

## ESTUDO DO EFEITO INIBITÓRIO DA ÁGUA ATIVADA POR PLASMA EM CEPAS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Sophia Franzoni Azevedo Souza, Geraldo Magno Alves de Abreu, Anelise Cristina Osório Cesar Doria, Maiara Lima Castilho.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, sophiafranzoni2001@gmail.com, deabreumagno@gmail.com, ane.doria@univap.br, mcastilho@univap.br.

### Resumo

O *Staphylococcus aureus*, causador de infecções graves e resistente a antibióticos, representa um desafio significativo para o tratamento de feridas. A água ativada por plasma (PAW) surge como uma alternativa promissora para o combate a infecções devido à sua capacidade de gerar espécies reativas altamente eficazes. O plasma é um gás ionizado que, ao entrar em contato com a água, produz radicais de oxigênio e nitrogênio que contribuem para a inibição de microrganismos patogênicos. Neste estudo, a PAW demonstrou uma redução significativa das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus*, confirmando sua eficácia antimicrobiana. A análise das espécies reativas, como nitrito e peróxido de hidrogênio, revelou uma forte correlação com a atividade antimicrobiana observada, corroborando a potencialidade da PAW como uma ferramenta inovadora no tratamento de infecções resistentes.

**Palavras-chave:** Plasma, água ativada, *Staphylococcus aureus*, microrganismo, inibição.

**Área do Conhecimento:** Engenharias.

### Introdução

A bactéria *Staphylococcus aureus* pode causar infecções graves em feridas abertas, tornou-se uma preocupação significativa devido à sua resistência crescente a antibióticos e sua habilidade de formar biofilmes. Essa resistência representa um desafio tanto para infecções hospitalares quanto comunitárias (Tong et al., 2015). Diante disso, abordagens inovadoras como o uso de plasma frio têm sido exploradas para tratar essas infecções e melhorar a cicatrização de feridas.

O plasma, comumente referido como o quarto estado da matéria, oferece uma abordagem inovadora e promissora no tratamento de feridas, sendo um gás ionizado composto por uma complexa mistura de radicais livres, elétrons, íons e partículas neutras. Esta forma de matéria, impulsionada por energia elétrica, reúne uma variedade de espécies moleculares, atômicas, iônicas e radicais excitados, destacando-se em diversas aplicações biomédicas (Gao et al., 2022).

O plasma frio tem ganhado atenção significativa devido à sua eficácia na inativação de bactérias e vírus, além de suas aplicações em áreas como tratamento de superfícies, processamento de alimentos, purificação de água e agricultura (Qian-Yun Han et al., 2023). Uma de suas utilizações notáveis é na geração de água ativada por plasma (PAW), a qual demonstra grande eficácia na redução e eliminação de microrganismos patogênicos (Qian-Yun Han et al., 2023). O plasma frio à pressão e temperatura ambiente é produzido ao aplicar corrente elétrica a um gás em condições próximas da temperatura ambiente. A PAW, por sua vez, é obtida pela exposição de um dispositivo de plasma à água, induzindo reações químicas que resultam em um aumento do potencial de redução de oxigênio, redução do pH e aumento da condutividade da água devido à presença das espécies reativas geradas pelo plasma (Qian-Yun Han et al., 2023). As principais espécies reativas formadas tanto no plasma frio quanto na PAW incluem radicais de oxigênio (ROS) e radicais de nitrogênio (RNS), os quais são altamente reativos (Gao et al., 2022; Shanker et al., 2023).

A eficácia dessas tecnologias reside no efeito sinérgico das espécies reativas que, ao interagirem, conseguem neutralizar microrganismos de forma eficaz. No contexto da PAW, essas espécies reativas interagem no meio líquido, formando compostos secundários, como ozônio, peróxido de hidrogênio, íon nitrato e ânion peroxinitrito, que intensificam a capacidade inibitória do crescimento microbiano (Shanker et al., 2023). Contudo, fatores críticos, como o tempo de tratamento, os gases utilizados, a

distância da pluma de plasma e a natureza dos eletrodos, desempenham um papel essencial na eficiência dessa técnica (Thirumdas et al., 2018).

O plasma frio surge como uma alternativa promissora para enfrentar infecções persistentes, abordando limitações dos tratamentos convencionais, tais como resistência bacteriana, cicatrização lenta, e problemas associados a alergias e resistência a medicamentos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo explorar o potencial terapêutico da água ativada por plasma no tratamento de microrganismos, especialmente *Staphylococcus aureus*, contribuindo para uma abordagem mais eficaz nesse campo crítico da saúde.

## Metodologia

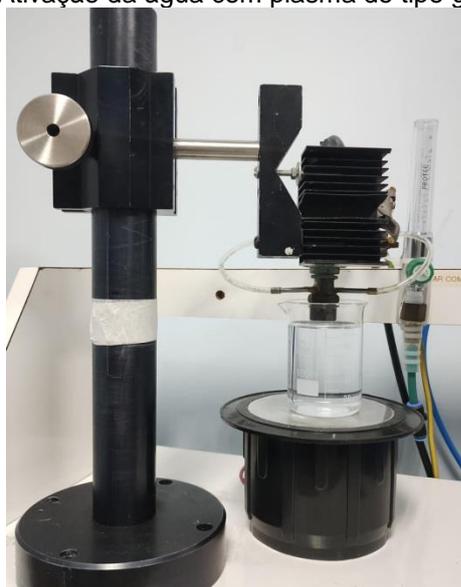
### Cepa Bacteriana e Condições de Cultura

A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* foi cedida pelo Laboratório Oswaldo Cruz de São José dos Campos por meio de um convênio. A bactéria foi armazenada em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) com 20% de glicerol (LGC, 13-1325-10) em ultra freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para os ensaios, a cepa foi reativada em caldo BHI e incubada em estufa bacteriológica por 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguida de semeadura por esgotamento em ágar BHI e incubada novamente por 24h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Água Ativada por Plasma

A ativação da água foi realizada utilizando um plasma do tipo *gliding arc*, operando com uma potência de 18,4 W e frequência de 60 Hz. O sistema foi configurado com um fluxo de 6 L/min de argônio e 4 L/min de ar comprimido. A água deionizada, com um volume de 100 ml, foi posicionada a uma distância de 2 mm da saída do plasma e exposta ao tratamento por 15 minutos, como mostrado na Figura 1.

Figura 1: Ativação da água com plasma do tipo *gliding arc*.



Fonte: Autores (2024).

### Determinação da Unidade Formadora de Colônia

O pré-inóculo foi preparado de acordo com a escala 0.5 de McFarland, e diluído para o inóculo padrão na concentração de  $10^5$  células/mL. Após a transferência para um tubo eppendorf, o inóculo foi ressuspendido em uma solução contendo PAW, com o período de tratamento de 15 minutos. Um grupo controle de crescimento também foi realizado utilizando somente com água de osmose reversa.

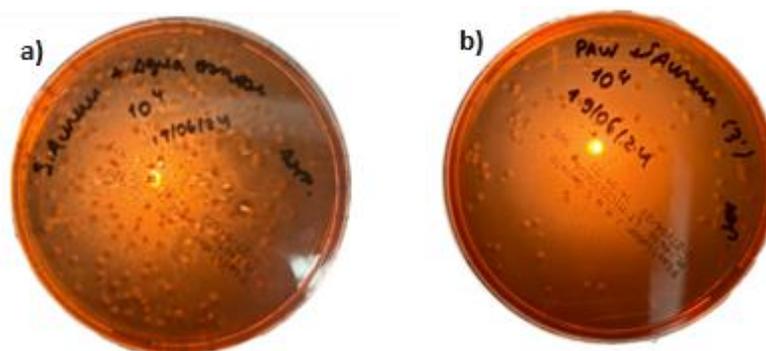
Após o tratamento, uma alíquota da amostra foi submetida a diluições seriadas, a fim de garantir que a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Em seguida, as diluições foram semeadas em placas de ágar BHI utilizando uma alça de drigalski, distribuindo uniformemente a amostra na

superfície do ágar. As placas semeadas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das UFCs para determinar a capacidade da inibitória do crescimento de microrganismos.

## Resultados

O tratamento com água ativada por plasma resultou em uma significativa inibição do crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus*, como visualizado na Figura 2. Observa-se na diluição de  $10^4$  uma diferença significativa no número de colônias quando comparadas os grupos tratados somente com água de osmose e a água ativada por plasma.

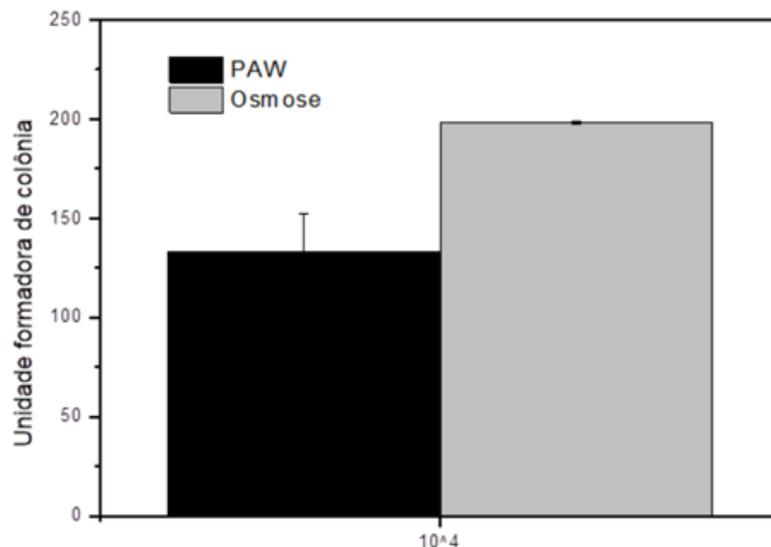
Figura 2: Inibição de crescimento *S. aureus*. a) Controle positivo com água de osmose reversa; b) Grupo tratado cepa tratada = PAW + *s. aureus*.



Fonte: Autores (2024).

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de ágar BHI mostrou uma redução substancial no número de colônias, comparado aos controles não tratados (Figura 3). O tratamento com o PAW apresentou crescimento de aproximadamente 133 UFC enquanto o controle positivo apresentou 199 UFC. Essa redução no crescimento bacteriano demonstra a eficácia da água ativada por plasma em inibir a proliferação de *S. aureus*, confirmando a capacidade do tratamento para exercer um efeito antimicrobiano notável. Os resultados obtidos são consistentes com a literatura existente que sugere a atividade antimicrobiana de água ativada por plasma contra diversos patógenos bacterianos.

Figura 3: Determinação do número de unidades formadoras de colônia entre os tratamentos PAW e somente água.



Fonte: Autores (2024).

## Discussão

Os resultados obtidos demonstram o potencial da água ativada por plasma (PAW) como uma ferramenta eficaz no combate a microrganismos patogênicos, particularmente o *Staphylococcus aureus*. As imagens das placas de ágar (Figura 2) mostram uma redução significativa nas Unidades Formadoras de Colônia (UFC) quando comparadas ao controle. Esse efeito inibitório pode ser atribuído à ação sinérgica das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) presentes na PAW, as quais são geradas durante o tratamento do plasma tipo *gliding arc*, o qual pode ser quantificado na Figura 3. Adicionalmente, a literatura descreve que a quantidade de peróxido de hidrogênio gerada também contribui para a atividade antimicrobiana da PAW. A interação dessas espécies com as células bacterianas pode levar à desestabilização das membranas celulares e à indução de danos oxidativos, resultando na inibição do crescimento bacteriano, como observado nas culturas de *Staphylococcus aureus*. Esses achados reforçam as conclusões de Ziuzina et al. (2015), que destacaram a importância das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no mecanismo de ação antimicrobiana da PAW, especialmente na indução de danos às membranas celulares bacterianas.

Comparando os resultados obtidos com estudos prévios, observa-se que a PAW é uma tecnologia promissora para aplicações em áreas biomédicas, especialmente no tratamento de infecções resistentes. A capacidade da PAW de reduzir a carga microbiana sem a necessidade de agentes químicos convencionais reforça seu potencial como uma alternativa segura e eficiente, minimizando os riscos associados à resistência antimicrobiana. De maneira similar, Nogueira et al. (2024) também relataram uma significativa redução da carga bacteriana utilizando PAW, enfatizando sua aplicabilidade em ambientes clínicos para desinfecção e esterilização. Entretanto, é importante considerar que fatores como a composição do gás utilizado, o tempo de tratamento e a distância entre o jato de plasma e a amostra podem influenciar significativamente a eficácia da PAW. Futuros estudos devem focar na otimização desses parâmetros para maximizar o efeito antimicrobiano, além de investigar a aplicação da PAW em diferentes tipos de microrganismos e condições de infecção. Como observado no estudo de Raza et al. (2023), a otimização dos parâmetros de geração de PAW é crucial para garantir a eficácia e a segurança do tratamento, destacando a necessidade de mais pesquisas para entender completamente as variáveis envolvidas.

## Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que a água ativada por plasma (PAW) possui um significativo potencial antimicrobiano, especialmente contra *Staphylococcus aureus*. A redução significativa nas Unidades Formadoras de Colônia que foi observada nas placas de ágar confirma a eficácia da PAW como uma alternativa promissora aos métodos convencionais de combate a infecções bacterianas. No entanto, é necessário aprofundar o conhecimento sobre os parâmetros de geração e aplicação da PAW, como a composição do gás, o tempo de tratamento e a distância de aplicação, para otimizar sua eficácia e ampliar suas possibilidades de uso.

## Referências

GAO, Yawen; FRANCIS, Keziah; ZHANG, Xuehua. Review on formation of cold plasma activated water (PAW) and the applications in food and agriculture. **Food Research International**, v. 157, p. 111246, 2022.

NOGUEIRA, Sabrina de Moura Rovetta. Efeitos dos líquidos ativados com plasma atmosférico sobre *Candida albicans*. 2024.

QIAN-YUN HAN; Xin Wen, Jing-Yu Gao; Chong-Shan Zhong; Yuan-Ying Ni. Application of plasma-activated water in the food industry: A review of recent research developments. **Food Chemistry**, v. 405, Part A, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134797>.

RAZA, Sada; WADOWIAK, Mateusz; PACZESNY, Jan. An overview of diverse strategies to inactivate enterobacteriaceae-targeting bacteriophages. **EcoSal Plus**, v. 11, n. 1, p. eesp-0019-2022, 2023.

SHANKER, M. Anjaly et al. Implications of cold plasma and plasma activated water on food texture-a review. **Food Control**, p. 109793, 2023.

THIRUMDAS, Rohit et al. Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. **Trends in food science & technology**, v. 77, p. 21-31, 2018.

TONG, S. Y. C. Davis J. S., Eichenberger E., et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clin. Microbiol. Rev**, n. 28, p. 3, 2015.

ZHOU, Renwu et al. Plasma-activated water: Generation, origin of reactive species and biological applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 53, n. 30, p. 303001, 2020.

ZIUZINA, Dana et al. Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138209, 2015.