

UNIVERSIDADE BRASIL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
CAMPUS ITAQUERA

CLEVERSON MARCELO PILATTI

EFEITOS DA OZONIOTERAPIA DOMÉSTICA EM MODELO  
EXPERIMENTAL MURINO DE VULVOVAGINITE POR *CANDIDA*  
*ALBICANS*

EFFECTS OF DOMESTIC OZONOTHERAPY IN A MURINE  
EXPERIMENTAL MODEL OF VULVOVAGINITIS BY *CANDIDA*  
*ALBICANS*

São Paulo – SP

2022

**CLEVERSON MARCELO PILATTI**

**EFEITOS DA OZONIOTERAPIA DOMÉSTICA EM MODELO  
EXPERIMENTAL MURINO DE VULVOVAGINITE POR *CANDIDA*  
*ALBICANS***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa

**Orientador**

Prof. DR. Drauzio Eduardo Naretto Rangel

**Coorientador**

São Paulo – SP

2022

## RESUMO

Na candidíase vulvovaginal, observa-se comumente prurido, placas esbranquiçadas, leucorreia, eritema e edema na vulva e vagina. Para o tratamento comum da candidíase utiliza-se antifúngicos em forma de comprimidos ou pomadas aplicadas diretamente na área da infecção. Antimicóticos apresentam alto custo e podem gerar efeitos colaterais indesejáveis. Uma proposta de baixo custo, simples, de fácil acesso e com poucos efeitos colaterais para o tratamento, pode ser embasada no uso do ozônio de forma medicinal. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ozonioterapia medicinal em *C. albicans* por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* através do modelo experimental murino de vulvovaginite. O experimento foi conduzido *in vitro* pelo cultivo de cepas de *Candida albicans* por 24 h a 37 °C. Nas placas utilizadas para controle, foram semeados 10 µL da suspensão celular de *C. albicans*, com alça calibrada, em placas de Petri de 10 mm, contendo meio sólido Ágar Sabourand Dextrose. Essas placas não foram submetidas à exposição de ozônio. No experimento *in vivo* utilizou-se camundongos C57/BL6, fêmeas, com 45 dias de vida. diluídos em 0.2 ml de água destilada na dose de 2mg/kg/dia durante 7 dias. Após a supressão da atividade ovariana, foi inoculada, em dose única e sob anestesia, 20 µL de suspensão de *Candida albicans* em PBS estéril, na concentração de 10<sup>5</sup>UFC/ml células leveduriforme. A distribuição se dera em 4 grupos de animais: **Grupo Controle Absoluto**: Não submetidos à infecção pelo patógeno; **Grupo Controle**: Submetidos à infecção por *C. albicans*, porém não tratados; **Grupo Ozonioterapia**: Submetidos à infecção agente patológico e tratados com ozonioterapia de uso medicinal; **Grupo Lavagem**: Submetidos à infecção e posteriormente tratados através de lavagem vaginal. Sinalizado um grupo controle. Para o Grupo Ozonioterapia foi realizado o procedimento de lavagem vulvovaginal uma vez ao dia durante três dias. Prontamente antes do sacrifício dos roedores, fora realizado o procedimento de coleta do lavado vaginal. Instilou-se 50 µL de PBS estéril na vagina de cada animal, com o uso de um micropipetador e ponteira de 100 µL, aspirando-se imediatamente em seguida. Os dados obtidos das UFC foram analisados através de estatística descritiva e analítica através do teste ANOVA, utilizando o teste de Tukey como *post hoc*, com alfa fixado em  $p > 0,05$ . Verificou-se que a placa controle apresentou maior quantidade de UFC quando comparada às placas expostas ao ozônio pelo ar.

Quanto a quantidade de UFC, a exposição por 600s demonstrou capaz de reduzir 98,89% o número de UFC quando comparado com as placas controle. As suspensões ozonizadas durante 60s e 150s não demonstraram crescimento celular, obtendo-se uma diferença de 100% quando comparada com a placa controle. Conclui-se com o estudo que o gás ozônio apresentou grande eficácia sobre a proliferação de *C. albicans in vitro*. Os melhores resultados observados foram com aplicação em meio líquido. A ozonioterapia foi capaz de reduzir significativamente a infecção no modelo experimental utilizado. Nos experimentos conduzidos *in vivo*, o número de UFC/ml encontrado foi menor no grupo tratado com ozônio.

**Palavras-chave:** *Candida Albicans*. Ozônio. Candidíase vaginal. Murinos.

## ABSTRACT

In vulvovaginal candidiasis, itching, whitish plaques, leucorrhoea, erythema and edema in the vulva and vagina are commonly observed or observed. For common treatment of candidiasis, antifungals are used in the form of pills or ointments applied directly to the area. Antimycotics can have undesirable side effects and are expensive. A proposal of low cost, simple, easy to access and with few side effects for the treatment can be based on the medicinal use of ozone. The aim of the study was to evaluate the effects of medicinal domestic ozone therapy on *C. albicans* through in vitro and in vivo assays using the murine experimental model of vulvovaginitis. The experiment was conducted in vitro by cultivating *Candida albicans* strains for 24 h at 37 °C in solid medium Agar Sabouraud Dextrose. In the plates used for control, 10 µL of the cell suspension of *C. albicans* were seeded, with a calibrated loop, in 10 mm Petri dishes, containing solid medium Agar Sabourand Dextrose (Oxoid). These plates have not been subjected to ozone exposure. The in vivo experiment used 45-day-old female C57/BL6 mice. Diluted in 0.2 ml of distilled water at a dose of 2mg/kg/day for 7 days. After suppression of ovarian activity, 20 µL of *Candida albicans* suspension in sterile PBS, at a concentration of 10<sup>5</sup> yeast cells, was inoculated in a single dose and under anesthesia. The distribution took place in 4 groups of animals: Absolute Control Group: Not submitted to infection by the pathogen. Control Group: Subjected to *C. albicans* infection, but not treated. Ozone Therapy Group: Subjected to pathological agent infection and treated with medicinal ozone therapy. Wash Group: Submitted to infection and later treated with vaginal washing. Flagged as control group. For the Ozone Therapy Group, the vulvovaginal lavage procedure was performed once a day for three days. Promptly before the sacrifice of the rodents, the procedure for collecting the vaginal lavage was performed. 50 µL of sterile PBS was instilled into the vagina of each animal, using a micropipettor and 100 µL tip, and aspirated immediately afterwards. The data obtained from the CFU were analyzed using descriptive and analytical statistics using the ANOVA test, using the Tukey test as posts hoc, with alpha set at  $p > 0.05$ . It was found that the control plate had a higher amount of CFU when compared to plates exposed to ozone in the air. Exposure for 600 s was able to reduce 98.89% the number of CFU when compared to control plates.

The suspensions ozonized for 60 s and 150 s did not show cell growth, obtaining a difference of 100% when compared to the control plate. The amount of UFC counted in ozonized suspensions. The ozone gas showed great efficacy on the proliferation of *C. albicans* in vitro. Best results observed were with application in liquid medium. Ozone therapy was able to significantly reduce the infection in the experimental model used. In experiments conducted in vivo, the number of CFU/ml found was lower in the group treated with ozone.

**Keywords:** *Candida Albicans*. Ozone. Candidiasis. Murine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de ozônio.....	11
Figura 2 – Esquema eletrodo dielétrico produção de ozônio.....	12
Figura 3 – Formação e degradação do ozônio na natureza.....	12
Figura 4 – Mecanismo de ação do ozônio em feridas.....	13
Figura 5 – Calibrador PhoenixSpec.....	30
Figura 6 - Microrganismos padrão.....	30
Figura 7 – Saco plástico (descrição) .....	31
Figura 8 – Ozonizador Vigor. Aparelho gerador doméstico; Marca vigor; Concentração: 400mg/h - 1,8 g/m <sup>3</sup> ; Voltagem: 110v; Multifuncional: Ar e água.....	32
Figura 9 – Esquema de exposição das placas com <i>C. albicans</i> ao ozonizador doméstico com um saco plástico selado.....	33
Figura 10 – Esquema da solução de <i>C. albicans</i> ao ozonizador doméstico em tudo de ensaio.....	34
Figura 11 – Inoculação da suspensão de <i>C. albicans</i> .....	35
Figura 12 – Ensaio <i>in vitro</i> . Placas de Petri após 24 horas de exposição ao ozônio. A - Não tratada com ozônio; B - exposta ao ozônio por 60 s; C - exposta ao ozônio por 150 s; D - Exposta ao ozônio por 600 s.....	38
Figura 13 – Ensaio <i>in vitro</i> . Placas de Petri após 24h de semeadura das suspensões ozonizadas. A - Tratada por 30 s; B - tratada por 60 s; C - tratada por 150 s.....	40

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Descrição dos diferentes tratamentos para <i>C. albicans</i> .....	27
Tabela 2: Interação do ozônio com microrganismos.....	28
Tabela 3: Médias de UFC/ml das placas expostas ao ozônio.....	39
Tabela 4: Apresentação das médias de UFC/ml das suspensões ozonizadas.....	40
Tabela 5: Apresentação das médias de UFC/ml do lavado vaginal dos grupos de fêmeas do experimento, percentual da taxa de crescimento celular e percentual de diferença entre as médias obtidas.....	41

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>x</b>
<b>2. OZÔNIO</b> .....	<b>xi</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>xiv</b>
<b>4. CANDIDA ALBICANS</b> .....	<b>xiv</b>
3.1 Formação e desenvolvimento do biofilme da <i>Candida Albicans</i> .....	xvi
3.2 Biofilmes multiespécies formados entre <i>C. albicans</i> e outras espécies .....	xvii
3.3 Implicações das interações fungo-bacterianas na infecção .....	xviii
3.4 Incidência .....	xix
3.5 O trato gastrointestinal .....	xix
3.6 Candidíase vaginal .....	xx
3.7 Interação da microbiota oral com a <i>C. albicans</i> .....	xxi
3.8 O trato respiratório .....	xxii
3.9 A imunidade da pele frente a <i>C. albicans</i> .....	xxiii
3.10 O trato urinário e sua interação com a <i>C. albicans</i> .....	xxiv
3.11 A <i>C. albicans</i> e os fatores de virulência para ITU .....	xxv
3.12 O polimorfismo da <i>C. albicans</i> e sua relação com as ITUs .....	xxv
3.13 Candidúria .....	xxvi
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>xxx</b>
5.1 EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i> .....	xxx
5.1.2 Cultivo das cepas e ajuste da concentração .....	xxx
5.1.3 Confeção da placa controle .....	xxxii
5.1.4 Semeadura das suspensões e exposição em câmara de ozônio .....	xxxii
5.1.5 Semeadura e ozonização das suspensões .....	xxxiii
5.1.6 Cultivo das placas e contagem das UFCs .....	xxxiv
5.2 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> .....	xxxv
5.2.2 Desenvolvimento do modelo experimental de vulvovaginite .....	xxxv
5.2.3 Distribuição dos grupos .....	xxxvi
5.2.4 Comprovação da infecção .....	xxxvi
5.2.5 Tratamentos .....	xxxvi
5.2.6 Coleta do lavado vaginal e sacrifício .....	xxxvii
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>xxxviii</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>xlii</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>xliv</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>xlv</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Candida albicans* é uma espécie de fungo encontrado em 80% da população humana, habitando frequentemente o sistema digestivo (NAGLIK JR et al., 2003). Apresenta capacidade de alterar sua morfologia saprófita, unicelular, formando esporos de hifas de acordo com as condições ambientais (BANTING; HILL, 2001).

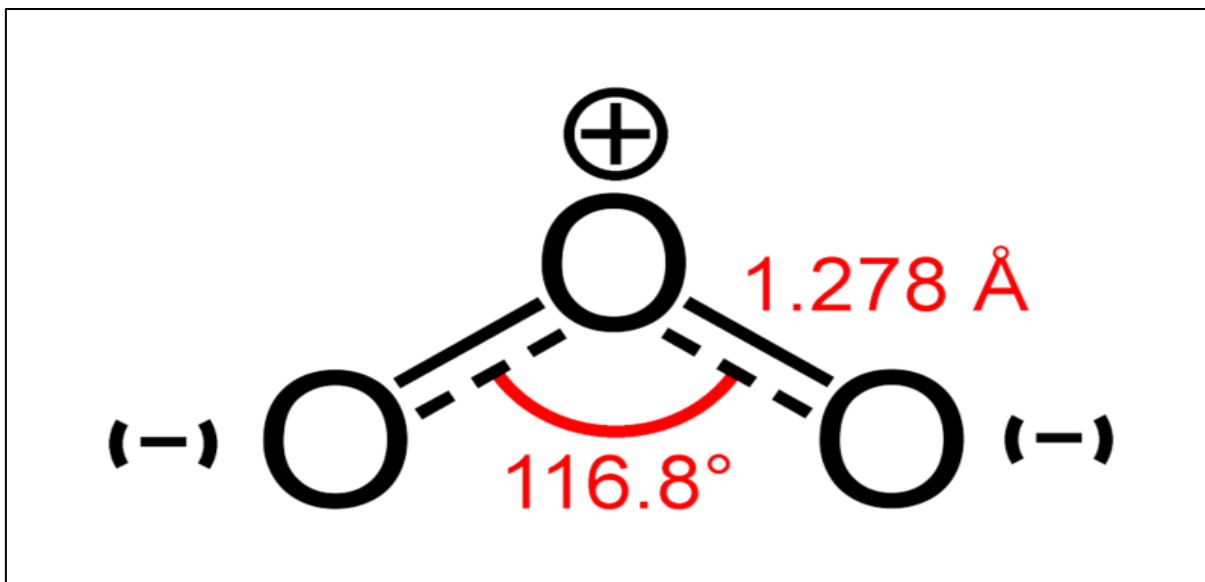
A *C. albicans* faz parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis e não produz efeitos prejudiciais à saúde, porém, se houver comprometimento do sistema imune do hospedeiro, o microrganismo tende a apresentar manifestações agressivas, podendo causar Candidíase Vulvovaginal, Intestinal ou Oral (NAGLIK JR et al., 2003). Estima-se que pelo menos 55% de todas as mulheres terão ao menos um episódio de vulvovaginite causada por *C. albicans* durante a vida (FOXMAN et al., 2000). Outras estimativas apontam que 1 em cada 4 mulheres atendidas em um ano num ambulatório de ginecologia, apresentaram candidíase vulvovaginal assintomática e 60% delas apresentavam os sintomas (RIBEIRO et al., 2001).

Alguns fatores como o uso de alguns antibióticos, contraceptivos hormonais, corticoides, doenças como diabetes ou o uso de roupas íntimas sintéticas podem alterar a flora vaginal normal e os mecanismos de defesa, favorecendo a infecção pelo patógeno. As infecções ocorrem também em indivíduos com sistema imunológico severamente comprometido, como em portadores de HIV, como resultado de terapia antineoplásica ou imunossupressiva pós transplante de órgãos (ÁLVARES et al., 2007; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). Dentre as manifestações clínicas da candidíase vulvovaginal, podem-se observar prurido, leucorreia, placas esbranquiçadas, edema e eritema na vulva e vagina (BOATTO et al., 2006).

O tratamento da candidíase consiste em antifúngicos em forma de comprimidos ou pomadas aplicadas diretamente na área afetada (FERRAZZA et al., 2005). Embora apresentem grande eficácia, os antibióticos podem ter alto custo e efeitos colaterais indesejáveis, como distúrbios gastrintestinais, febre, calafrios, tromboflebite, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, reações alérgicas e / ou parada cardíaca (durante a infusão rápida da droga) (CASTRO et al., 2006).

## 2. OZÔNIO

Figura 1 – Molécula de ozônio:



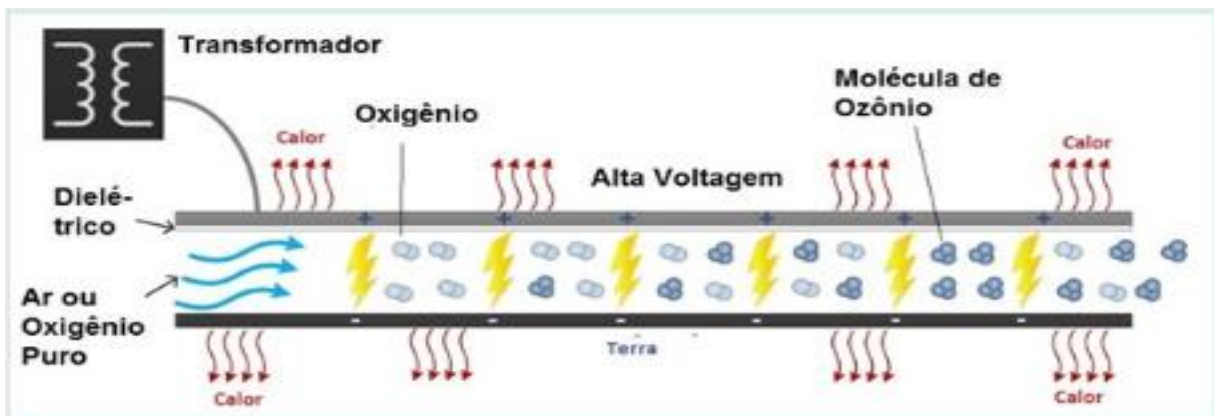
Fonte: Do autor

Em 1834, o ozônio ( $O_3$ ) foi constatado pelo químico alemão Cristian Friedrich Schönbein e atualmente, após 125 anos de investigações e aplicações, seu uso como agente terapêutico é reconhecido mundialmente. No Brasil, a terapia com ozônio começou a ser utilizada por volta de 1970 pelo médico Heinz Konrad. O  $O_3$  promove a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que influenciam no metabolismo celular, proporcionando benefícios para a reparação tecidual, além de efeitos antimicrobiano, bactericida e fungicida (OLIVEIRA, 2011).

Quando entra em contato com o tecido lesado, o ozônio promove a geração de ERO como o peróxido de hidrogênio, aumentando a glicólise, formando adenosina trifosfato (ATP) e acelerando o transporte de oxigênio para os tecidos. Assim, favorece a resposta do sistema imune, pois ativa os leucócitos e aumenta a produção de interleucinas e citocinas. A reparação tecidual ocorre de fato com o aumento da atividade plaquetária e o aumento da liberação de fatores de crescimento. Ocorre a formação de tecido de granulação e neoangiogênese, o que acelera a cicatrização tecidual (TRAINA, 2008; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ et al., 2012).

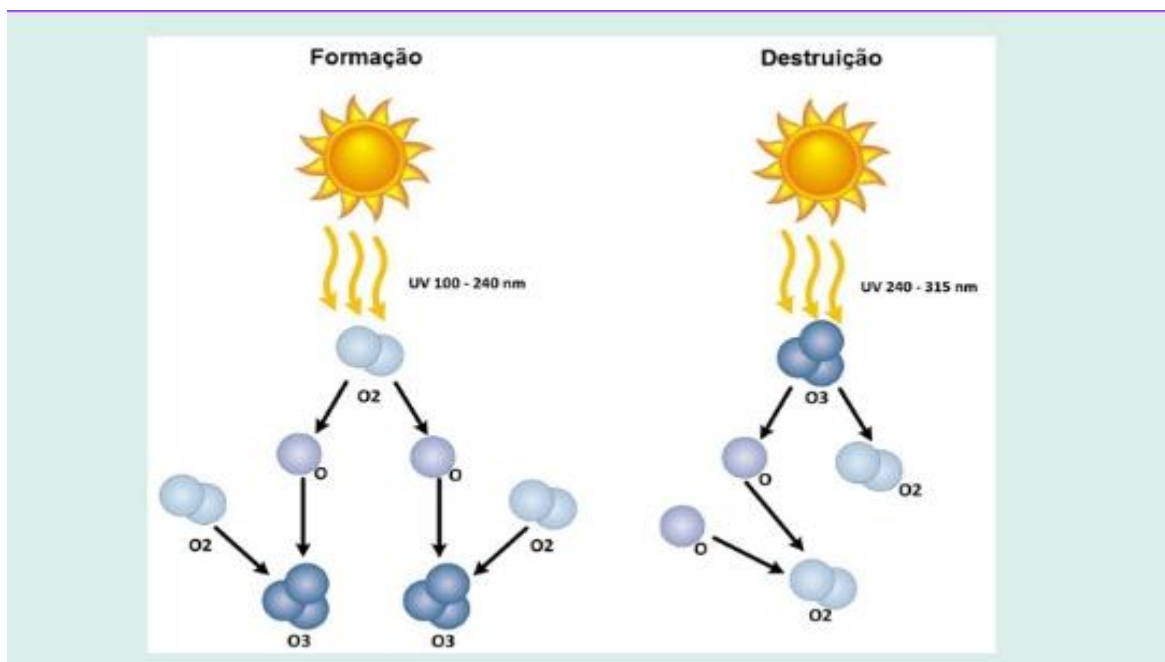
Uma proposta simples, de baixo custo relativo, com acesso cada vez mais fácil e com poucos efeitos colaterais para o tratamento contra protozoários, bactérias, vírus e incluindo fungos, é baseada no uso do ozônio medicinal, que é a utilização do gás oxigênio estéril hospitalar a 100%, já ozonizadores domésticos utilizam os gases atmosféricos, onde o gás oxigênio está a 21% submetido a um gerador (eletrodo dielétrico cerâmico, quartzo) ou lâmpada UV, associado a uma bomba de pressão. São adquiridos facilmente pelo comércio eletrônico ou comércio local. (FERREIRA et al., 2013; TALUKDAR et al., 2015).

Figura 2 - Esquema eletrodo dielétrico produção de ozônio:



Fonte: New Ozone

Figura 3 - Formação e degradação do Ozônio na natureza:

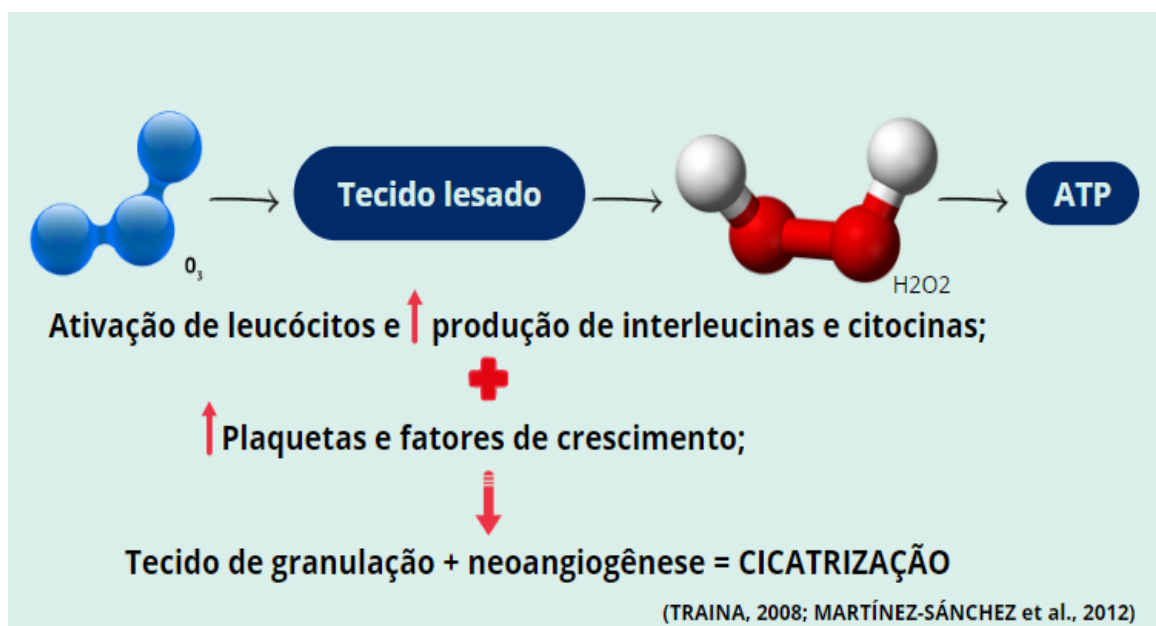


Fonte: New Ozone

A ozonioterapia é uma técnica que utiliza o  $O_3$  como um agente terapêutico e tem sido aplicada em situações de osteomielites, abscessos, úlceras de decúbito, pé diabético, queimaduras, doenças isquêmicas, doenças pulmonares, entre outras. Dentre os efeitos da ozonioterapia incluem-se a formação de tecido de granulação e neoangiogênese devido às suas propriedades sépticas, estimulação da circulação sanguínea, revitalização das funções orgânicas e ativação do sistema imunológico do organismo (BEARZATTO et al., 2003; BOCCI, 2005).

A utilização do ozônio medicinal no tratamento de feridas tem apresentado bons resultados, tanto na cicatrização total de feridas quanto na estimulação e melhora do processo cicatricial, melhorando o aspecto e o odor. Ensaios demonstraram que, devido à melhora no processo de cicatrização da ferida, a necessidade de amputação em diversos casos foi dispensada (OLIVEIRA, 2007; WAINSTEIN et al., 2011).

Figura 4 - Mecanismo de ação do ozônio em feridas:



### 3. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da ozonioterapia doméstica em *C. albicans* por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* através do modelo experimental murino de vulvovaginite. Para isso, serão avaliadas as alterações histopatológicas vulvovaginais causadas pelo fungo *C. albicans* na candidíase vulvovaginal em camundongos C57/BL6 através da contagem das Unidades Formadoras de Colônia antes e após a coleta do lavado vaginal. Por fim, serão discutidos os efeitos obtidos com a aplicação da ozonioterapia com relação ao grupo controle.

### 4. CANDIDA ALBICANS

Descrita pela primeira vez há aproximadamente 150 anos a *C. albicans*, é uma levedura diplóide heterozigótica, ou seja, fungos unicelulares. Pertencem ao gênero *C. albicans* e são fungos oportunistas, isto é, que habitam a flora normal do corpo humano, principalmente trato gastrointestinal, boca, pele, aparelho reprodutor feminino, não causam doença em pelo menos 70% de indivíduos adultos saudáveis (TODD et al., 2019; NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2016).

Ao existir uma quebra do equilíbrio biológico do organismo humano, comumente resultante de aspectos patológicos e função imunológica reduzida (que podem ser por meio de estresse e/ou por meio de outras doenças), pode ocorrer a invasão e multiplicação destes fungos nos tecidos, gerando infecções (MOYES et al., 2016). Sendo assim, a *C. albicans* é considerada um patógeno fúngico humano, causando milhões de infecções sistêmicas da pele, das mucosas (boca, vagina, intestino) e aumentando o risco de vida (NAGLIK; GAFFEN; HUBE, 2019).

Esse fungo em hospitais, representa 15% dos casos de sepse adquiridos, além disso a espécie *albicans* é a mais comumente identificada em contextos clínicos sendo uma das principais causas de infecções hospitalares (NOBILE; JOHNSON, 2015). Nos dias atuais, o número de indivíduos vulneráveis à infecção por *C. albicans* aumentou pela disponibilidade de tratamentos medicamentosos contemporâneos, como antibióticos, quimioterapia e transplante de órgãos sólidos, e as espécies de *C. albicans* agora é classificada como a terceira ou quarta causa mais comum de infecção invasiva, ou seja, infecções da corrente sanguínea nos hospitais dos Estados Unidos (NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2016).

Distúrbios no pH, alterações nutricionais, diferenças nos níveis de oxigênio, doenças ou terapia imunossupressora além dos antibióticos, podem promover a proliferação excessiva de *Candida albicans* e, muitas vezes, levar a graves sintomas (LOHSE et al., 2017).

Infecções por *C. albicans* podem variar de infecções superficiais da mucosa e dérmica a infecções espalhada pela corrente sanguínea com taxas de mortalidade até acima de 40% (LOHSE et al., 2017). Tais infecções particularmente graves em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com AIDS, pacientes submetidos a quimioterapia e indivíduos recebendo terapias imunossupressoras. Além disso, indivíduos com implantes de dispositivos médicos também são suscetíveis (NOBILE; JOHNSON, 2015).

Esse fungo é capaz de invadir praticamente qualquer local do hospedeiro humano, desde tecidos e órgãos profundos até locais superficiais, mais significativamente, é um fungo adepto de aderir a cateteres e vários implantes médicos (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

As colônias de *C. albicans* são altamente estruturadas; elas contêm células em forma de levedura, células pseudo-hifais e células hifais sendo envolvidas por uma matriz extracelular (FOX; NOBILE, 2012). Além de formar biofilmes em dispositivos médicos implantados (por exemplo, cateteres, marcapassos, válvulas cardíacas, próteses articulares e dentaduras), os biofilmes de *C. albicans* também se formam nas superfícies do hospedeiro, incluindo superfícies mucosas, revestimento de células epiteliais e órgãos parenquimatosos (RAMAGE; MARTÍNEZ; LÓPEZ-RIBOT, 2006).

Muitos estudos científicos prévios, que ligaram os tipos celulares de *C. albicans* recém-descritos a adaptações funcionais específicas de nicho, questionaram como a colonização comensal é estabelecida pela primeira vez e como a *C. albicans* persiste por períodos longos, apesar da imunidade do hospedeiro e da competição bacteriana. Além dessas, o que controla a transição do comensalismo para a patogênese em hospedeiros vulneráveis e como a *C. albicans* consegue a ampla diversidade de nichos que encontra como comensal e patógeno, indagações descritas que ainda consistem em incertezas (XIE et al., 2013; TAO et al., 2014; PANDE; CHEN; NOBLE, 2013).

Atualmente o direcionamento é que morfologicamente, mesmo dentro do reino fúngico diverso, a *C. albicans* se destaca por sua notável plasticidade, não apenas alterna entre formas miceliais e leveduras unicelulares, muito semelhantes aos fungos dimórficos, mas esta espécie continuamente associada ao hospedeiro também alterna entre pelo menos seis morfotipos distintos do tipo levedura (NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2016).

### 3.1 Formação e desenvolvimento do biofilme da *Candida Albicans*

A maioria das infecções por *C. albicans* está associada à sua capacidade de formar biofilmes. Durante um período de 24 a 48 h o desenvolvimento de biofilme, ocorre em uma série de etapas sequenciais. Inicialmente consiste na adesão de células de levedura fúngica única ao substrato, formando base de uma camada celular de levedura (a aderência), seguindo em uma fase de proliferação celular pela superfície e filamento, as células formam projeções alongadas que continuam a crescer nas formas filamentosas hifais (etapa de iniciação). Hifas formadas é indicatório do início da formação de biofilme, logo seguido pelo acúmulo de uma matriz de polissacarídeo extracelular conforme o biofilme amadurece (maturação) (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016; NOBILE et al., 2012; TOURNU; VAN DIJCK, 2012)

Na última etapa, células de levedura não aderentes são liberadas do biofilme para o ambiente onde podem colonizar outras superfícies (etapa de dispersão), sendo que a dispersão de células associadas a biofilme possui grande significado clínico, sinalizando que as células liberadas podem iniciar a formação de novos biofilmes ou espalharem-se nos tecidos que as hospedam e assim, levando à candidemia e à doença invasiva disseminada (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

### 3..2 Biofilmes multiespécies formados entre *C. albicans* e outras espécies

Muitas infecções são de origem polimicrobiana, incluindo as da cavidade oral (por exemplo, periodontite) e ouvido (por exemplo, otite média), infecções de feridas, infecções crônicas no pulmão (por exemplo, fibrose cística), infecções do trato urinário e infecções por cateter, geralmente resultante de biofilmes polimicrobianos nos quais várias espécies de micróbios formam uma comunidade complexa e recalcitrante de células em interação (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

Houve apenas um progresso incremental na compreensão de biofilmes de duas espécies formados entre *C. albicans* e espécies bacterianas comuns que provavelmente interagem com *C. albicans* em humanos e causam infecção, embora *C. albicans* seja o patógeno fúngico mais frequentemente isolado de infecções bacterianas-fúngicas mistas, (PELEG; HOGAN; MYLONAKIS, 2010).

Foram analisadas as interações in vitro de *C. albicans* com espécies bacterianas que foram isoladas da cavidade oral, abdômen, pele e vagina. Por exemplo, várias pesquisas investigaram biofilmes de duas espécies formados entre *C. albicans* e bactérias comumente isoladas de estomatite, peritonite, cárie dentária e periodontite, como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium* e *Actinomyces viscosus* (JAROSZ et al., 2009; PETERS; NOVERSS, 2013; JACK et al., 2015).

*Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* são comumente isolados juntos em infecções pulmonares crônicas (por exemplo, fibrose cística), infecções decorrentes de cateteres, e infecções de pele (por exemplo, queimaduras). Estudos usando modelos animais indicam que a co-infecção com *C. albicans* e outras espécies bacterianas pode aumentar a virulência. Sendo que um estudo descobriu que camundongos infectados com um inóculo subletal de *P. aeruginosa* e *C. albicans* juntos apresentaram uma maior taxa de mortalidade em comparação com camundongos infectados com apenas uma das espécies (GULATI; NOBILE, 2016).

### 3.3 Implicações das interações fungo-bacterianas na infecção

Considera-se um patógeno, muito bem adaptado ao hospedeiro humano devida à infinidade de mecanismos de virulência explorados por esse fungo, *C. albicans*. A questão, portanto, é: por que na maioria da população que abriga esse fungo em suas superfícies mucosas, *C. albicans* nunca muda de ser um comensal colonizador para um patógeno invasor? Um antagonista que impede essa transição prejudicial é, obviamente, o sistema imunológico humano, dependendo do status imunológico do hospedeiro e assumindo que não existem condições imunocomprometentes subjacentes. Entretanto, uma infecção não é uma interação bidirecional simples entre *C. albicans* e o hospedeiro, e sim, inclui a interação com a multidão de outros microrganismos que colonizam as superfícies mucosas; as bactérias da microbiota, que constituem outro participante importante que influencia as infecções por fungos, por ex. inibindo um crescimento esmagador de *C. albicans* e excluindo o fungo dos nichos das mucosas (OEVER; NETEA, 2014).

No entanto, a interação entre *C. albicans* e microrganismos colocalizados nem sempre tem um efeito benéfico no hospedeiro, mas também pode resultar em uma virulência aprimorada das espécies fúngica ou bacteriana. Os lactobacilos, habitantes importantes do trato gastrointestinal e da vagina, são particularmente cruciais para antagonizar um crescimento excessivo de *C. albicans* e, assim, conferir um benefício à saúde do hospedeiro. O ácido láctico, bem como os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como acetato, propionato, butirato e isobutirato, produzidos por essas bactérias como subproduto da fermentação anaeróbica, contribuem para um pH ambiental baixo, inibindo a transição levedura para hifa de *C. albicans* (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016).

As interações de *C. albicans* com outros organismos da microflora podem ter efeitos positivos e negativos no potencial de virulência de *C. albicans*, afetando também o hospedeiro de diferentes maneiras. O enorme impacto dessas interações entre países no resultado de uma infecção fúngica demonstra a importância de uma microbiota saudável. Também explica como um distúrbio nesse ecossistema bem equilibrado, por exemplo, via antibioticoterapia, a alta ingestão de carboidratos ou uma nutrição desequilibrada, que resulta em um desequilíbrio entre bactérias e fungos comensais, podem ter consequências maciças para a saúde humana (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016).

### 3.4 Incidência

A incidência de candidíase é a mais alta em unidades de terapia intensiva (UTI) entre os pacientes internados em hospitais, sendo responsável por até 15% de todas as infecções nosocomiais. Foi relatado que cerca de 33% a 55% de todos os casos de candidemia ocorrem na UTI, com taxas de mortalidade variando de 5% a 71%. A *C. albicans* é a espécie predominante que causa candidemia em pacientes de UTI no Reino Unido. Além disso, *C. albicans* é responsável por 79,4% das candidaemias e a candidemia nas UTIs está associada ao aumento dos custos hospitalares totais e ao tempo de permanência do paciente no ambiente hospitalar (CHIN et al., 2016) (DADAR et al., 2018)

### 3.5 O trato gastrointestinal

Acredita-se que as infecções por *C. albicans* se disseminem a partir do trato gastrointestinal, em alguns indivíduos suscetíveis, essa hipótese é apoiada por dados obtidos de estudos em modelos de pacientes e animais. O que constitui a primeira linha de defesa contra o desenvolvimento de uma infecção por *C. albicans* no intestino é a formação de uma barreira rígida por células epiteliais intestinais humanas (CEIH). A permeabilidade da barreira intestinal sendo regulada por proteínas e microrganismos de junção encontrados no trato gastrointestinal, já a estabilidade do tecido epitelial intestinal é determinada por junções aderentes com caderinas-E. *C. albicans* interage com as CEIH por vários eventos, incluindo adesão, invasão, dano e apoptose por *C. albicans* (MOYES et al., 2016). As adesinas produzidas pelas hifas fúngicas desempenham um papel crucial no processo de infecção fúngica e sua patogênese resultante (TONG; TANG, 2016).

Sendo os danos às células epiteliais o mais importante resultado patogênico de uma infecção intestinal por *C. albicans* dada às alterações causadas na integridade e permeabilidade da barreira intestinal, danificando diretamente as membranas epiteliais (MOYES et al., 2016).

### 3.6 Candidíase vaginal

Estando presente na microbiota vaginal normal a *C. albicans* é também comumente encontrada na pele, em mucosas e no trato gastrointestinal. *In vitro*, as espécies de *C. albicans*, têm desenvolvimento em meio aeróbico, possuem coloração creme, em temperatura entre 20°C e 38°C e pH entre 2,5 – 7,5. Uma quebra da homeostase desse meio, por fatores hormonais, patológicos ou depressão do sistema imune, desencadeia proliferação desordenadamente, gerando a infecção. A infecção denominada candidíase é causada por fungos de diversas espécies, mas a cepa mais encontrada nessa infecção é a *C. albicans* que é diagnosticada em cerca de 90% dos casos (CARDOSO; COSTA; COSTA, 2017; BARBOSA et al., 2012).

O tecido cutâneo perianal e o reto apresentam a *C. albicans* como principal fonte de infecção, devido a sua colonização. A contaminação a partir do trato digestivo ocorre em decorrência à proximidade do ânus e da vagina, podendo desencadear com facilidade episódios de candidíase vaginal, ocasionando infecções recorrentes (ROCHA et al., 2007)

Possivelmente, 75% das mulheres em idade fértil, poderão apresentar ao menos um episódio de candidíase no decorrer da vida adulta, sendo que 5% delas terão candidíase de repetição por diversos fatores (CARDOSO; COSTA; COSTA, 2017). A infecção fúngica de repetição afeta a saúde em aspectos físicos e emocionais do indivíduo, também interfere negativamente nos relacionamentos conjugais e sexuais (MARTINEZ, R.C.R., 2008).

Durante a gestação, a suscetibilidade à infecção fúngica é maior devido à *C. albicans*, é estimado que de 70 a 85% das gestantes colonizadas pelo fungo contaminem seus bebês no momento do parto e em torno de 22 a 24% a adquirem de forma oral (MARTINEZ, 2008).

### 3.7 Interação da microbiota oral com a *C. albicans*

A cavidade bucal abriga um microbioma complexo que consiste em bactérias e fungos, e como comunidade, eles influenciam o crescimento um do outro (KROM et al., 2014; OEVER; NETEA, 2014). A *C. albicans* forma biofilmes polimicrobianos com muitas bactérias orais, incluindo as espécies *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, além de estreptococos orais. Essas bactérias podem ter influências sinérgicas ou antagônicas sobre *C. albicans* por vários mecanismos, como promover a coadesão para aumentar a biomassa de biofilme, liberar moléculas e metabólitos com detecção de quórum para reduzir o crescimento de fungos, afetar a expressão gênica relacionada à virulência e modular as respostas inflamatórias imunológicas da mucosa (OEVER; NETEA, 2014; XU et al., 2014).

Sabe-se que *C. albicans* se coagrega consigo mesma e com outras bactérias orais através da expressão de adesinas da superfície celular, particularmente as proteínas de sequência do tipo aglutinina (KLOTZ et al., 2007), permitindo que *C. albicans* e seus parceiros bacterianos cresçam com mais eficiência. Verificou-se que os estreptococos do grupo viridans (incluindo *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis*) apresentaram colonização e formação de biofilme aumentadas na presença de *C. albicans*, enquanto *C. albicans* invadiu a mucosa oral com mais eficiência na presença de *S. oralis* (DIAZ et al., 2012), provavelmente resultado da indução de hifas, o que contribui para a invasão tecidual.

A coinfeção de *C. albicans* com estreptococos também aumentou a gravidade e a frequência das lesões por candidíase oral e foi mediada em parte pela amplificação das respostas inflamatórias da mucosa - especificamente, resultado de uma sinalização aprimorada através do receptor Toll-like 2, resultando na amplificação da resposta neutrofílica (XU et al., 2014).

Além disso, *S. gordonii* promoveu a formação de hifas de *C. albicans* quando ambas as espécies estavam presentes em um biofilme misto, e foi mediado pelo autoindutor da molécula de sinalização interespecies 2, que potencialmente reprime a inibição de hifas mediada por farnesol (BAMFORD et al., 2009).

Curiosamente, o uso de antibióticos de amplo espectro é um fator que provavelmente predispõe um hospedeiro imunologicamente competente à candidíase oral (SOYSA et al., 2008; YANG et al., 2010), ressaltando o papel antagônico de algumas bactérias comensais na proliferação de *C. albicans* na cavidade oral.

No entanto, existe uma lacuna em nosso conhecimento sobre essa relação no ambiente oral, pois a maioria dos dados sobre comensais humanos que impedem a infecção por *C. albicans* são de nichos não orais, incluindo vagina, trato respiratório e intestino. Por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno das vias aéreas humanas que também é uma bactéria transitória na cavidade oral, demonstrou matar hifas de *C. albicans* e impedir a formação de hifas pela secreção de uma molécula sensível ao quórum, 3-oxo-C12 lactona homoserina (HOGAN et al., 2004). Demonstrou-se que os lactobacilos vaginais inibem o crescimento de *C. albicans* pela produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bem como diminuindo o pH e a produção de ácidos graxos de cadeia curta para impedir a transição do fermento para a hifa (OEVER; NETEA, 2014).

Além disso, existem evidências de modelos intestinais murinos de que as bactérias induzem imunidade à mucosa para fortalecer a barreira epitelial e impedir a invasão de tecidos por *C. albicans* (OEVER; NETEA, 2014). Isso é amplamente mediado por ácidos graxos de cadeia curta secretados por bactérias que, por sua vez, induzem a produção de cathelicidin LL-37 (pelas células epiteliais intestinais), um peptídeo antimicrobiano com papel na manutenção da integridade epitelial (OEVER; NETEA, 2014).

### 3.8 O trato respiratório

A pneumonia por *C. albicans* em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos é rara, no entanto, as implicações clínicas do isolamento de *C. albicans* do trato respiratório, principalmente em pacientes imunodeficientes, não devem ser subestimadas no que diz respeito ao aumento da morbimortalidade nessa população em particular (PENDLETON et al., 2018).

O fungo *C. albicans* é considerado um membro do microbioma oral e gastrointestinal humano normal; no entanto, a menor colonização do trato respiratório em pacientes imunocompetentes ventilados mecanicamente tem sido associada de forma independente a maior duração da ventilação mecânica, aumento do risco de pneumonia associada à ventilação mecânica e aumento do tempo de internamento na UTI e internação hospitalar. Já foi relatado na literatura, casos de pacientes imunocomprometidos com aumento da mortalidade por colonização do trato respiratório (PENDLETON et al., 2018).

A candidíase pulmonar é um tipo de infecção pulmonar e do trato brônquico, secreções respiratórias, como esfregaço e cultura de escarro, são os principais métodos para detectar microrganismos patogênicos em infecções respiratórias. No entanto, devido ao fato de as vias aéreas estarem conectadas ao mundo exterior, o que favorece a poluição e os patógenos oportunistas, ainda é controverso se os *C. albicans* detectados nas secreções das vias aéreas necessitam de tratamento. Alguns pesquisadores propuseram que, devido ao fato de *C. albicans* colonizar no trato respiratório superior de pessoas saudáveis e também haver a possibilidade de contaminação, o tratamento aumenta a carga econômica para os pacientes e possivelmente induz a geração de cepas resistentes a medicamentos. Em 2009, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América atualizou as Diretrizes de Prática Clínica para o Manejo da Candidíase e afirmou que *C. albicans* isolada das secreções respiratórias nem sempre indica candidíase invasiva nem indica a necessidade de terapia antifúngica (XU et al., 2014).

### 3.9 A imunidade da pele frente a *C. albicans*

A *C. albicans* coloniza naturalmente a pele, em circunstâncias normais, o fungo não causa doença, mas a ausência de mecanismos adequados de reconhecimento e resposta imune pode levar à incapacidade de controlar a colonização e invasão de *C. albicans*. A candidíase mucocutânea crônica (CMC) por exemplo, é uma condição rara e não fatal que ocorre no cenário de imunodeficiências primárias e adquiridas, resultando em candidíase orofaríngea (CO) ou lesões cutâneas e mucosas superficiais com espessamento, hiperqueratose e eritema da pele ou do leito ungueal (KASHEM; KAPLAN, 2016).

O sequenciamento genômico de pacientes com CMC e HIV negativo identificou muitos genes que são cruciais para a defesa do hospedeiro contra *C. albicans*. Estudos subsequentes definiram ainda a importância de eventos específicos de receptores de reconhecimento de padrões, células dendríticas, citocinas e sinalização de células T na imunidade contra *C. albicans* com o tema comum de defeitos na interleucina17 inata e/ou adaptativa (IL-17) (KASHEM; KAPLAN, 2016).

Além de infecções em superfícies de barreira, a *C. albicans* também é a principal causa de infecções fatais da corrente sanguínea por fungos. Pensa-se que o aumento da taxa resulta do aumento do uso de agentes imunossupressores, tratamentos antineoplásicos, aumento da resistência antimicrobiana e da frequência de cirurgias invasivas. As suscetibilidades genéticas associadas à candidíase sistêmica, bem como às infecções dos órgãos reprodutivos gastrointestinal e feminino, diferem significativamente daquelas associadas ao CMC. Ao contrário dos pacientes com CMC, que apresentam defeitos na imunidade do tipo 3, os defeitos genéticos a montante ou a jusante da IL-17 não foram implicados em pacientes com candidíase disseminada. Em vez disso, demonstrou-se que os interferons do tipo I (IFNs) desempenham um papel importante em pacientes com infecções sistêmicas. Nos ratos, a IL-17 desempenha um papel na candidíase, mas o IFN- $\gamma$  das células auxiliares T tipo 1 (Th1) e natural killer (NK) tem sido recentemente apreciado como atores-chave na resposta do hospedeiro.

A suscetibilidade à candidíase gastrointestinal e vulvovaginal é amplamente ditada por fatores microambientais, como nutrientes locais, pH, ácidos biliares e flora comensal local. A resposta do hospedeiro à infecção por *C. albicans* em outros tecidos que não a pele foi recentemente revisada em profundidade ((KASHEM; KAPLAN, 2016).

### 3.10 O trato urinário e sua interação com a *C. albicans*

Anatomicamente, as infecções do trato urinário (ITU) - causadas por fungos ou bactérias - são categorizadas em duas seções (infecções do trato inferior e superior) que podem ocorrer de formas assintomáticas ou sintomáticas (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2015).

De acordo com inúmeras investigações, as espécies de *C. albicans* e, em particular, *C. albicans* são os fungos patogênicos oportunistas mais notáveis que causam infecções do trato urinário nosocomiais. Além disso, eles colonizam no lado externo da abertura uretral em mulheres saudáveis e na pré-menopausa (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2015).

A presença de espécies de *C. albicans* na urina é conhecida como candidúria ou simplesmente infecção fúngica urinária, que pode ocorrer em ITU assintomáticas e sintomáticas. Apesar da alta taxa de morbidade em ITUs causada por *C. albicans*, a mortalidade é baixa. No entanto, a taxa de mortalidade em pacientes com candidíase sistêmica e AIDS é alta (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2015).

### 3.11 A *C. albicans* e os fatores de virulência para ITU

A infecção por *C. albicans* é a maior causa de ITUs nosocomiais fúngicas em todo o mundo. A flexibilidade da forma, como na alternância entre levedura e formas filamentosas, é um dos fatores patogênicos mais conhecidos no fungo dimórfico *C. albicans*. Além disso, existem vários atributos, como adesão, invasão, descarga de enzimas hidrolíticas, estereotropismo e formação de biofilme, que são absolutamente considerados como mecanismos patogênicos pertencentes a *C. albicans* (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2015).

### 3.12 O polimorfismo da *C. albicans* e sua relação com as ITUs

A morfologia de *C. albicans* determina a estratégia de colonização e infecção por fungos. As três formas de *C. albicans* incluem a forma esferóide-ovóide de levedura de célula unicelular, pseudo-hifas septadas soltas com aparência elipsóide alongada das divisões das hifas, bem como as hifas verdadeiras septadas. De acordo com relatos registrados, as células de levedura e as hifas verdadeiras contribuíram diretamente para a evolução da candidíase à ITU e a forma pseudo-hifal de *C. albicans* é conhecida como construção de troca do fungo em condições *in vivo*. Portanto, uma via evolutiva morfológica óbvia é vista no ciclo de vida de *C. albicans*, a forma filamentosa de *C. albicans* é uma morfologia invasiva do fungo que é observada em tecidos sólidos, como os rins, e é capaz de produzir uma enorme quantidade de proteases. Essas enzimas são capazes de hidrolisar, interromper e progredir nos tecidos do hospedeiro a uma taxa acelerada. Por outro lado, a forma de levedura de *C. albicans* com leve capacidade de invasão é uma morfologia patogênica eficaz para disseminar em diferentes partes das membranas mucosas e estruturas em forma líquida do hospedeiro (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2015).

### 3.13 Candidúria

A presença de *C. albicans* na urina é conhecida como candidúria. A candidúria é categorizada em formas assintomáticas (em pessoas ou pacientes saudáveis) e em formas sintomáticas. A candidúria sintomática é observada em pacientes com cistite, epididimorquite, prostatite pielonefrite e candidíase renal. No entanto, a candidúria assintomática é principalmente benigna e não é contada como uma doença definida. *C. albicans* é um dos agentes fúngicos mais importantes que podem levar à candidúria (20% das infecções nosocomiais). Uma ampla gama de dados relatados mostra que *C. albicans* ocupa a primeira posição por causar candidúria entre mais de 200 espécies de *C. albicans*. A candidúria sintomática é normalmente observada em pacientes internados e a candidúria assintomática é observada principalmente em pacientes ambulatoriais e saudáveis. A prevalência de candidúria e a taxa de mortalidade entre pacientes internados em UTI é absolutamente mais alto (BEHZADI; BEHZADI; RANJBAR, 2015).

Um estudo demonstrou que o uso de cateter urinário em ratos desenvolveu a formação de biofilme de *C. albicans* no trato urinário do animal, além disso, dado o fluxo fisiológico do cateter, experimentos como este, podem ser ideais para testes pré-clínicos de cateteres com anti-infecciosos impregnados ou aderentes à superfície (NETT et al., 2014).

**Tabela 1** - Descrição dos diferentes tratamentos para *C. albicans*:

<b>Método não convencional</b>	<b>Constatação científica</b>
Oleo de Melaleuca	Baixa evidência científica que comprove a eficácia. (POCZAPSKI et al., 2019).
<i>Lactobacillus</i>	Inibiu a atividade fúngica. (VASCONCELOS et al., 2019).
Lamiaceae	Inibiu a atividade fúngica. (FERREIRA et al., 2019).
Bignoniaceae	Inibiu a atividade fúngica. (ALMEIDA et al., 2015).
Própolis	Apresenta atividade antifúngica. (SARRA BOUCHELACHEM, 2022).
Plasma atmosférico	Apresenta atividade antifúngica. (FIGUEIRA et al., 2017).
$\alpha$ - terpinen Extrato 0,1%	Apresenta atividade antifúngica. (TONON et al., 2019).
Alizarina e Crisazina	Suprime a formação de biofilme da <i>C. albicans</i> . (MANOHARAN et al., 2017).
Hortelã-pimenta e óleo de cravo	Inibe a formação do fungo. (RAJKOWSKA et al., 2017).
Cobre (Cu)	Inibe a formação do fungo. (BALLO et al., 2017).
Isotiocianato de Alilo	Inibe a formação do fungo. (RAULT et al., 2017).
Peptídeo antimicrobiano Psd1	Comprovada ação antifúngica. (GONÇALVES et al., 2017).
Minociclina	Pode ser eficaz contra o fungo. (KURAKADO et al., 2017).
Óleo de cascarilla e óleo de helichrysum	Reduziram a virulência do fungo. (MANOHARAN et al., 2017).
Lisozima-quitosana	Ativo contra o fungo. (KAGESHIMA et al., 2017).
Sanguinarina	Inibiu o biofilme de <i>C. albicans</i> . (ZHONG et al., 2017).
Extratos de líquens por acetona	Potencial anti biofilme. (MILLOT et al., 2017).
Derivados de Tetrazol	Diminui a virulência da <i>C. albicans</i> . (LUKOWSKA-CHOJNACKA, et al., 2019).

**Tabela 2 - Interação do ozônio com microrganismos:**

Ozônio na inativação de microrganismos	Constatação científica
Biofilmes de <i>Enterococcus faecalis</i> em canais radiculares dentais	Efeito antibacteriano importante. (TUNCAY et al., 2015).
Andaimos de biomateriais implantáveis	Inativou os esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , o indicador biológico mais comum usado para validação dos processos de esterilização. (REDIGUIERI et al., 2016).
Como desinfetantes da água e do ar	A adição de ozônio no ar exerceu uma redução modesta na carga microbiana a 36 ° C, enquanto nenhum efeito foi observado a 22°C. (MARTINELLI et al., 2017).
Material semi-crítico	O uso do gás ozônio para desinfetar material semicrítico mostrou-se tecnicamente viável e extremamente promissor. (LOPES et al., 2015).
Carbono orgânico total	A combinação sinérgica de biofiltração e ozônio foi identificada como um alvo de tratamento recomendado para sistemas de reutilização de água potável nos Estados Unidos. (ARNOLD et al., 2018).
Hidrogel à base de silicone	A ozonização pode ser considerada uma alternativa válida e promissora para a esterilização de hidrogéis à base de silício para aplicações biomédicas. (GALANTE et al., 2017).
Periodontite apical	O ozônio e NaOCl/CHX não demonstraram redução bacteriana nas áreas amostradas dos canais radiculares. (KIST et al., 2016).
Inativação da <i>Legionella</i>	Foi obtida a inativação de <i>Legionella</i> com ozônio em água desionizada. (Li et al., 2018).
Cárie infantil	Eficaz para controlar a progressão das lesões de cárie. (XIMENES et al., 2017).
Andaimos de policaprolactona	O tratamento com gás ozônio pode ser uma técnica adequada para a esterilização de andaimes de polímeros significativamente danificado por outros métodos. (REDIGUIERI et al., 2017).
Materiais de impressão dentários	Foi identificado como um método eficiente de desinfecção de materiais de impressão PVS polimerizados. (CELEBI; BÜYÜKERMEN; TORLAK, 2018).
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	O ozônio aquoso levou à morte celular dos agentes infecciosos. (FENG et al., 2018).
Bactérias comuns à fibrose cística	O ozônio tem potencial como uma técnica de desinfecção fácil de usar para equipamentos respiratórios domésticos. (TOWLE et al., 2018).
Subprodutos precursores na água de piscina	Ozônio associado ao UV mostrou-se eficaz e promissor. (CHEEMA; KAARSHOLM; ANDERSEN, 2017).

Bactérias resistentes a antibióticos	A ozonização alcançou melhor desempenho sob condições de maiores concentrações de ácido húmico e menor pH. (PAK et al., 2016).
Fungos	Aumentou consideravelmente a eficácia na desinfecção de sementes. (KANG et al., 2015).
Microrganismos efluentes de águas residuais	O ozônio associado a UV e radiação ionizante mostrou-se como uma técnica alternativa econômica e eficaz para outros processos de desinfecção convencionais. (LEE et al., 2015).
Norovírus humano	O ozônio pode ser uma alternativa para a substituição do cloro como um tratamento alternativo para as sementes. (WANG; MARKLAND; KNIEL, 2015).
Vírus da Hepatite A e Norovírus Murino	O ozônio gasoso demonstrou potencial na inativação do norovírus humano em framboesas. (BRIÉ et al., 2018).
Poliovírus	O ozônio induz a inativação do poliovírus. (JI et al., 2019).
Biofilmes microbianos	Mostrou-se eficaz para reduzir o risco de contaminação cruzada na alimentícia. (MARINO et al., 2018).
Listeria monocytogenes	Mostrou redução nas bactérias envolvidas no estudo. (MURRAY et al., 2018).
Vírus entéricos	O ozônio é um desinfetante altamente eficaz para o controle de vírus em questão. (WOLF et al., 2018).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

#### 5.1.2 Cultivo das cepas e ajuste da concentração

Cepas de *Candida albicans* foram cultivadas por 24 h a 37 °C em meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid). Em seguida, foi retirada parte da massa celular de cada amostra, para posterior diluição em água destilada e a concentração ajustada para grau 2 da Escala Mc Farland (PhoenixSpec Calibrator).

**Figura 5** – Calibrador PhoenixSpec:



Fonte: BD Phoenix

**Figura 6** - Microrganismos padrão:



Microrganismos estabilizados na forma de discos em frascos com 05 discos conservados entre 2 e 8° C. ATCC 10231. Fabricante Newprov. Fonte: Do autor.

### 5.1.3 Confeção da placa controle

Nas placas utilizadas para controle, também foram semeados 10  $\mu$ L da suspensão celular de *C. albicans*, com alça calibrada, em placas de Petri de 90x10 mm, contendo meio sólido Ágar Sabourand Dextrose (Oxoid). Essas placas não foram submetidas à exposição de ozônio.

### 5.1.4 Semeadura das suspensões e exposição em câmara de ozônio

Obtendo a diluição de cada cepa, foram semeados 10  $\mu$ L de cada suspensão celular, com alça calibrada, em placas de Petri de 90x10 mm, contendo meio sólido Ágar Sabourand Dextrose (Oxoid). As placas foram imediatamente colocadas no interior de um saco plástico transparente com as tampas abertas, sendo submetidas à liberação de ozônio.

**Figura 7** - Saco plástico previamente autoclavado e insuflado por aproximadamente 8 a 10s pelo cateter do ozonizador:



Fonte: Do autor

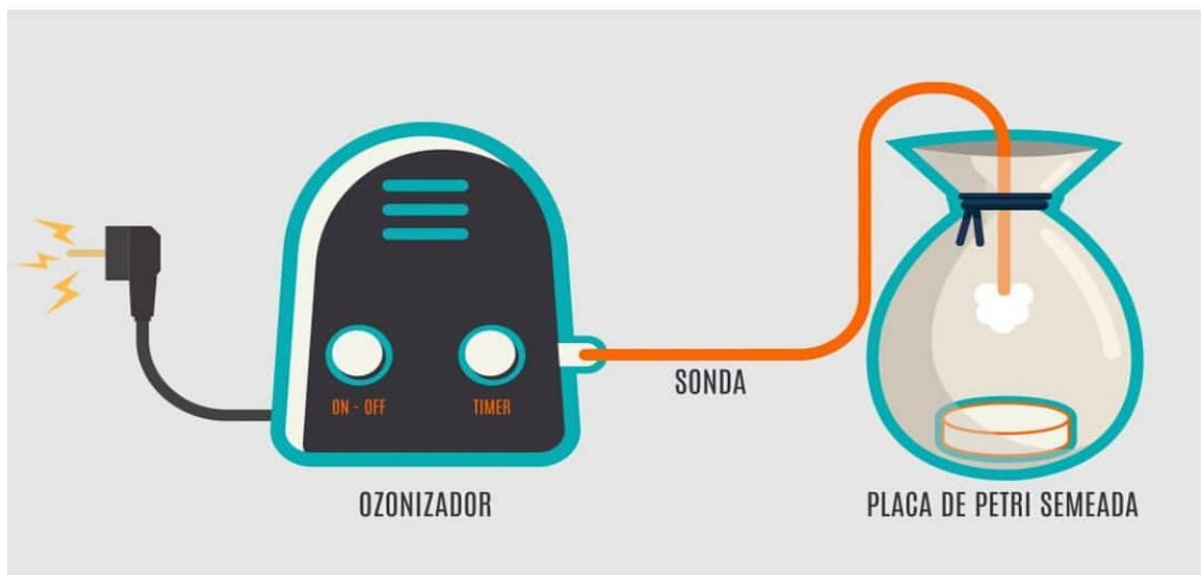
**Figura 8** - Ozonizador Vigor. Aparelho gerador doméstico; Marca vigor; Concentração: 400mg/h - 1,8 g/m<sup>3</sup>; Voltagem: 110v; Multifuncional: Ar e água.



Fonte: Do autor

As placas foram expostas dentro da câmara de ozônio por diferentes períodos: 30 s, 60 s, 150 s e 600 s (Figura 9).

**Figura 9** – Esquema de exposição das placas com *C. albicans* ao ozonizador doméstico com um saco plástico selado.



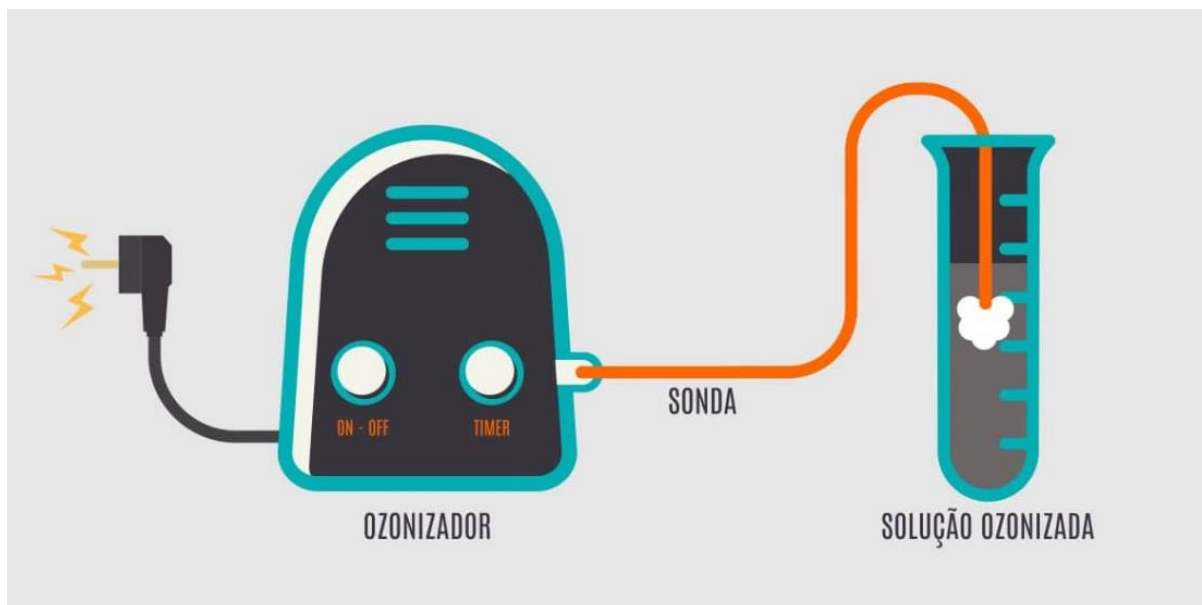
Fonte: Do autor

#### 5.1.5 Semeadura e ozonização das suspensões

Além da exposição ao ozônio pelo ar, as cepas também foram expostas em meio líquido. Imediatamente após ajustada a concentração da suspensão celular de *C. albicans* para índice 2 de Mc Farland, as suspensões de *C. albicans* foram ozonizadas (Figura 2).

Em um tubo de ensaio com 10ml contendo a suspensão celular, ocorreu a ozonização da suspensão de *C. albicans*, com o uso de uma cânula nasogástrica de fino calibre. A ozonização ocorreu durante 30 s e 60 s sendo observada a formação de bolhas e microbolhas em todo volume líquido da suspensão. Em seguida, foi realizado o plaqueamento das suspensões expostas utilizando 10 microlitros de cada suspensão celular, com alça calibrada, em placas de Petri de 90/10 mm, contendo meio sólido Ágar Sabourand Dextrose (Oxoid).

**Figura 10** – Esquema da solução de *C. albicans* ao ozonizador doméstico em tudo de ensaio.



Fonte: Do autor

#### 5.1.6 Cultivo das placas e contagem das UFCs

Logo após o plaqueamento, as placas foram armazenadas em estufa à 36 °C até o momento da contagem. O número de Unidades Formadoras de Colônia foi obtido entre 24 e 48 h após o plaqueamento. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos 3 vezes. O número de UFC obtido em cada placa foi comparado ao número de UFC observado na placa controle.

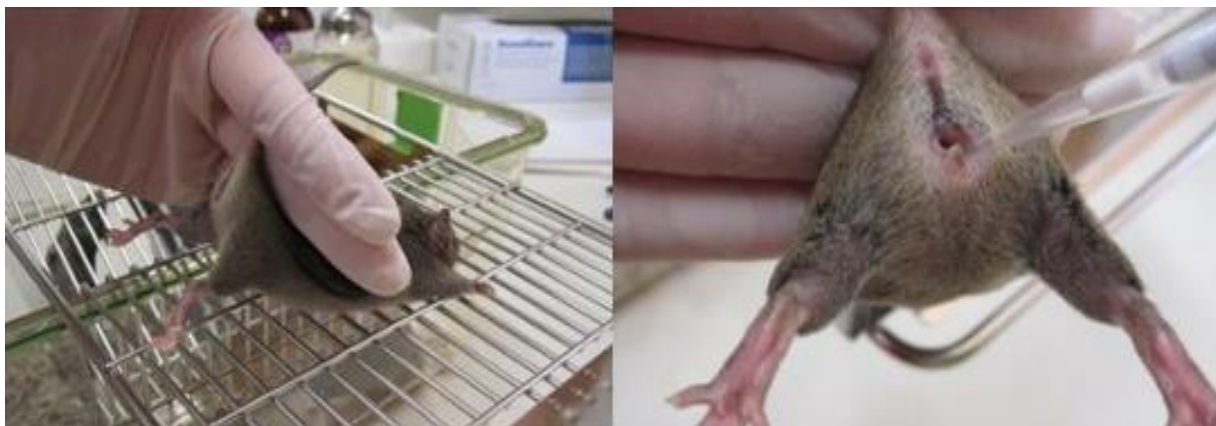
## 5.2 EXPERIMENTO *IN VIVO*

Quanto aos animais utilizados, foram camundongos C57/BL6, fêmeas, com 45 dias de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Os animais receberam dieta padrão em pellets e água *ad libidum*, foram mantidos em caixas padrão em grupo de 3 animais, ciclo de claro e escuro de 12 horas e distribuídos em 4 grupos distintos, formado por 6 animais cada.

### 5.2.2 Desenvolvimento do modelo experimental de vulvovaginite

Primeiramente a atividade ovariana das fêmeas fora suprimida com o uso de Valerato de Estradiol via oral (por gavagem) diluídos em 0.2 ml de água destilada na dose de 2mg/kg/dia durante 7 dias. Após a supressão da atividade ovariana, foi inoculada, em dose única e sob anestesia, 20  $\mu$ L de suspensão de *C. albicans* em PBS estéril, na concentração de  $10^5$  células leveduriforme de acordo com **YANO et al., (2011)**. As fêmeas de todos os grupos do experimento descrito a seguir, exceto do grupo controle, foram submetidas ao desenvolvimento do modelo (Figura 3).

**Figura 11** – Inoculação da suspensão de *C. albicans*.



Fonte: Yano et al., 2011

### 5.2.3 Distribuição dos grupos

A distribuição se dera em 4 grupos de animais: (i) **Grupo Controle Absoluto (GCA)**: Não submetidos à infecção pelo patógeno. Utilizado para controle entre todos os grupos. (ii) **Grupo Controle (GC)**: Submetidos à infecção por *C. albicans*, porém não tratados. Utilizado para a comparação entre os grupos tratados. (iii) **Grupo Ozonioterapia (GO)**: Submetidos à infecção agente patológico e tratados com ozonioterapia de uso medicinal. (iv) **Grupo Lavagem (GL)**: Submetidos à infecção e posteriormente tratados através de lavagem vaginal. Sinalizado como grupo controle para o GO.

### 5.2.4 Comprovação da infecção

Sendo realizada enfim a coleta e plaqueamento do lavado vaginal das fêmeas. Para tanto, foi introduzida solução salina estéril (20 µL) no tubo vaginal com micropipetador em seguida, removida imediatamente e semeada em placas de Petri contendo meio ASD-cloranfenicol. A solução foi incubada a 37 °C, durante 48-72 h. As infecções eram consideradas positivas se houvesse crescimento de pelo menos uma colônia de levedura na contagem individual e uma contagem média de todas as culturas a partir de cada animal fosse  $\geq 10$  UFC/ml (MARCIA *et. al.*, 2010). O mesmo procedimento foi realizado nos camundongos do GCA.

### 5.2.5 Tratamentos

Para o Grupo Ozonioterapia foi realizado o procedimento de lavagem vulvovaginal uma vez ao dia durante três dias. O procedimento deu-se com 10 mL de água destilada previamente ozonizada, para imediatamente instilação vaginal com uso de uma sonda de aspiração neonatal, número 4. A ponta da sonda foi previamente engraxada com Xylocaína em gel 2% e introduzida cuidadosamente na vagina do animal, para instilação lenta de 10 mL de água ozonizada, com o uso de uma seringa de 10 mL. No Grupo Lavagem, o mesmo procedimento foi executado, porém com água destilada, não ozonizada.

### 5.2.6 Coleta do lavado vaginal e sacrifício

Prontamente antes do sacrifício dos roedores, fora realizado o procedimento de coleta do lavado vaginal. Instilou-se 50  $\mu$ L de PBS estéril na vagina de cada animal, com o uso de um micropipetador e ponteira de 100  $\mu$ L, aspirando-se imediatamente em seguida.

Cada lavado foi plaqueado em uma placa de Petri e todas as placas foram mantidas em estufa a 35 °C para contagem de UFC após 24 h.

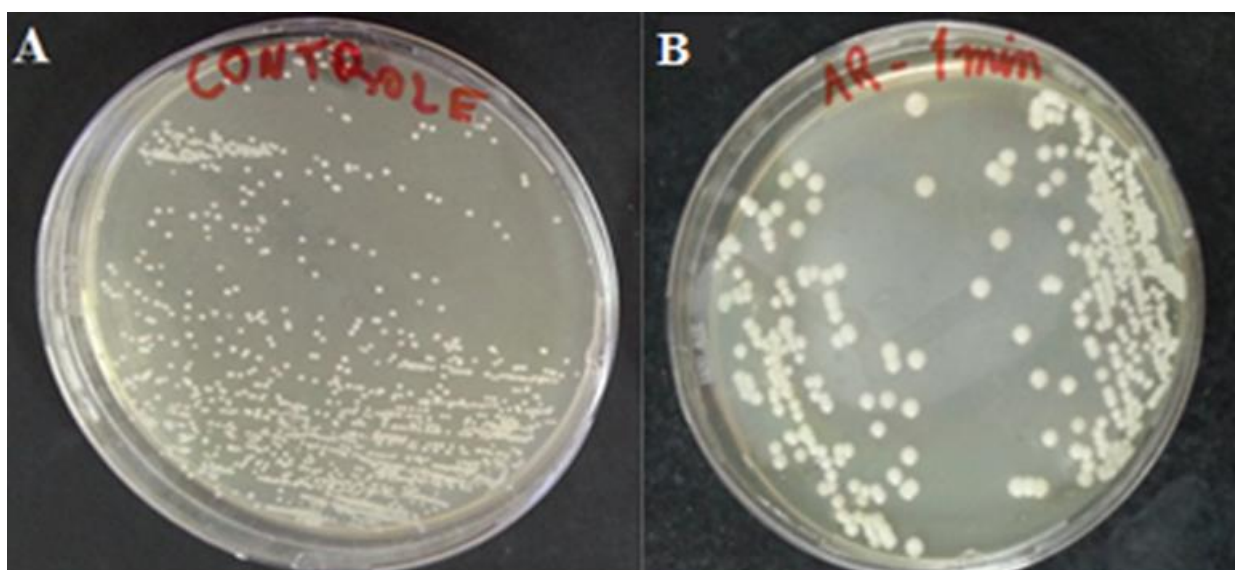
Após a coleta do aspirado vaginal, os animais foram anestesiados com 50 mg/kg de Cetamina e 10 mg/kg de Xilazina via intraperitoneal sacrificados por decapitação em guilhotina.

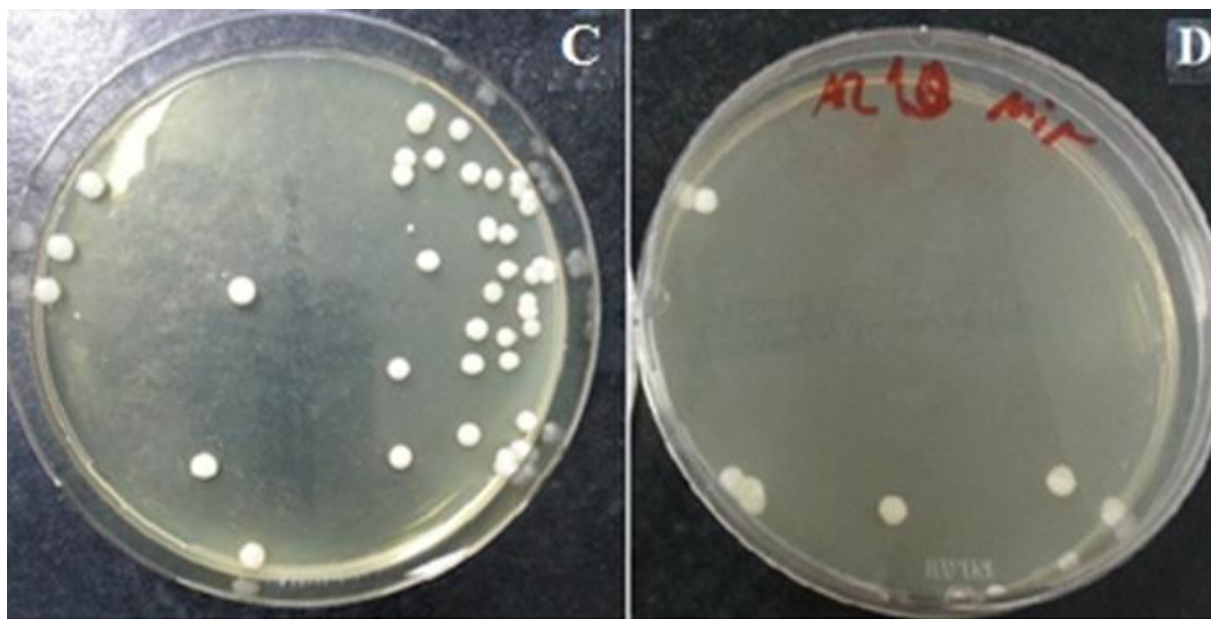
Os dados obtidos das UFC foram analisados através de estatística descritiva e analítica através do teste ANOVA, utilizando o teste de Tukey como *post hoc*, com alfa fixado em  $p > 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

A Figura 12 apresenta as imagens das placas de Petri após 24 h para o experimento *in vitro* e exposição ao ozônio na câmara. A placa controle apresentou maior quantidade de UFC (Figura 12A) quando comparada às placas expostas ao ozônio pelo ar (Figuras 12B, C e D). A exposição por 600 s demonstrou capaz de reduzir 98,89% o número de UFC quando comparado com as placas controle. O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre as médias de UFC nas placas. O teste Tukey apontou que houve diferença entre as médias das placas expostas por 60 s ou mais, quando comparadas com as placas controles ou expostas por 30 s ( $p=0,0001$ ) (Tabela 3).

**Figura 12** - Ensaio *in vitro*. Placas de Petri após 24 horas de exposição ao ozônio. A - Não tratada com ozônio; B - exposta ao ozônio por 60 s; C - exposta ao ozônio por 150 s; D - Exposta ao ozônio por 600 s.





Fonte: Do autor

**Tabela 3. Médias de UFC/ml das placas expostas ao ozônio.**

Tempo de exposição pelo ar	Média UFC/ml	Taxa crescimento (%)	Diferença (%)
Controle (não expostas)	720	100.00	-
60 s	160	22.22	- 77.78
150 s	36	5.00	- 95.00
600 s	8	1.11	- 98.89
Média	231	32.1	- 90.6
Desvio padrão	333	46.2	11.2
p Shapiro-Wilk	0.076	0.076	0.053

Percentual da taxa de crescimento celular percentual de diferença entre as médias obtidas. Os dados foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ( $p > 0.05$ ).

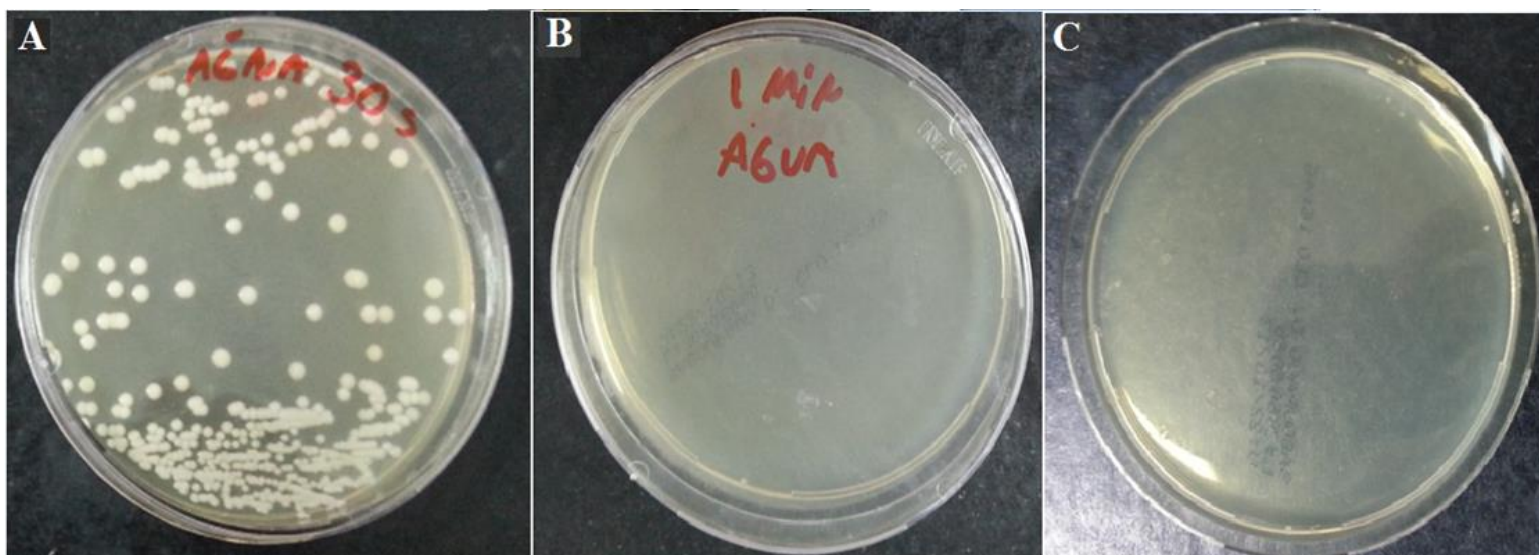
Quanto ao experimento das suspensões ozonizadas, a Figura 5 apresenta as imagens das placas de Petri após 24 h para o experimento *in vitro*. Nota-se que as suspensões ozonizadas durante 60 s (figura 5C) e 150 s (figura 5D) não apresentaram crescimento celular, obtendo-se uma diferença de 100% quando comparada com a placa controle (figura 5A). A quantidade de UFCs contadas nas suspensões ozonizadas está apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Apresentação das médias de UFC/ml das suspensões ozonizadas, percentual da taxa de crescimento celular e diferença entre as médias obtidas.

Tempo de ionização da suspensão	Média UFC/ml	Crescimento (%)	Diferença (%)
Controle (não expostas)	720	100.00	-
30 s	110	15.27	84.73
60 s	0	0	100
150 s	0	0	100
Média	208	28.8	94.9
Desvio padrão	346	48.0	8.82
p Shapiro -Wilk	0.028	0.028	0.028

Os dados foram testados quanto a distribuição de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk ( $p < 0.05$ ).

**Figura 13** - Ensaio *in vitro*. Placas de Petri após 24h de semeadura das suspensões ozonizadas. A - Tratada por 30 s; B - tratada por 60 s; C - tratada por 150 s.



Fonte: Do autor

O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre as médias de UFC nas placas. O teste Tukey apontou que houve diferença entre todas as comparações ( $p = 0,0001$ ).

Nos experimentos conduzidos *in vivo*, o número de UFC/ml encontrado foi menor no grupo tratado com ozônio. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Apresentação das médias de UFC/ml do lavado vaginal dos grupos de fêmeas do experimento, percentual da taxa de crescimento celular e percentual de diferença entre as médias obtidas.

Grupos	Média de UFC/ml	Taxa crescimento (%)	Diferença (%)
GC	356	100,00	-
GL	234	65,70	34,30
GO	49	13,76	86,24
GCA	0	0	100,00

O teste ANOVA apontou diferença estatisticamente significativa entre as médias de CFU dos grupos. O teste Tukey apontou que houve diferença entre todas as comparações ( $p=0,0001$ ).

## 7. DISCUSSÃO

Pela primeira vez foi realizado um estudo sobre o uso da ozonioterapia no modelo experimental de vulvovaginite, sendo assim a discussão segue comparativos da utilização do gás ozônio em experimentos com microrganismos relativos à aplicação onde tem similaridade de protocolos de aplicação ou resultados associados a outras técnicas para tentativas de inativação dos seres microscópicos.

Um estudo realizado por Cardoso et al. (2009), avaliou os efeitos da ozonioterapia no tratamento de feridas em pés diabéticos. O tratamento consistia em banhos com água ozonizada, seguidos de curativos com óleo ozonizado. Após 14 semanas de tratamento, os autores relataram a cicatrização completa das feridas. Traina (2008), também obteve resultados similares com a ozonioterapia em feridas dérmicas de ratos. Seus resultados mostraram redução da área da ferida, favorecimento da formação tecidual e ausência de toxicidade. Do mesmo modo, os resultados do estudo atual foram positivos no tratamento da vulvovaginite no modelo utilizado com a aplicação da ozonioterapia, apontado pela redução de 86% no número de UFC do lavado vaginal das fêmeas do grupo tratado.

Noites et al. (2014), compararam o efeito do ozônio gasoso com hipoclorito de sódio e clorexidina sobre os microrganismos *E. faecalis* e *C. albicans*. Neste estudo, o ozônio isolado, aplicado em curtos períodos de tempo (24 e 60 s), não mostrou eficácia em nenhum dos agentes antimicrobianos testados. Porém, os resultados indicaram que com a aplicação de 2% de clorexidina associada com a exposição ao ozônio gasoso, durante 24 s, ocorreu a eliminação completa de *C. albicans* e *E. faecalis*. Além disso, a exposição ao ozônio gasoso durante 180 s se mostrou significativamente mais eficaz na eliminação de *C. albicans* quando comparada a tempos mais curtos. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, sendo que a exposição da *C. albicans* ao ozônio gasoso por tempos mais longos (150 s e 600 s) foram mais eficazes na eliminação do microrganismo quando comparada à exposição durante 30 s ou 60 s.

Em 2007, Estrela et al. compararam os efeitos entre o ozônio gasoso, a água ozonizada e o hipoclorito de sódio na eficácia antimicrobiana para *Enterococcus faecalis* e não encontraram efeitos benéficos para a inativação da bactéria em questão.

Gracer e Bocci (2005) definiram que a aplicação do ozônio no local inflamado favorece a proliferação celular, síntese de matriz extracelular, normaliza o metabolismo, aumenta a quantidade de leucócitos no local e liberam fatores de crescimento, o que facilita a circulação local, estimula o reparo tecidual e a cicatrização.

Um estudo experimental *in vitro* comparou os efeitos do ar comprimido, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hélio (He) e O<sub>3</sub> sobre o crescimento bacteriano. Observou-se que não houve crescimento em 100% das cepas expostas ao ozônio, ao contrário dos demais gases, que não influenciaram no crescimento bacteriano (PEREIRA *et. al.*, 2005).

Resultados semelhantes foram obtidos na presente pesquisa, pois a ozonioterapia se mostrou capaz de reduzir significativamente o número de UFC do microrganismo em questão tanto nos ensaios *in vitro*, como *in vivo*. Somente 150 s de exposição da suspensão celular foi capaz de inibir completamente o crescimento de UFC.

Quanto aos efeitos colaterais, Oliveira (2007) observou que uma porcentagem mínima dos indivíduos submetidos ao tratamento com ozônio apresentou eczema, porém, com a redução da concentração da dose de O<sub>3</sub> os sintomas desapareceram rapidamente. Não foram encontrados na literatura relatos de demais efeitos adversos causados pela exposição ao ozônio.

O ozônio molecular ou seus produtos de decomposição (por exemplo, radical hidroxila) inativam os microrganismos rapidamente ao reagir com enzimas intracelulares, material nucleico e componentes de seu envelope celular, revestimentos de esporos ou capsídeos virais. Foi aprovado como aditivo alimentar para o tratamento, armazenamento e processamento em 2001 para Food Drug Administration KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001.

O presente estudo demonstrou a eficácia da ozonioterapia no modelo experimental usado, de modo que novos estudos são promissores a fim de estabelecer essa modalidade como terapia auxiliar no tratamento de vulvovaginite.

## 8. CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou os efeitos da ozonioterapia doméstica de forma medicinal em *C. albicans* por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* através do modelo experimental murino de vulvovaginite. Conclui-se com o estudo que o gás ozônio apresentou grande eficácia sobre a proliferação de *C. albicans in vitro*. Os melhores resultados observados foram com aplicação em meio líquido. Não obstante, a ozonioterapia foi capaz de reduzir significativamente a infecção no modelo experimental utilizado. Não foram realizados testes para observação da microbiota bacteriana vaginal, novos estudos são sugeridos para observação da viabilidade quando a não destruição da flora bacteriana vaginal.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Kélita Laine et al. ATIVIDADE INIBITÓRIA DE *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae) SOBRE *Candida albicans*. *Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres*, v. 4, n. 2, 2015.

ÁLVARES, C. A. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L.; Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ARNOLD, Mayara et al. Use of ozone-biofiltration for bulk organic removal and disinfection byproduct mitigation in potable reuse applications. *Chemosphere*, v. 202, p. 228-237, 2018.

BALLO, Myriam KS et al. Fungicidal activity of copper-sputtered flexible surfaces under dark and actinic light against azole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 174, p. 229-234, 2017.

BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Special Care in Dentistry*, Chicago, v. 21, n. 1, p. 4-8, 2001.

BAMFORD, Caroline V. et al. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infection and immunity*, v. 77, n. 9, p. 3696-3704, 2009.

BARBOSA, Cláudia et al. Anti-fungal treatment with azole compounds for uncomplicated vulvovaginal candidiasis Derivados azólicos no tratamento da Candidíase vulvovaginal não complicada. *Acta Obstet Ginecol Port*, v. 6, n. 3, p. 118-123, 2012.

BEARZATTO A.; VAIANO, F.; FRANZINI, M.. O2-o3- Therapy of nonhealing foot and leg ulcers in diabetic patients. *European Journal of Clinical Investigation*, v. 33, n. 1, p.44-46, 2003.

BEHZADI, Payam; BEHZADI, Elham; RANJBAR, Reza. Urinary tract infections and *Candida albicans*. *Central European journal of urology*, v. 68, n. 1, p. 96, 2015.

BIÇER, Şenol et al. Role of Ozone Therapy in Preventing Testicular Damage in an Experimental Cryptorchid Rat Model. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, v. 24, p. 5832, 2018.

BOATTO, H. F. et al. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 2, p. 80-84, 2007.

BOCCI, V. Ozone: A New Medical Drug. 2ª edição. Editora Springer; 2005; 295 p.

BRAIDY, Nady et al. Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: Focus on diabetes and spinal pain. *Journal of cellular physiology*, v. 233, n. 4, p. 2705-2714, 2018.

BRIÉ, Adrien et al. Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment. *Food microbiology*, v. 70, p. 1-6, 2018.

CARDOSO, C. C. et al. Ozonoterapia como tratamento adjuvante na ferida de pé diabético. *Revista Médica Minas Gerais*, Alfenas, v. 20, p. 442-445, 2010.

CARDOSO, Rhanyele Moura; COSTA, Ana Carla Marques; COSTA, Anielson Souza. Fatores de riscos e complicações associadas às vulvovaginites em gestantes. *Revista Ciência & Saberes-Facema*, v. 3, n. 2, p. 524-530, 2017.

CARRARA, M. A. et al. A new model of vaginal infection by *Candida albicans* in Rats. *Mycopathology*, v. 170, p. 331-338, 2010.

CASTRO, T. L. et. al. Mecanismos de resistência da *Candida sp wwa* antifúngicos. *Revista Infarma*, Juazeiro do Norte. v.18, n. 9-10, p. 30-35, 2006.

CELEBI, Hakki; BÜYÜKERKMEYEN, Emine Begüm; TORLAK, Emrah. Disinfection of polyvinyl siloxane impression material by gaseous ozone. *The Journal of prosthetic dentistry*, v. 120, n. 1, p. 138-143, 2018.

CHEEMA, Waqas A.; KAARSHOLM, Kamilla MS; ANDERSEN, Henrik R. Combined UV treatment and ozonation for the removal of by-product precursors in swimming pool water. *Water research*, v. 110, p. 141-149, 2017.

CHIN, Voon Kin et al. Dissecting *Candida albicans* infection from the perspective of *C. albicans* virulence and omics approaches on host-pathogen interaction: a review. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 10, p. 1643, 2016.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v.36, n.5. p. 599-607, 2003.

CORADI TONON, Caroline et al. Atividade antifúngica do  $\alpha$ -terpinen sobre *Candida albicans*. *Revista Estomatológica Hereditaria*, v. 29, n. 2, p. 107-114, 2019.

DADAR M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb Pathog.* 2018 Apr;117:128-138. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29454824.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, JOSÉ KLIDENBERG et al. Análise do efeito antifúngico da própolis sobre espécies de *Candida albicans* e não-*albicans*. *Revista uningá review*, v. 30, n. 3, 2017.

DIAO, Enjie et al. Ozone detoxification of patulin in aqueous solution and cytotoxic evaluation using human hepatic carcinoma cells. *Toxicon*, v. 155, p. 21-26, 2018.

DIAZ, Patricia I. et al. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infection and immunity*, v. 80, n. 2, p. 620-632, 2012.

ESTRELA C. et. al. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexid-ine in infected human root canals. *International Endodontic Journal*, Goiânia, v. 40, n. 2, p. 85-93, 2007.

EDMOND M.B. et. al. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases*, Iowa, v.29, p.239–244, 1999.

FALL, Cheikh et al. Sludge reduction by ozone: Insights and modeling of the dose-response effects. *Journal of environmental management*, v. 206, p. 103-112, 2018.

FENG, Lifang et al. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 28, n. 8, p. 1233-1246, 2018.

FERRAZZA M. H. S. H. et. al. Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. Maringá, v.27, n.2, p. 58-63, 2005.

FERREIRA S, et. al. Ozônioterapia no controle da infecção em cirurgia oral. *Revista Odontológica de Araçatuba*, Araçatuba, v.34, n.1, p. 36-38, 2013.

FERREIRA, José Lucas Soares et al. Comparação da atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *rhapiodon echinus* (lamiaceae) contra cepas de *candida albicans*. *Revista uningá*, v. 56, n. 3, p. 1-8, 2019.

FIGUEIRA, Fernanda Ramos et al. Ação antifúngica de um jato de plasma não-termico de hélio/ar comprimido sobre biofilmes de *candida albicans*. *Revista Univap*, v. 22, n. 40, p. 328, 2017.

FOXMAN B. et. al. *Candida* vaginitis: self-reported incidence and associated costs. *Journal of Sexually Transmitted Diseases*, v. 27, n. 4, p. 230-235, 2000.

FOX, Emily P.; NOBILE, Clarissa J. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription*, v. 3, n. 6, p. 315-322, 2012.

GALANTE, Raquel et al. Sterilization of silicone-based hydrogels for biomedical application using ozone gas: Comparison with conventional techniques. *Materials Science and Engineering: C*, v. 78, p. 389-397, 2017.

GONÇALVES, Sónia et al. Psd1 effects on *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 249, 2017.

GRACER R. I.; BOCCI V. Can the combination of localized proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process. *Medical hypotheses*. v. 65, p. 752-759, 2005.

GUDLAUGSSON, O. et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases*, Iowa, v. 37, p. 1172–1177, 2003.

GULATI, Megha; NOBILE, Clarissa J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

HOGAN, Deborah A.; VIK, Åshild; KOLTER, Roberto. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Molecular microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1212-1223, 2004.

HÖFS, Sarah; MOGAVERO, Selene; HUBE, Bernhard. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.

JACK, Alison A. et al. Streptococcus gordonii comCDE (competence) operon modulates biofilm formation with Candida albicans. *Microbiology*, v. 161, n. Pt 2, p. 411, 2015.

JAROSZ, Lucja M. et al. Streptococcus mutans competence-stimulating peptide inhibits Candida albicans hypha formation. *Eukaryotic cell*, v. 8, n. 11, p. 1658-1664, 2009.

JI, JIANG Han et al. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. *Biomedical and Environmental Sciences*, v. 32, n. 5, p. 324-333, 2019.

KAGESHIMA, Hiroki et al. Inhibition of Growth of Candida albicans by a Lysozyme-chitosan Conjugate, LYZOX and its Combination with Decanoic Acid. *Medical mycology journal*, v. 58, n. 3, p. J63-J69, 2017.

KANG, Min Ho et al. Differential inactivation of fungal spores in water and on seeds by ozone and arc discharge plasma. *PloS one*, v. 10, n. 9, p. e0139263, 2015.

KASHEM, Sakeen W.; KAPLAN, Daniel H. Skin immunity to Candida albicans. *Trends in immunology*, v. 37, n. 7, p. 440-450, 2016.

KIST, Stefan et al. Comparison of ozone gas and sodium hypochlorite/chlorhexidine two-visit disinfection protocols in treating apical periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *Clinical oral investigations*, v. 21, n. 4, p. 995-1005, 2016.

KLOTZ, Stephen A. et al. Candida albicans Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Medical Mycology*, v. 45, n. 4, p. 363-370, 2007.

KROM, B. P.; KIDWAI, S.; TEN CATE, J. M. Candida and other fungal species: forgotten players of healthy oral microbiota. *Journal of dental research*, v. 93, n. 5, p. 445-451, 2014.

KURAKADO, Sanae; TAKATORI, Kazuhiko; SUGITA, Takashi. Minocycline Inhibits Candida albicans Budded-to-Hyphal-Form Transition and Biofilm Formation. *Japanese journal of infectious diseases*, v. 70, n. 5, p. 490-494, 2017.

LEE, O.-Mi et al. A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process. *Journal of hazardous materials*, v. 295, p. 201-208, 2015.

LEITE, R. C. *Ozônio*. Corpo Mente Publicações. 1ª edição. Curitiba: Corpo Mente Publicações, 1999.

LI, Jun et al. Plasmas ozone inactivation of Legionella in deionized water and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 10, p. 9697-9707, 2018.

LOHSE, Matthew B. et al. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2017.

LOPES, M. S. et al. Disinfection of corrugated tubing by ozone and ultrasound in mechanically ventilated tracheostomized patients. *Journal of Hospital Infection*, v. 90, n. 4, p. 304-309, 2015.

LUKOWSKA-CHOJNACKA, Edyta et al. Synthesis of tetrazole derivatives bearing pyrrolidine scaffold and evaluation of their antifungal activity against *Candida albicans*. *European journal of medicinal chemistry*, v. 164, p. 106-120, 2019.

MANOHARAN, Ranjith Kumar et al. Alizarin and chrysazin inhibit biofilm and hyphal formation by *Candida albicans*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 7, p. 447, 2017.

MANOHARAN, Ranjith Kumar et al. Inhibitory effects of the essential oils  $\alpha$ -longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans*. *Biofouling*, v. 33, n. 2, p. 143-155, 2017.

MARINO, Marilena et al. Inactivation of foodborne bacteria biofilms by aqueous and gaseous ozone. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 2024, 2018.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ G. et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology, Cuba*, v.523, n.1-3, p. 151-161, 2005.

MARTINEZ, Rafael Chacon Ruiz. Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas. Tese de Doutorado. *Universidade de São Paulo*.

MARTINELLI, Mauro et al. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. *Journal of preventive medicine and hygiene*, v. 58, n. 1, p. E48, 2017.

MILLOT, Marion et al. Antifungal and anti-biofilm activities of acetone lichen extracts against *Candida albicans*. *Molecules*, v. 22, n. 4, p. 651, 2017.

MOYES, David L. et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, v. 532, n. 7597, p. 64, 2016.

MURRAY, K. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on and within apples destined for caramel apple production by using sequential forced air ozone gas followed by a continuous advanced oxidative process treatment. *Journal of food protection*, v. 81, n. 3, p. 357-364, 2018.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Revista Microbiology and Molecular Biology*, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NAGLIK, Julian R.; GAFFEN, Sarah L.; HUBE, Bernhard. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. *Current opinion in microbiology*, v. 52, p. 100-109, 2019.

NETO, A. V.; NICODEMO, A. C.; LOPES, H. V.; *Antibióticos na prática clínica*. 6ª ed. São Paulo: Sarvier Editora; 2007.

NETT, Jeniel E. et al. Rat indwelling urinary catheter model of *Candida albicans* biofilm infection. *Infection and immunity*, v. 82, n. 12, p. 4931-4940, 2014.

NETO, RIBEIRO; PEREIRA, Martinho. Efeito de *Candida albicans* sobre a polarização de macrófagos. 2017.

NOBILE, Clarissa J. et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, v. 148, n. 1-2, p. 126-138, 2012.

NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual review of microbiology*, v. 69, p. 71-92, 2015.

NOBLE, Suzanne M.; GIANETTI, Brittany A.; WITCHLEY, Jessica N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 2, p. 96, 2016.

NOITES, R. et al. Synergistic Antimicrobial Action of Chlorhexidine and Ozone in Endodontic Treatment. *Revista BioMed Research International*, v. 2014, p. Article ID 592423, 6 pages, 2014.

OEVER, Jaap ten; NETEA, Mihai G. The bacteriome–mycobiome interaction and antifungal host defense. *European journal of immunology*, v. 44, n. 11, p. 3182-3191, 2014.

OLIVEIRA, L. M. N. Utilização do ozônio através do aparelho de alta frequência no tratamento da úlcera por pressão. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, Teresina, v. 9, n. 30, p. 41-46, 2011.

PAK, Gijung et al. Comparison of antibiotic resistance removal efficiencies using ozone disinfection under different pH and suspended solids and humic substance concentrations. *Environmental science & technology*, v. 50, n. 14, p. 7590-7600, 2016.

PANDE, Kalyan; CHEN, Changbin; NOBLE, Suzanne M. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nature genetics*, v. 45, n. 9, p. 1088, 2013.

PEREIRA, M. M., et. al. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano: estudo experimental "in vitro". *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Rio de Janeiro, v.32, n. 1, p. 12-14, 2005.

PELEG, Anton Y.; HOGAN, Deborah A.; MYLONAKIS, Eleftherios. Medically important bacterial–fungal interactions. *Nature reviews microbiology*, v. 8, n. 5, p. 340, 2010.

PENDLETON, Kathryn M. et al. Respiratory Tract Colonization by *Candida* Species Portends Worse Outcomes in Immunocompromised Patients. *Clinical pulmonary medicine*, v. 25, n. 6, p. 197-201, 2018.

PETERS, Brian M.; NOVERR, Mairi C. *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infection and immunity*, v. 81, n. 6, p. 2178-2189, 2013.

POCZAPSKI, C. C. et al. Avaliação da eficácia in vitro do creme vaginal com óleo de melaleuca frente à *Candida albicans*. *Revista Renovare*, 2019.

RAJKOWSKA, Katarzyna et al. *Candida albicans* impairments induced by peppermint and clove oils at sub-inhibitory concentrations. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 6, p. 1307, 2017.

RAMAGE, Gordon; MARTÍNEZ, José Pedro; LÓPEZ-RIBOT, José Luis. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS yeast research*, v. 6, n. 7, p. 979-986, 2006.

RAUT, Jayant Shankar et al. Activity of allyl isothiocyanate and its synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *J Microbiol Biotechnol*, v. 27, n. 4, p. 685-226, 2017.

REDIGUIERI, Carolina Fracalossi et al. Ozone gas as a benign sterilization treatment for PLGA nanofiber scaffolds. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 22, n. 4, p. 338-347, 2016.

REDIGUIERI, Carolina Fracalossi et al. The effect of ozone gas sterilization on the properties and cell compatibility of electrospun polycaprolactone scaffolds. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, v. 28, n. 16, p. 1918-1934, 2017.

RIBEIRO, M. A., et. al. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Revista Mycopathologia*, Espírito Santo, v. 151, n. 1, p. 5-10, 2001.

RIBEIRO DA SILVA, Gustavo Henrique et al. UASB reactor effluent disinfection by ozone and chlorine. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 50, n. 12, p. 1215-1222, 2015.

ROCHA, MANOEL REGINALDO et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 29, n. 1, p. 3-9, 2007.

SARRA BOUCHELACHEM, Propolis characterization and antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*: A review, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 29, Issue 4, 2022, Pages 1936-1946, ISSN 1319-562X, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063>.

SOYSA, N. S.; SAMARANAYAKE, L. P.; ELLEPOLA, A. N. B. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis—a brief overview. *Oral diseases*, v. 14, n. 2, p. 138-143, 2008.

TAO, Li et al. Discovery of a “white-gray-opaque” tristable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. *PLoS biology*, v. 12, n. 4, p. e1001830, 2014.

TALUKDAR, A., et. al. Ozone Therapy – Boon to Dentistry and Medicine. *International Journal of Preventive and Clinical Dental Research*, India, v.2, n.1, p. 59-66, 2015.

TONG, Yiqing; TANG, Jianguo. *Candida albicans* infection and intestinal immunity. *Microbiological research*, v. 198, p. 27-35, 2017.

TODD, Robert T. et al. Genome plasticity in *Candida albicans* is driven by long repeat sequences. *eLife*, v. 8, p. e45954, 2019.

TOURNU, Hélène; VAN DIJCK, Patrick. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *International journal of microbiology*, v. 2012, 2012.

TOWLE, Dana et al. Ozone disinfection of home nebulizers effectively kills common cystic fibrosis bacterial pathogens. *Pediatric pulmonology*, v. 53, n. 5, p. 599-604, 2018.

TRAINA, A. A. Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na reparação tecidual de feridas dérmicas em ratos. 2008. 124 f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TSUI, Christina; KONG, Eric F.; JABRA-RIZK, Mary Ann. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS Pathogens and Disease*, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

TUNCAY, Ö. et al. Effects of ozone and photo-activated disinfection against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *Nigerian journal of clinical practice*, v. 18, n. 6, p. 814-818, 2015.

VASCONCELOS, Gabriel Lopes et al. Atividade antifúngica dos *Lactobacillus* presentes no iogurte sobre a *Candida albicans* in vitro. *Revista de Divulgação Científica Sena Aires*, v. 8, n. 3, p. 322-328, 2019.

XIE, Jing et al. White-opaque switching in natural MTL $\alpha$  isolates of *Candida albicans*: evolutionary implications for roles in host adaptation, pathogenesis, and sex. *PLoS biology*, v. 11, n. 3, p. e1001525, 2013.

XIMENES, Marcos et al. Antimicrobial activity of ozone and NaF-chlorhexidine on early childhood caries. *Brazilian oral research*, v. 31, 2017.

XU, H. et al. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cellular microbiology*, v. 16, n. 2, p. 214-231, 2014.

XU, Wen-Ming et al. The serum glucan level and pathological changes of antifungal treatment for lower respiratory tract infection of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 53, n. 2, p. 153-159, 2014.

WAINSTEIN, J., et al. Efficacy of Ozone–Oxygen Therapy for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Revista Diabetes Technology & Therapeutics*, Israel, v. 13, n.11, p. 1255-1260, 2011.

WANG, Qing; MARKLAND, Sarah; KNIEL, Kalmia E. Inactivation of human norovirus and its surrogates on alfalfa seeds by aqueous ozone. *Journal of food protection*, v. 78, n. 8, p. 1586-1591, 2015.


WOLF, Camille; VON GUNTEN, Urs; KOHN, Tamar. Kinetics of inactivation of waterborne enteric viruses by ozone. *Environmental science & technology*, v. 52, n. 4, p. 2170-2177, 2018.

YANG, Yun-Liang et al. Oropharyngeal colonization of HIV-infected outpatients in Taiwan by yeast pathogens. *Journal of clinical microbiology*, v. 48, n. 7, p. 2609-2612, 2010.

YANO, J.; FIDEL, J. R. Protocols for Vaginal Inoculation and Sample Collection in the Experimental Mouse Model of *Candida* vaginitis. *Journal of Visualized Experiments*, Louisiana, v. 58, n. 3382, p. 1-8, 2011.

ZHONG, Hua et al. Activity of sanguinarine against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 5, p. e02259-16, 2017.

## ANEXO A – Termo de aprovação do comitê de ética animal



Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

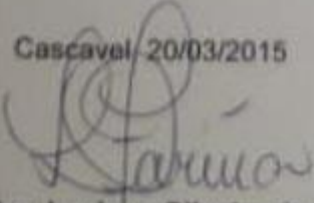
### PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Efeito da ozonioterapia no modelo experimental murino de vulvovaginite com *Candida albicans*", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

**ATENÇÃO!**

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 20/03/2015



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 2729/2014 - GRE

## Valores e custos médios relativos





UNIVERSIDADE BRASIL



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: [REDACTED]

Pesquisador: [REDACTED]

Área Temática: [REDACTED]

Versão: 1

CAAE: [REDACTED]

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE BRASIL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

Número do Parecer: [REDACTED]

Apresentação do Projeto:

[REDACTED]

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

[REDACTED]

Objetivos Específicos

[REDACTED]

- Testar a funcionalidade do software tipo aplicativo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Riscos decorrentes do estudo como: não conseguir desempenho no aplicativo devido ao usuário

Endereço: RUA CAROLINA FONSECA, 235

Bairro: ITAQUERA

CEP: 08.230-030

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2070-0167

E-mail: comite.etica.sp@universidadebrasil.edu.br

