

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

OZÔNIO GASOSO COMO ALTERNATIVA DE INIBIÇÃO PARA CEPA PADRÃO DE *Klebsiella pneumoniae*

Ana Luiza Siqueira Mendes, Josne Carla Paterno, Anelise Cristina Osorio
Cesar Doria

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi,
2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, analuiza_jeb@hotmail.com,
professorajosne@gmail.com, ane.doria@gmail.com

Resumo

O ozônio utilizado medicinalmente, é composto por aproximadamente até 5% de ozônio e 95% de oxigênio. A ozonioterapia já foi utilizada para inibição de diversos microrganismos, porém existem poucos estudos sobre os efeitos do ozônio em cepas de bactérias multirresistentes. Devido a essa necessidade, este trabalho teve por objetivo, realizar um estudo sobre o uso do ozônio como alternativa de inibição para cepa padrão ATCC® de *Klebsiella pneumoniae* (4352). Sendo assim, foi preparado um inóculo bacteriano e semeado em Ágar MacConkey, seguido da exposição a diferentes concentrações de ozônio gasoso, variando entre 30, 35 e 40 µg/ml pelo tempo de 20 minutos. Após a incubação por 48h a 37°C, foi realizada contagem das unidades formadoras de colônia, observado uma elevada inibição do crescimento microbiano a partir da concentração de 35 µg/mL, concluindo-se que a eficácia total do ozônio gasoso para inibição de cepa padrão de *Klebsiella pneumoniae*, ocorre em concentrações de 35 e 40 µg/mL.

Palavras-chave: Ozonioterapia. *Klebsiella pneumoniae*. Ozônio.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Biomedicina.

Introdução

O ozônio consiste em uma molécula formada por três átomos de oxigênio (triatómico), caracterizado por sua instabilidade (ANDRADE, 2020). Esta molécula é encontrada naturalmente na atmosfera em sua forma gasosa, sendo produzido através da ação dos raios ultravioleta do sol ou de forma artificial, através de um gerador. Na situação em que o ozônio é produzido através de um gerador, é utilizada uma descarga elétrica de alta voltagem e alta frequência para realizar a passagem de oxigênio puro. Sendo assim, o ozônio utilizado medicinalmente é composto por aproximadamente até 5% de ozônio e 95% de oxigênio. Sua dosagem possui variação de acordo com a doença e a via de administração, utilizando-se entre 1 e 100 mg de ozônio por litro de oxigênio (MORETTE, 2011), podendo ser aplicado na forma gasosa, oleosa ou aquosa (BELEGOTE et al., 2018). O uso do ozônio pode ser aplicado diretamente sobre cepas de microrganismos selecionados, sendo muito comum a utilização de gás ozonizado. A aplicação pode se dar em diferentes concentrações, variando de acordo com o resultado esperado, sendo este de regeneração ou inibição (ANDRADE, 2019).

Possui grande efeito bactericida devido ao seu potencial oxidante, que se manifesta com ação direta no microrganismo (MORETTE, 2011), além de seu efeito destrutivo em fungos e vírus (ANDRADE, 2020). Acredita-se que o ozônio possui sua ação primária na parede celular da bactéria e, então, após penetrar em seu interior, realiza a oxidação dos aminoácidos e ácidos nucleicos (MORETTE, 2011). Consequentemente, há danificação da membrana, facilitando a penetração do ozônio de maneira eficiente nas células e a liberação de radicais livres de oxigênio, destruindo seu ambiente (ANDRADE, 2020). Porém a ação do ozônio pode ocorrer em diversos componentes celulares como enzimas, proteínas, lipídios etc., sendo assim, seu efeito em microrganismos ocorre por processos muito complexos (FANIN et al., 2020). Este efeito do ozônio sobre microrganismos pode ser até 3.500 vezes mais eficiente que o efeito do cloro 6 (MORETTE, 2011). A ozonioterapia, como alternativa de inibição, foi utilizada para diversos microrganismos, além disso, apesar do pouco estudo, também pode-se citar algumas bactérias multirresistentes, entre elas, a *Klebsiella pneumoniae*.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Klebsiella pneumoniae é um microrganismo pertencente à família das Enterobacteriaceae, do grupo de bactérias Gram – negativas, sendo considerado multirresistente. Destaca-se pela habilidade de desenvolver mecanismos enzimáticos de resistência, considerada a grande responsável por diferentes doenças infecciosas, sendo uma das principais causadoras de infecções hospitalares. A infecção por esse microrganismo se dá em seres humanos por meio do contato com diversas fontes ambientais, apresentando grande resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro devido a sua cápsula polissacarídica. O processo infeccioso é iniciado quando há fixação do microrganismo às mucosas das células epiteliais do trato intestinal, respiratório e urogenital, que utiliza da presença de adesinas e fímbrias como mecanismo de fixação. A espécie pode estar associada a meningites e sepse, infecções do trato urinário, pneumonia, rinite crônica atrofica, artrites etc. Além disso, possui custos elevados de tratamento, terapias malsucedidas, morbidade e mortalidade de muitos pacientes (SILVA, 2018).

O ozônio possui grande perspectiva ao se tratar de seu efeito no organismo, sendo capaz de interferir na oxigenação, bem como no metabolismo dos tecidos inflamados, e melhorar a resposta imune do organismo, além de seu efeito bactericida, fungicida e virucida (MORETTE, 2011; ANDRADE, 2020). Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* a ação do ozônio em diferentes concentrações, como alternativa para inativação de cepa padrão de *Klebsiella pneumoniae*.

Metodologia

No presente estudo foi utilizado um aparelho gerador de Ozônio do modelo Medplus Mx (Philozon) (Figura 1), para obter diferentes concentrações de ozônio gasoso, variando entre 30, 35 e 40 µg/ml pelo tempo de 20 minutos de aplicação sobre cepas padrão ATCC® de *Klebsiella pneumoniae* (4352).

Para a preparação de um inóculo padronizado na concentração de 10^6 células/ml, foi utilizado o espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm e densidade óptica (DO) de 0,08. Para o experimento, as amostras foram divididas em 5 grupos: grupo controle negativo; grupo controle positivo com tratamento por UVC; grupo ozônio em concentração de 30 µg/ml; grupo ozônio em concentração de 35 µg/ml e grupo ozônio em concentração de 40 µg/ml.

Uma alíquota de 100 µl de cada grupo foi semeada com o auxílio de alça de Drigalski em ágar PCA, exceto para o grupo controle negativo, em que foi realizada uma diluição de 1:100000 previamente a semeadura, a fim de viabilizar a contagem das colônias posteriormente.

O grupo controle positivo, recebeu tratamento com a lâmpada UV de 12W de potência (comprimento de onda de 200 a 280nm) da capela de fluxo laminar Filtracom, durante 20 minutos.

Nos grupos ozônio, nas três concentrações utilizadas, as placas ficaram submetidas ao gás sendo inseridas em uma bag de ozônio onde permaneceram, de acordo com a determinada concentração, pelo tempo de 20 minutos, independentemente da concentração de ozônio utilizada. Sendo assim, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de colônia (UFC/ml) e o cálculo de percentual de redução após a incubação de 24h a 37°C.

Figura 1 - Aparelho Gerador de Ozônio (modelo Medplus Mx, marca Philozon)



Fonte: o autor.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Resultados

Os resultados obtidos nos experimentos utilizando gás ozonizado, estão descritos na Tabela 1, em que é possível observar tanto o grupo controle positivo (tratado com 20 min de UVC) e os grupos tratados com ozônio nas concentrações de 35 µg/ml e 40 µg/ml não tiveram crescimento de colônias, enquanto o grupo controle negativo (sem tratamento) teve crescimento correspondente a concentração utilizada no inóculo e o grupo tratado com ozônio na concentração de 30 µg/ml teve o crescimento de 1log. Os valores expressos na tabela 1 já consideram o fator de correção, para que os dados sejam expressos em UFC/ml, uma vez que o volume semeado foi de 100 µl.

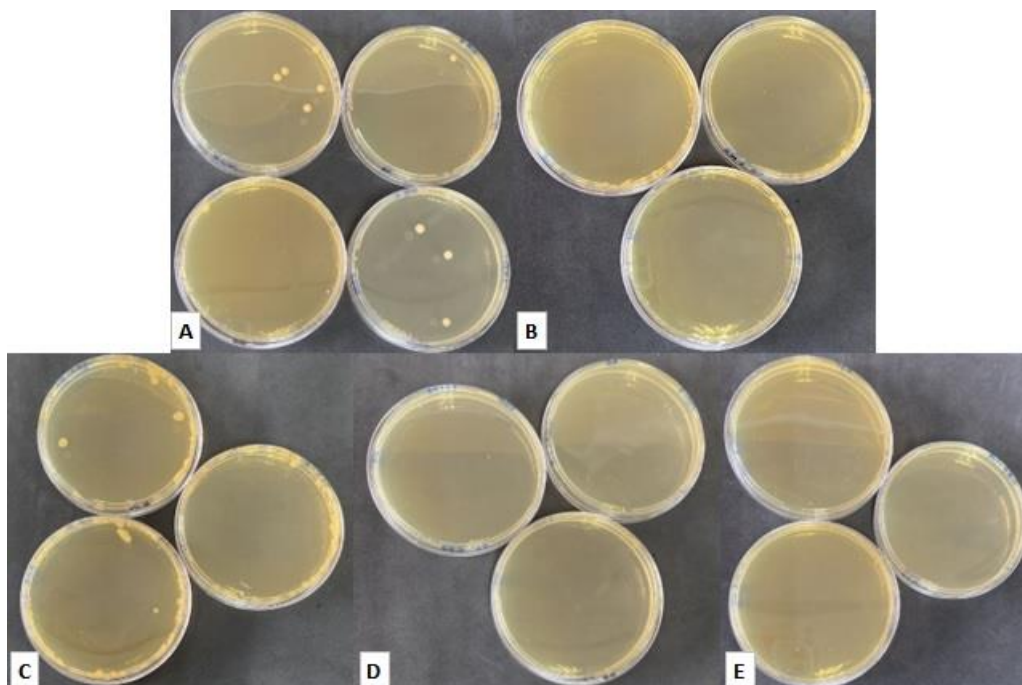
A figura 2 mostra os meios de cultura dos diferentes grupos após incubação a 37°C por 24h.

Tabela 1- Resultados utilizando gás ozonizado com 24h de incubação.

Tempo de incubação	Grupo				
	controle negativo (UFC/mL)	controle positivo (UVC)	ozônio - 30µg/mL (UFC/mL)	ozônio - 35µg/mL (UFC/mL)	ozônio - 40µg/mL (UFC/mL)
24h	6,47log	0	1log	0	0

Fonte: o autor.

Figura 2 – Imagens dos meios após incubação a 37°C por 24h dos diferentes grupos: (A) controle negativo, (B) controle positivo, (C) ozônio 30µg/mL, (D) ozônio 35µg/mL e (E) ozônio 40µg/mL



Fonte: o autor.

Discussão

O uso de ozônio como abordagem antimicrobiana apresenta grandes perspectivas, considerando sua eficácia, já comprovada, contra outros microrganismos além da *Klebsiella pneumoniae*, que possui grande importância médica, devido aos custos elevados de tratamento e a taxa de mortalidade (SILVA, 2018). Muitos estudos com a ozonioterapia já foram realizados em pacientes com infecções, lesões cutâneas e feridas, contaminadas por diferentes microrganismos, como *Escherichia coli* (OLIVEIRA, 2011), *Candida spp.* (MENDES, 2017), Vírus herpes simples (HSV) (DIETRICH et al., 2020).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Oliveira (2011), realizou um estudo para inibição de *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida tropicalis* utilizando óleo, água, gás e creme ozonizados. É importante mencionar que a *Escherichia coli* se assemelha ao microrganismo utilizado no presente estudo, a *Klebsiella pneumoniae*, devido as suas características de pertencerem ao grupo de bactérias Gram-negativas, sendo microrganismos de difícil tratamento. Oliveira (2011), realizou a ozonização através do aparelho de alta frequência, para o tratamento da úlcera por pressão, a fim de promover a cicatrização de feridas, feridas em pé diabético, infecção de pele, onicomicoses e dermatofitoses. O creme para a aplicação, foi ozonizado a 30% e o óleo foi utilizado puro no tratamento da ferida em pé diabético nas primeiras 5 sessões. Através da ozonioterapia para o tratamento das lesões, houve uma reparação tecidual significativa, assim como seu efeito analgésico, bactericida, fungicida e antisséptico. A ferida apresentou cicatrização total somente após 14 semanas a partir do início do tratamento. Deve ser levado em consideração que a ozonioterapia foi aplicada de maneira clínica no estudo, o que pode levar a uma diferença no tempo de tratamento e de inibição do microrganismo, se comparado ao presente estudo que foi realizado de maneira *in vitro*. Além disso, a forma de aplicação do ozônio também é relevante para o tempo de tratamento, onde há uma possibilidade de o gás ozonizado ser mais efetivo em um período de tempo menor do que quando aplicado na forma de creme.

O estudo de Mendes (2017) consistiu na utilização de óleo de coco ozonizado a 5,0 e 7,5%, com o objetivo de promover a inibição de espécies diferentes de *Candida spp.* envolvidas na estomatite dentária, confirmando os efeitos fungicidas do óleo de coco ozonizado contra as 4 espécies identificadas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Porém, foi observado uma redução de apenas 25 e 55% com o óleo de coco ozonizado a 5,0 e 7,5%, respectivamente. Sendo assim, pode-se observar que houve um efeito sobre o microrganismo, porém não o suficiente para causar uma inibição total, diferentemente dos resultados do presente trabalho no qual foram observadas inibições totais utilizando gás ozonizado tanto em 35 µg/ml, quanto em 40 µg/ml, o que pode ser explicado pelas diferenças entre os microrganismos estudados, como também pela forma de aplicação e pela baixa concentração de ozônio aplicada.

Além de seu efeito bactericida e fungicida, Dietrich et al. (2020), realizou um estudo com aplicações subcutâneas com injeção de ozônio e aplicação tópica de óleo de girassol ozonizado para tratamento de lesão causada pelo vírus herpes simples (HSV). Foi utilizado 60 µg/ml de ozônio insuflado com seringa de 3 ml, sendo aplicado 0,5 ml por região totalizando o volume de 2 ml, além de uso tópico de óleo de girassol ozonizado. Com o tratamento, obteve-se remissão total da lesão em 3 dias, sendo relatado uma melhora imediata após a aplicação, o que configura um resultado satisfatório. Os resultados desse trabalho utilizando óleo como forma de aplicação, foram mais significativos devido ao fato de a aplicação ter sido associada ao uso tópico, duas vezes ao dia, até a remissão total da lesão. Além disso, também é possível notar que, assim como este presente trabalho, a concentração do ozônio utilizado foi maior do que nos demais estudos citados (Mendes, 2017; Oliveira, 2011) que utilizaram o óleo como forma de aplicação. Há um possível padrão de comportamento na ação do ozônio quando utilizado em maiores concentrações para microrganismos mais resistentes, uma vez que o vírus, inclusive, é um parasita intracelular obrigatório, portanto para eliminá-lo, é necessário causar a destruição das células onde ele se encontra.

Além dos resultados promissores demonstrados em diversos estudos, Morette (2011) menciona que a ozonioterapia é um tratamento de baixo custo, eficiente no tratamento processos isquêmicos, alérgicos e de feridas extensas de difícil cicatrização, além da sua atuação em processos de desinfecção.

Os resultados obtidos no presente estudo se assemelham aos resultados dos artigos de Oliveira (2011) e Dietrich et al. (2020), que utilizaram o ozônio para tratamento das lesões alcançando 100% de inibição dos microrganismos, principalmente quando se trata de bactérias Gram negativas. Houve variações na maneira de aplicação do ozônio, além de sua forma gasosa, e na concentração utilizada, sendo que, de maneira geral, para inibição de bactérias multirresistentes, foram utilizadas concentrações variando entre 20 e 30 µg/ml de ozônio, enquanto no presente estudo, foi observado um resultado satisfatório a partir da concentração de 35 µg/ml. Devido ao fato dos estudos utilizando o ozônio gasoso para inibição de cepas de *Klebsiella pneumoniae* serem muito escassos, essa diferença de concentrações pode ocorrer devido a uma maior resistência deste microrganismo em particular.

A utilização do UVC, para o grupo controle positivo do presente estudo, foi muito eficaz considerando que não houve crescimento de colônias no período de 48h e possui o seu efeito microbicida comprovado. Desta forma, o UVC foi utilizado como tratamento para o grupo controle positivo, devido

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ao fato de que a exposição do microrganismo se assemelha a forma de exposição do gás ozonizado, possuindo um melhor efeito comparativo.

Conclusão

Conclui-se que o ozônio gasoso aplicado sobre cepas padrão ATCC® de *Klebsiella pneumoniae*, não somente é eficaz, como também apresenta grandes perspectivas de tratamento nas concentrações estudadas, alcançando inibição total a partir da concentração de 35 µg/ml e que, considerando os poucos estudos a respeito da aplicação da ozonioterapia em microrganismos multirresistentes, é necessário que haja um maior número de estudos variando tempo de aplicação/concentração para verificar o melhor protocolo *in vitro*, uma vez que a ozonioterapia em suas mais variadas aplicações, vem mostrando resultados promissores na microbiologia.

Referências

- ANDRADE, A. L. N. Revisão Bibliográfica sobre ozonioterapia tópica no tratamento de úlceras em membros inferiores. UFU, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/25522/3/Revis%C3%A3oBibliogr%C3%A1ficaSobre.pdf>. Acesso em: 01 de novembro de 2022.
- ANDRADE, L. S. Estado D'arte da Ozonioterapia em Feridas: A Contribuição do Enfermeiro. UFMG, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/34679/1/Livia%20Final-convertido.pdf>. Acesso em: 17 de outubro de 2022.
- BELEGOTE, I. S., et al. Tratamento de Doença Periodontal com Ozônio. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR, 2018. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20180704_093210.pdf. Acesso em: 17 de outubro de 2022.
- DIETRICH, L., et al. Terapia com ozônio no tratamento de herpes labial recorrente: relato de caso clínico. Rds Journal, 2020. Disponível em: <https://www.rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8418/7441>. Acesso em: 12 de setembro de 2022.
- FANIN, M., et al. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. UFRPE, 2020. Disponível em: <http://ead.codai.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/3711/482483670>. Acesso em: 17 de outubro de 2022.
- MENDES, M. L. T. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do óleo de coco ozonizado contra *Candida spp*. UFS, 2017. Disponível em: https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/13147/2/MARIO_LUIS_TAVARES_MENDES.pdf. Acesso em: 12 de setembro de 2022.
- MORETTE, D. A. Principais Aplicações Terapêuticas da Ozonioterapia. UNESP, 2011. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/120089/morette_da_tcc_botfmvz.pdf?sequence=1. Acesso em: 17 de outubro de 2022.
- OLIVEIRA, L. M. N. Utilização do ozônio através do aparelho de alta frequência no tratamento da úlcera por pressão. USCS, 2011. Disponível em: https://seer.uscs.edu.br/index.php/revista_ciencias_saude/article/view/1418/1105. Acesso em 12 de setembro de 2022.
- SILVA, D. B. Ozonioterapia na Desinfecção de Águas Pluviais. UFMG, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ICBBBDASJV/1/monografia____douglas_bambirra_da_silva.pdf. Acesso em: 17 de outubro de 2022.