

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA ÁGUA OZONIZADA SOB DIFERENTES MICRORGANISMOS PATOGENICOS

Fabricia Oliveira Oliveira¹, Laerte Marlon Conceição dos Santos¹, Eduardo Santos da Silva¹, Leticia de Alencar Pereira Rodrigues², Paulo Roberto Freitas Neves², Greta Almeida Fernandes Moreira², Gabriela Monteiro Lobato², Marcelo Gerhardt³, Carlos Nascimento³, Luis Alberto Breda Mascarenhas², Bruna Aparecida Souza Machado²

¹ Bolsista de PD&I - Mestrado; fabricia.oliveira@fbter.org.br/fabriciaoliveira6@gmail.com

² Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fieb.org.br

³CTG Brasil, Selviria – MS, Brasil

RESUMO

A água ozonizada ($O_3(aq)$) tem sido considerada um potente agente antimicrobiano. A fim de avaliar o potencial da $O_3(aq)$ e seu efeito biocida, foram testadas diferentes concentrações de $O_3(aq)$ (0,4 ppm, 0,6 ppm e 0,8 ppm) contra diferentes microrganismos patogênicos. Além disso, análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada com o intuito de visualizar o efeito da $O_3(aq)$ contra os microrganismos testados. Em todas as concentrações, a exposição a $O_3(aq)$ resultou numa taxa de mortalidade de *Escherichia coli* de 95%, enquanto que para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* a taxa de mortalidade foi de 100%. As imagens de micrografia indicaram que o efeito sob a estabilidade osmótica - devido à lise da parede celular - pode ser um dos mecanismos de morte promovido pela $O_3(aq)$. Portanto, devido à sua potente ação biocida, a $O_3(aq)$ pode ser considerada uma alternativa viável para o controle microbiano.

PALAVRAS-CHAVE: No máximo 4 (quatro) palavras-chave.

1. INTRODUÇÃO

Ozônio (O_3) é um gás natural de configuração formada por três átomos de oxigênio.¹ Além de ser produzido naturalmente na atmosfera, o O_3 pode ser produzido através da utilização de geradores de eletricidade, viabilizando a sua produção de forma experimental e diferentes aplicações.² Em muitos estudos, a atividade biocida do O_3 é confirmada pela redução da carga microbiana de uma variedade de microrganismos testados, incluindo bactérias, vírus e fungos.³ Um problema associado ao uso do O_3 em sua forma natural é a sua toxicidade. Uma forma de minimizar seus efeitos, é a dissolução desse gás em água, sendo esta forma de uso considerada uma nova forma de utilização deste agente como substância sanitizante.⁴ Dessa forma, considerando a necessidade de novas estratégias para o controle de infecções microbianas, a utilização de agentes sanitizantes como a $O_3(aq)$ pode ser considerada uma estratégia segura, mesmo em situações de emergência como a atual pandemia. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano da $O_3(aq)$ em diferentes microrganismos patogênicos.

2. METODOLOGIA

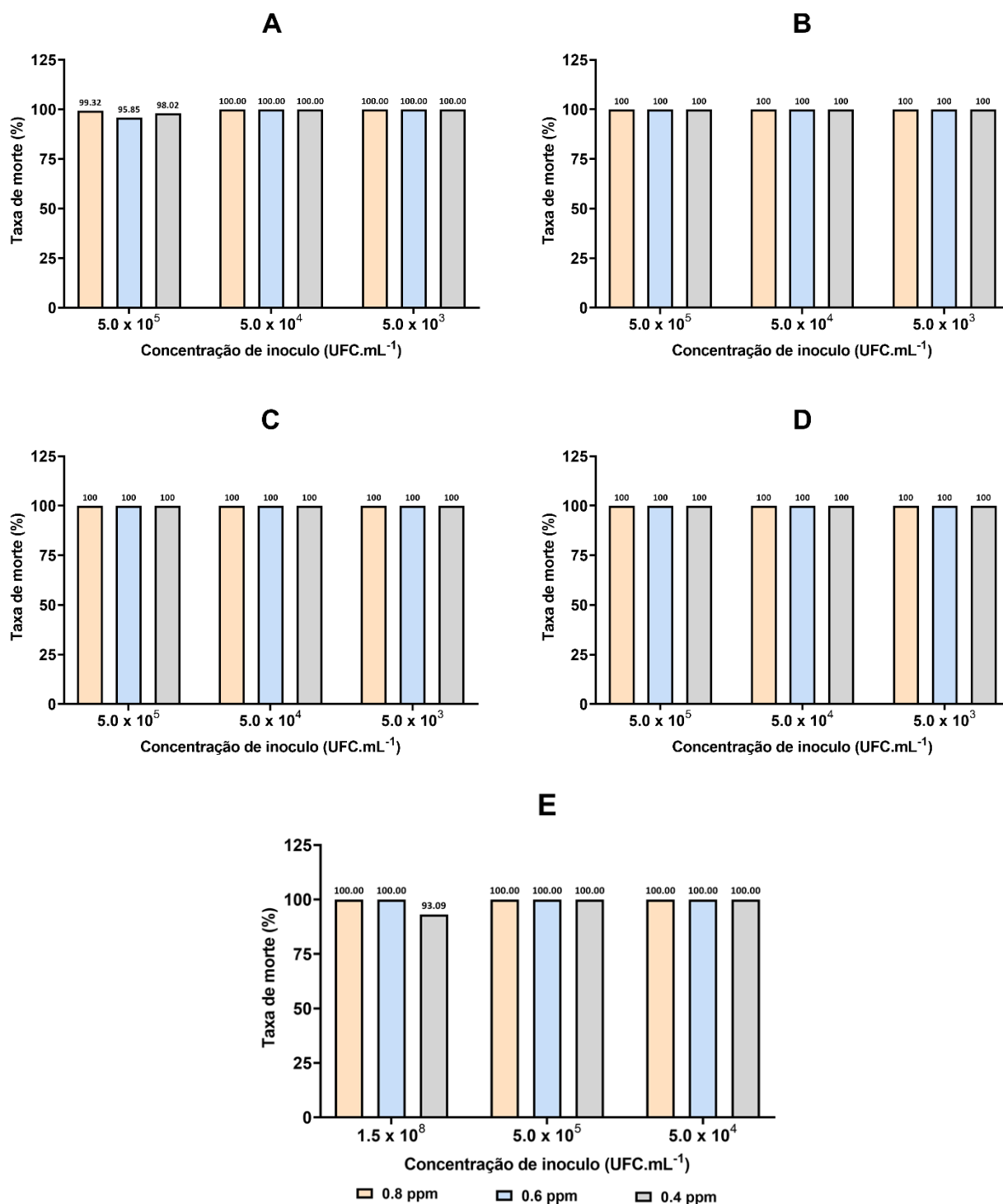
Para a determinação da atividade biocida, as bactérias foram cultivadas em Ágar Triptona de Soja (TSA) por 18-24 horas a 37°C. A levedura foi crescida em Ágar Sabouraud Cloranfenicol (ASC) por 48 horas a 30°C. Após o crescimento, pelo menos três colônias isoladas foram transferidas com auxílio de uma alça bacteriológica para um tubo com 5 mL de solução salina a 0,85%, para preparo do inóculo. O inóculo foi ajustado para se obter uma turbidez óptica comparável à solução padrão de McFarland 0,5, que representa aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹. Depois, os microrganismos foram diluídos em salina para obtenção das concentrações de 5×10^5 UFC/mL⁻¹, 5×10^4 UFC/mL⁻¹ e 5×10^3 UFC/mL⁻¹. As condições utilizadas para as concentrações de $O_3(aq)$ (0,4 ppm, 0,6 ppm e 0,8 ppm) foram baseadas em estudos prévios: temperatura a 4°C e pH 5 (ajustado com HCl). Um (1) mL de inóculo de cada concentração foi incubado com 4 mL de $O_3(aq)$ nas 3 concentrações descritas. O tempo de incubação foi 1 minuto. Após esse tempo, 0,5 mL dos inóculos foram adicionados a tubos com 4,5 mL de neutralizante. Então, as amostras foram plaqueadas em duplicata em Agar Plate Count (PCA) para bactérias e ASC para a levedura, e foram colocadas em crescimento a 37°C e 30°C por 24 horas e 48 horas, respectivamente.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi feita para inferir sobre os possíveis mecanismos de ação da $O_3(aq)$. Para representar a distinção entre as paredes celulares, foram utilizados um microrganismo Gram positivo (*S. aureus*) e um Gram negativo (*E. coli*), bem como a levedura *C. albicans*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram o efeito da ação da $O_{3(aq)}$ (0,4 ppm, 0,6 ppm e 0,8 ppm) após 1 minuto de exposição de cada microrganismo a este agente. A Figura 1 mostra os resultados referentes aos microrganismos testados neste estudo, onde A se refere a *Escherichia coli*, B se refere a *Pseudomonas aeruginosa*, C se refere a *Staphylococcus aureus*, D se refere a *Enterococcus faecalis* e E se refere a *Candida albicans*.

Figura 1. Ação da $O_{3(aq)}$ sob diferentes microrganismos. Análise do percentual de morte *E. coli* (A), *P. aeruginosa* (B), *S. aureus* (C), *E. faecalis* (D) e *C. albicans* (E).



A exposição de *E. coli* à $O_{3(aq)}$ mostrou uma taxa de mortalidade bacteriana superior a 95% a partir da concentração de inoculo de 5×10^5 UFC/mL⁻¹ nas três concentrações testadas (0,4 ppm, 0,6 ppm e 0,8 ppm).

Foram observados melhores resultados em relação à *P. aeruginosa* neste estudo, que apresentou taxa igual a 100% em todas as concentrações de $O_{3(aq)}$ testadas, em todos os inoculos. Semelhante aos resultados demonstrados para a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, a taxa de mortalidade das estirpes de *S. aureus* e *E. faecalis* foi igual a 100% a partir da mais baixa concentração de água ozonizada (0,4 ppm) testada. A melhor atividade biocida foi observada contra *C. albicans*, com uma elevada taxa de mortalidade na concentração de inoculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹. Vale ressaltar que essa concentração de inoculo também foi testada para os outros microrganismos, no entanto, a esta concentração não foi possível a realização de contagem de colônias (confluência) para as bactérias testadas (por esse motivo, esta concentração de inoculo não foi plotada nos gráficos das bactérias). A ação antimicrobiana do O_3 está relacionada com a sua poderosa ação oxidante. Quando se decompõe, este gás gera uma reação oxidante pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo a geração de radicais hidroxil (OH⁻) com maior potencial oxidante (2,83 volts) do que o O_3 , e ambos atuam na inativação de vários microrganismos. Em estudo realizado por outros autores, a concentração de $O_{3(aq)}$ capaz de eliminar os microrganismos contidos numa suspensão com uma densidade de $1,5$ a $5,0 \times 10^8$ UFC/mL foi até nove vezes maior (1,2 ppm a 3,6 ppm), concentrações superiores à $O_{3(aq)}$ do nosso estudo, com a mesma densidade de microrganismos testados.³ Por outro lado, a utilização de $O_{3(aq)}$ (0,4 ppm e 8 ppm) contra *E. coli* numa concentração de inoculo igual a 3×10^4 UFC/mL foi eficiente na descontaminação das mãos.² Contudo, é importante considerar que o número de microrganismos medicamente importantes tais como *S. aureus*, *P. mirabilis*, *Klebsiella spp.* e *E. coli* presentes em áreas intactas da pele humana pode variar entre 10^2 e 10^6 UFC/cm².⁵

Em relação aos dados do MEV, após exposição à $O_{3(aq)}$ a 0,8 ppm, foram observadas alterações morfológicas e estruturais (dados não mostrados). Para *C. albicans*, enquanto as células não expostas não apresentavam quaisquer danos ou modificações estruturais, a incubação com $O_{3(aq)}$ levou a graves perturbações da parede celular, bem como a uma elevada presença de detritos celulares. Além disso, foi observada a formação de vesículas na superfície celular de *C. albicans*, indicando um aumento da permeabilidade da membrana plasmática. No caso da *E. coli*, verificou-se uma grave dissipação celular, lise da parede celular, e presença de detritos celulares. Da mesma forma, *S. aureus* sofreu os mesmos danos. Estas descobertas indicam que a $O_{3(aq)}$ não só induziu diretamente danos nas paredes celulares e membranas plasmáticas, como também provavelmente interferiu na osmolaridade das células.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados os resultados expostos, a $O_{3(aq)}$ é caracterizada como um agente antimicrobiano potencial. Uma concentração mínima de 0,6 ppm foi suficiente para reduzir claramente o número de microrganismos testados, indicando que pode ser utilizado como agente sanitizante. Os resultados foram corroborados quando a análise por MEV foi feita, indicando que os efeitos na estabilidade osmótica - devido à lise da parede celular - pode ser um dos mecanismos de morte da $O_{3(aq)}$. Sendo assim, diante dos resultados encontrados, a $O_{3(aq)}$ pode ser considerada uma alternativa viável para o controle microbiológico de importantes microrganismos patogênicos, principalmente com a crescente preocupação em relação aos processos de descontaminação de superfícies, preocupação esta que ganhou alta relevância durante a corrente pandemia da COVID-19 (doença causada pelo novo coronavírus – SARS-CoV-2). Visto que superfícies contaminadas se caracterizam como potenciais fontes de contaminação, a investigação de novas propostas que possam auxiliar no combate à transmissão de doenças infecciosas é essencial para auxiliar na garantia de saúde à população.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao SENAI CIMATEC (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial) e a CTG Brasil (China Three Gorges Corporation), com recursos do Programa ANEEL R&D (PD-10381-0420/2020).

5. REFERÊNCIAS

- ¹CICERONE, Ralph J. Changes in stratospheric ozone. **Science**, v. 237, n. 4810, p. 35-42, 1987.
- ²BREIDABLIK, Hans Johan et al. Ozonized water as an alternative to alcohol-based hand disinfection. **Journal of Hospital Infection**, v. 102, n. 4, p. 419-424, 2019.
- ³BIALOSZEWSKI, Dariusz et al. Antimicrobial activity of ozonated water. **Medical Science Monitor**, v. 16, n. 9, p. MT71-MT75, 2010.
- ⁴SILVA, Leonardo M. da; JARDIM, Wilson F. Trends and strategies of ozone application in environmental problems. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 310-317, 2006.
- ⁵LARSON, Elaine L. et al. Differences in skin flora between inpatients and chronically ill outpatients. **Heart & Lung**, v. 29, n. 4, p. 298-305, 2000.