação intra-ocular de ozônio em modelo experimental de endoftalmite por Staphylococcus epidermidis em coelhos. *Arq Bras Oftalmol.* 2004;67:575-9.
17. Oliveira HH, Lima CJ, Fernandes AB, Zangaro RA, Moreira LH. Uso de óleo ozonizado no tratamento tópico de infestação por carrapato em cão: relato de caso. *Rev Bras Med Vet.* 2014; 36:405-8.
18. Sánchez-Martínez G. The challenges of ozone therapy and access to sources of information. *Rev Esp Ozonoterapia.* 2014; 4:87-9.
19. Nogales CG, Ferreira MB, Lage-Marques JL. Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Enterococcus faecalis – in vitro study. *Rev Esp Ozonoterapia.* 2014; 4:9-15.

---

Trabalho recebido: 20/04/2016

Trabalho aprovado: 17/11/2016