

**UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENGENHARIA**

ESTER FICHER

**EFEITO ANTIBACTERIANO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO
EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

**ANTIBACTERIAL EFFECT OF OZONIZED SUNFLOWER OIL AT
DIFFERENT CONCENTRATIONS**

São Paulo – SP

2021

ESTER FICHER

**EFEITO ANTIBACTERIANO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO
EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Profa. Dra. Silvia Cristina Nunez
Orientadora

São Paulo – SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

F466e FICHER, Ester

Efeito antibacteriano do óleo de girassol ozonizado em diferentes concentrações / Ester Ficher. -- São Paulo: Universidade Brasil, 2021.

41 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Bioengenharia da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Silvia Cristina Nuñez.

1. Antimicrobianos. 2. Resistência microbiana. 3. Ozonoterapia. 4. Ozônio. 5. Bioengenharia. I. Nuñez, Silvia Cristina. II. Título.

CDD 620.82

TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

ESTER FICHER GAMMAL

“EFEITO ANTIBACTERIANO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Silvia Cristina Nunez (presidente-orientadora)

Prof.(a) Dr.(a) Alessandra Baptista (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof.(a) Dr.(a) Wilfredo Milquiades Irrazabal Urruchi (OZONE LIFE INDÚSTRIA E COMÉRCIO)

São Paulo, 14 de junho de 2021

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a). Silvia Cristina Nunez

Houve alteração do Título: sim () não (X):

Campus Mooca: Rua Ibiapetuba, 130 – Mooca – São Paulo - SP. Contato: (11) 2065-1000

Campus São Paulo: Rua Carolina Fonseca, 235 – Itaquera - São Paulo - SP - Cep: 08230-030. Contato: (11) 2070-0000 opção 2

Campus Descalvado: Av. Hilário da Silva Passos, 950 – Parque Universitário – Descalvado/SP – 13690-000. Contato: (19) 3593-8500

Campus Fernandópolis: Estrada Projetada F-1, s/n. Fazenda Santa Rita. Fernandópolis-SP. Contato: (17) 3465-4249

FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA UNIVERSIDADE BRASIL E CATÁLOGO DE TESES E DISSERTAÇÕES DA CAPES E REPRODUÇÃO DO TRABALHO



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respectivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "EFEITO ANTIBACTERIANO DO ÓLEO DE GIRASSOL
OZONIZADO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES"

Houve alteração do Título: sim () não (x):

Autor(es):

Discente: **Ester Ficher Gammal**

Assinatura: _____

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Silvia Cristina Nunez**

Assinatura: _____

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 14/06/2021

Campus Mooca: Rua Ibiapetuba, 130 – Mooca – São Paulo - SP. Contato: (11) 2065-1000

Campus São Paulo: Rua Carolina Fonseca, 235 – Itaquera - São Paulo - SP - Cep: 08230-030. Contato: (11) 2070-0000 opção 2

Campus Descalvado: Av. Hilário da Silva Passos, 950 – Parque Universitário – Descalvado/SP – 13690-000. Contato: (19) 3593-8500

Campus Fernandópolis: Estrada Projetada F-1, s/n. Fazenda Santa Rita. Fernandópolis-SP. Contato: (17) 3465-4249

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão que se estivessem presentes estariam muito felizes com essa conquista.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, grande mestre e presente de Deus, Silvia Cristina Nunez.

A todos os professores da Universidade Brasil que me auxiliaram na realização desse sonho.

À Valeska Bezerra, que me auxiliou imensamente na fase laboratorial da minha pesquisa.

Ao Sr. Wilfredo Irrazabal Urruchi, da empresa Ozone e Life, que gentilmente cedeu os óleos ozonizados para que a pesquisa pudesse ser realizada.

“Mulher é desdobrável. Eu sou”
(Adélia Prado).

RESUMO

O mundo enfrenta, atualmente, uma crise referente a microrganismos e resistência microbiana. A avaliação de antimicrobianos alternativos tem sido busca constante nas últimas décadas. O óleo ozonizado pode ser uma alternativa dentro dessa área. O presente estudo tem por objetivo analisar a eficácia antimicrobiana de óleo de girassol ozonizado comercialmente disponível em diferentes concentrações. Foram utilizadas duas bactérias uma gram-positiva, *Staphylococcus aureus* e a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. Os microrganismos foram cultivados em caldo BHI (*Brain and Heart Infusion*) por 24h em estufa bacteriológica a 37° C. Placas contendo ágar BHI foram preparadas para teste de halo de inibição com confecção de poço central com 6mm de diâmetro e contaminadas com 50 µL de suspensão bacteriana. Os poços feitos nas placas foram preenchidos com óleo de girassol ozonizado em concentrações variando de 80 mmol-Eq / kg, a 1290 mmol-Eq / kg. As placas foram levadas a estufa a 37°C por 24h e o halo de inibição foi medido com sonda milimetrada. Dois grupos controles, um com óleo de girassol não ozonizado e um com solução de gluconato de clorexidina a 2% foram também avaliados. Os resultados demonstraram que a eficácia do óleo de girassol ozonizado para ação antimicrobiana para *E.coli* aumenta linearmente com aumento da concentração de ozônio, porém, somente as concentrações de 702 mmol-Eq / kg (grupo5) e 1290 mmol-Eq / kg, foram significativamente diferentes em relação as menores concentrações ($p < 0,0001$). Para *S. aureus* os resultados apontaram diferenças significativas apenas na concentração de 1290 mmol-Eq / kg em relação as menores concentrações ($p = 0,0001$), mostrando que o aumento da ozonização foi ainda mais importante nas bactérias gram positivas como é o caso da *Staphylococcus aureus*. O grupo clorexidina demonstrou ter ação mais efetiva para ambos os microrganismos nas condições deste estudo ($p < 0,001$). De acordo com os resultados obtidos o óleo de girassol ozonizado tem menor efeito antimicrobiano se comparado ao gluconato de clorexidina, o resultado é dependente da concentração e somente concentrações acima de 702 mmol-Eq / kg (grupo5), apresentaram alguma eficácia, após 24 horas de incubação.

Palavras-chave: Antimicrobianos; resistência microbiana; ozonioterapia; ozônio; bioengenharia.

ABSTRACT

The world is currently facing a crisis regarding microorganisms and microbial resistance. The evaluation of alternative antimicrobial therapies has been a constant search in recent decades. Ozonized oil can be an alternative within this field. The present study aims to analyze the antimicrobial efficacy of commercially available ozonated sunflower oil in different concentrations. A gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and the gram-negative bacteria *Escherichia coli* were used. The microorganisms were grown in BHI broth (Brain and Heart Infusion) for 24h. Plates containing BHI agar were prepared for the inhibition halo test with a 3 mm diameter central well and contaminated with 50 μ L of bacterial suspension. The wells made in the plates were filled with ozonated sunflower oil in concentrations ranging from 80 mmol-Eq / kg to 1290 mmol-Eq / kg. The plates were taken to the incubator at 37°C for 24h and the inhibition zone was measured with a millimeter probe, two control groups one with non-ozonated sunflower oil and one with 2% chlorhexidine gluconate solution were also evaluated. The results demonstrated that the efficacy for *E.coli* increases linearly with increasing concentration, however, only the concentrations of 702 mmol-Eq / kg and 1290 mmol-Eq / kg were significantly different ($p < 0.004$). For *S.aureus*, the results showed significant differences only in the concentration of 1290 mmol-Eq / kg, but with a similar effect between the intermediate and higher concentrations ($p < 0.0001$). The chlorhexidine group demonstrated to have a more effective action for both microorganisms under the conditions of this study ($p < 0.001$). According to the results ozonized sunflower oil has less antimicrobial effect than chlorhexidine, the result is dependent on the concentration and only concentrations above 702 mmol-Eq / kg showed some efficacy.

Keywords: Antimicrobials; microbial resistance; ozone therapy; ozone, bioengineering.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

Este estudo tem como objetivo avaliar produto comercial destinado a controle microbiano em áreas infectadas utilizando óleo ozonizado. O trabalho faz parte do projeto: Aplicações do ozônio nas ciências da saúde, na linha de pesquisa TÉCNICAS E INSTRUMENTAÇÃO PARA A REABILITAÇÃO na área de concentração de REABILITAÇÃO. A resistência microbiana é um problema e o óleo ozonizado pode ser uma alternativa de baixo custo. O trabalho será apresentado ao público e os resultados serão repassados para empresa que colaborou com o estudo. A concentração do óleo de girassol ozonizado mostrou interferir no resultado, mas apenas concentrações mais altas apresentam ação antibacteriana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Amostras bacterianas <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	24
Figura 2 – Fluxo laminar – normas internacionais de biossegurança	25
Figura 3 – Placa de petri com ágar.....	26
Figura 4 – perfuração realizada com bisturi tipo <i>punch</i> 6mm.....	27
Figura 5 – Imagem ilustrativa da alça de Drigalski	27
Figura 6 – inoculação das bactérias nas placas para halo de inibição.....	29
Figura 7 – Distribuição do inóculo na superfície do ágar.....	29
Figura 8 – Aplicação do óleo ozonizado nos poços confeccionados na placa	30
Figura 9: Halos de inibição sendo medidos com uma sonda milimetrada.....	30
Figura 10: Gráfico representativo das medidas de halo de inibição entre os grupos para medidas realizadas com a bactéria <i>E. coli</i>	32
Figura 11: Gráfico representativo das medidas de halo de inibição entre os grupos para medidas do <i>S. aureus</i>	33
Figura 12: Controles negativos e positivos realizados para a ambos os microrganismos. Cneg Ec (controle negativo <i>E.coli</i>), C neg Sa (controle negativo <i>S. aureus</i>), CLX Ec (solução de gluconato de clorexidina a 2% <i>E. coli</i>) e CLX Sa (solução de gluconato de clorexidina a 2% <i>S. aureus</i>).	34
Figura 13 : Figura 13 - Gráfico das medianas obtidas em todos os grupos estudados. Ec= <i>E.coli</i> , As = <i>S.aureus</i> , C = controle negativo, CLX = Gluconato de clorexidina e grupos experimentais com diferentes concentrações de ozonio.]	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Números E. Coli.....	30
Tabela 2 –Números Sthafilococus.....	30
Tabela 3 – Controle.....	30
Tabela 4 – Colorexidina e bacterias.....	30
Tabela 5 - Teste de normalidade	31

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
DMA	Dynamical Mechanical Analysis
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
SUS	Sistema único de saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

V_{O_2}	Volume de oxigênio
$^{\circ}C$	Grau Celsius
K_F	Constante de capacidade de adsorção de Freundlich
pKa	Constante de dissociação
Q	Vazão
Mmol-Eq / kg	Milimol-equivalente por Kilograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

O óleo ozonizado é um potente oxidante, antiviral e antifúngico (LEZCANO, 1998). Em casos de processos de cicatrização de áreas infectadas o ozônio age acelerando a cicatrização de feridas crônicas ou em processo de cronificação (LEZCANO, 1998). Nas infecções virais, como herpes simples, por exemplo, este óleo age acelerando o processo de cicatrização, bem como no alívio da dor causada por essas infecções (DIETRICH *et al.*, 2020).

Nas infecções fúngicas de unhas, é reportado que o óleo ozonizado ajuda no processo de melhora e cura das infecções (CARVALHO, 2015). A crescente incidência de infecções bacterianas em lesões crônicas de pele é um problema mundial. Pesquisas sobre métodos terapêuticos alternativos, como a utilização de óleos vegetais ozonizados, tornaram-se promissoras (CARDOSO, 2021).

O óleo ozonizado tem sido muito utilizado no tratamento de pele, tendo em vista seus diversos benefícios reportados, tais como ação antioxidante, melhoria do transporte de oxigênio no sangue, ação antimicrobiana e efeito cicatrizante (CARVALHO, 2015). Seu uso é indicado para tratamento de cicatrizes, úlceras da pele, queimaduras de primeiro e segundo grau, herpes, psoríase e infecções de pele (CARVALHO, 2015).

A técnica, conhecida como ozonioterapia, é utilizada, atualmente, na China, Cuba e em alguns países da Europa (CARVALHO, 2015). Pesquisadores da Universidade de Passo Fundo (UPF) desenvolveram um estudo que procurou comprovar o benefício do óleo ozonizado em casos de artrose. Dentre os resultados, foi verificado que o óleo ozonizado acelera a cicatrização e diminui a inflamação e dor (BERTOL, 2019).

A ação germicida do ozônio foi demonstrada em um grupo de microrganismos, incluindo gram-positivas e gram-negativas (SKALSKA, 2009).

Conforme dito acima alguns autores apresentam resultados positivos com o emprego de óleo ozonizado, porém, não há consenso sobre concentrações de peróxidos nos óleos para obtenção de resultados antimicrobianos além da necessidade de comparação com outros métodos para entendimento do mecanismo de ação dos óleos ozonizados, *i.e.*, se há efeito direto antimicrobiano ou se a ação clínica ocorre por diferentes mecanismos. Portanto, este estudo se propõe a analisar a ação antibacteriana de diferentes concentrações de óleo de girassol ozonizado e verificar sua efetividade em relação ao gluconato de clorexidina que é um antimicrobiano tópico amplamente utilizado na área de saúde.

2 OBJETIVOS

A presente pesquisa científica tem como principal objetivo verificar o potencial antibacteriano do óleo de girassol ozonizado por diferentes tempos de ozonização/microrganismo, com concentrações de peróxidos crescentes.

Objetivos específicos:

- Testar diferentes concentrações de índice de peróxido em bactéria Gram positiva
- Testar diferentes concentrações de índice de peróxido em bactéria Gram negativa
- Analisar a eficácia do óleo de girassol ozonizado frente ao óleo de girassol não ozonizado e a solução de gluconato de clorexidina a 2%.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Sechi *et al.* (2001), analisaram a ação do óleo de girassol ozonizado (Oleozon) contra diversas bactérias, como Micobactérias, Estafilococos, Streptococos, Enterococos, Gram-positivas e Gram-negativas, as quais são resistentes a vários medicamentos. O óleo de girassol foi ozonizado no Centro de Investigações do Ozônio (CENIC, Havana, Cuba) por um gerador de ozônio, Aqozo Industrial Ozonizer (Centro de Pesquisa sobre Ozônio, Cuba). A amostra de Sechi *et al.* (2001) foi composta por diferentes cepas de ATCC, entre elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e também por cepas de bactérias isoladas de diferentes locais provenientes de pacientes (amostras clínicas). Para a avaliação as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas pelo método de diluição em ágar (SECHI *et al.*, 2001).

Na pesquisa, a CIM foi determinada como a menor concentração de óleo ozonizado de girassol inibindo o crescimento bacteriano visível após a incubação por 20 horas à 37°C. O resultado obtido na análise foi que o óleo de girassol ozonizado demonstrou atividade antimicrobiana contra todas as cepas analisadas, com uma CIM variando o volume de 1,18 a 9,5 mg/ml. A pesquisa concluiu que os resultados obtidos devem levar à criação de alguns ensaios clínicos para comparar a eficácia do óleo de girassol ozonizado com outros agentes antimicrobianos. (SECHI *et al.*, 2001).

Travagli *et al.* (2010), ensinam que o possível mecanismo pelo qual os óleos vegetais ozonizados apresentam ação antibacteriana é a oxidação de microrganismos através de uma liberação lenta de peróxidos. Skalska *et al.* (2009); Kumar *et al.* (2016), por sua vez, apontam que a ação antimicrobiana do ozônio é atribuída ainda à sua capacidade de destruir muitas das estruturas enzimáticas dos

microrganismos. Os autores apontam que cada microrganismo possui sensibilidade específica ao ozônio.

Skalska *et al.* (2009), definiram a concentração mínima de inibição (CIM) do óleo ozonizado para diversos microrganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Dessa forma, cinco óleos vegetais diferentes (óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de colza, óleo de milho e óleo de semente de uva) foram ozonizados e suas propriedades, como número de iodo, valor de peróxido, valor de acidez e viscosidade, foram comparadas. Em seguida, foi escolhido o óleo de girassol ozonizado para ser submetido a estudos microbiológicos adicionais. Os resultados sugerem que os microrganismos apresentam diversificada sensibilidade ao óleo de girassol ozonizado. A bactéria Gram-positiva *B. subtilis* apresentou-se menos resistente e as bactérias gram-negativas *E. coli* e a levedura *C. albicans* apresentaram mais resistência ao óleo de girassol ozonizado do que *B. subtilis*. Isso poderia indicar que o óleo de girassol ozonizado, tal como o ozônio gasoso, tem ação mais forte nas bactérias gram positivas do que nas bactérias gram-negativas e fungos. Tal fato está relacionado à estrutura da parede celular, no entanto, ainda não há consenso em relação a susceptibilidade aos óleos ozonizados em função da estrutura da parede celular.

Logo, percebe-se que o mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos ozonizados pode ser mais complexo. Para óleos de girassol ozonizados com valores maiores de índice de peróxidos (mais de 630 mmo-Eq/kg) foi obtido 100% de inibição do crescimento dos microrganismos estudados por Skalska e colaboradores. Os óleos vegetais ozonizados demonstraram vantagem significativa sobre o ozônio gasoso e a água ozonizada, tendo sua fácil fabricação e preservação, eles podem ser aplicados pelo próprio paciente e sua consistência gelificada facilita a aplicação local. Ademais, a fim de fornecer a eficácia necessária

da terapia tópica para a cicatrização de feridas, é importante aplicar óleo ozonizado com a dose de ozônio que excede a dose mínima para o patógeno específico (SKALSKA et. al, 2009).

Lezcano *et al.* (1998), estudaram a atividade antibacteriana do óleo ozonizado contra isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, bem como, contra as cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29229. No estudo foram utilizadas 20 cepas de *Streptococcus pyogenes*-hemolíticas pertencentes ao Grupo A de Lancefield, 21 de *Staphylococcus aureus*, 15 de *Pseudomonas aeruginosa* e 10 de *Escherichia coli*, todos isolados clínicos recentes, realizados no Hospital Militar C.J. Além das cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, utilizaram também *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Foi utilizado óleo de girassol ozonizado com um índice de peróxido de 655 mmo-Eq/kg. Nos ensaios clínicos e nas linhagens padrão, não foram encontradas diferenças significativas entre os CIMs para todas as espécies estudadas. Em relação aos resultados bactericidas, foram semelhantes para todas as linhagens analisadas sem distinção entre espécies e sem diferenças significativas entre linhagens padrão e isolados clínicos. Os autores concluíram que o óleo ozonizado se comporta como agente bactericida, capaz de produzir morte microbiana para as cepas analisadas neste trabalho, com CIM na faixa de 237 a 475 mg/mL.

No texto "*Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil*" de Díaz *et al.* (2015), temos um estudo onde óleos de oliva e girassol ozonizados foram comparados microbiologicamente. A técnica de cromatografia gás-líquido foi utilizada para analisar os efeitos da ozonização do óleo de oliva e do óleo de girassol. Para ambos os óleos, a atividade antimicrobiana foi similar.

Nota-se no estudo de Bertol (2019), que a ozonioterapia é tratada como uma técnica terapêutica empregada usualmente na medicina veterinária, devido a seu baixo custo e relativa facilidade de aplicação. Bocci *et al.* (2011) considera que a ação bioquímica do ozônio é muito rápida, haja vista a sua reatividade quando em contato com o sangue (BOCCI, 2011). Vê-se, também, que o ozônio, ao penetrar no organismo, proporciona uma melhora na oxigenação e do metabolismo, contribuindo assim para a eliminação de produtos tóxicos resultantes do catabolismo celular e para a regulação dos mecanismos de defesa imunológica, bem como do efeito imunomodulador (SILVA, 2018).

Guimarães *et al.* (2020) fizeram um estudo para avaliar a eficácia dos óleos de girassol, oliva e dendê puro e ozonizados para avaliar suas atividades antimicrobianas, na erradicação do *Sporothrix*, causador da esporotricose. Os óleos foram ozonizados por meio de um gerador de ozônio. Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), diluições seriadas dos óleos foram preparadas em placas de microdiluição com 96 poços. A seguir, acrescentados 0,05 ml da suspensão padronizada (10^6 células viáveis ml^{-1}) da linhagem de *S. schenckii*. Avaliação foi realizada após incubação a 28°C por 24h. Os óleos de girassol, foram mais eficazes no controle antimicrobiano.

Rensi *et al.* (2014) realizaram um trabalho, avaliando a eficiência dos óleos ozonizados de girassol e coco no controle *in vitro* do *Propionibacterium acnes*, o óleo ozonizado pode ser considerado como uma alternativa terapêutica para o tratamento da acne. O óleo de girassol ozonizado, apresentou melhor eficiência no controle antimicrobiano.

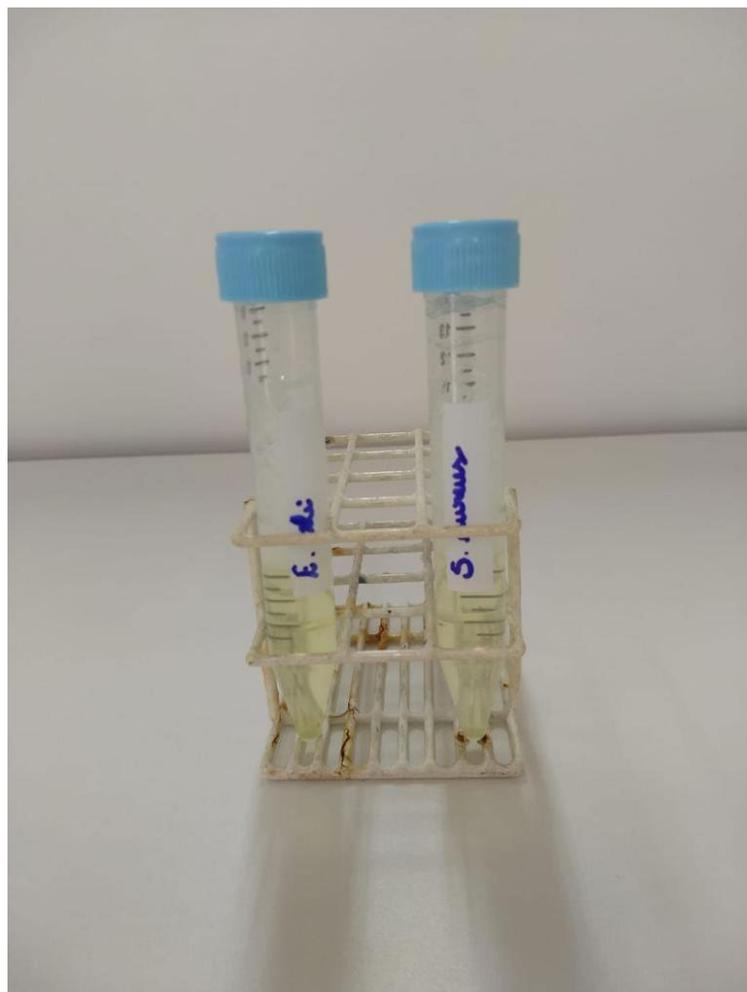
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparação do Inóculo

Foram utilizadas nesse trabalho, cepas padrão *American Type Culture Collection (ATCC)*, de *Echerichia coli ATCC 25992* e *Staphylococcus aureus ATCC 25293.*, cedidos pelo laboratório de Biofotônica do Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil (São Paulo).

Na Figura 1, vê-se as amostras bacterianas em tubos de ensaio.

Figura 1 - Amostras bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* em caldo



Fonte: própria

Ressalta-se que todos os procedimentos foram realizados seguindo as normas internacionais de biossegurança realizados em câmara própria para manuseio de microrganismos (Fig. 2).

Figura 2 - Fluxo Laminar.



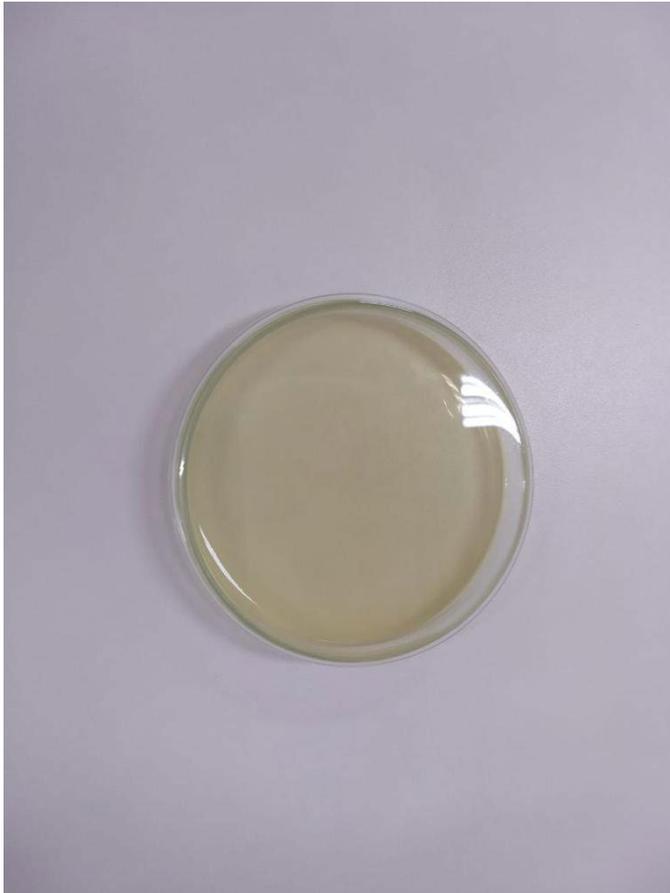
Fonte: própria

4.2 Condições do Cultivo

Os inóculos foram cultivados em caldo de Infusão Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion* – BHI – Kasvi®, Paraná, Brasil), a 37°C, por 24 horas, segundo escala de 0,5 de MC Farland, em condições de aerobiose, a concentração foi ajustada

7×10^8 UFC/ml. Placas de Petri com ágar BHI foram preparadas e após geleificação foram mantidas em temperatura ambiente para receber a inoculação bacteriana (Fig. 3).

Figura 3 – Placa de Petri com Ágar BHI preparada para realização da metodologia do halo de inibição.



Fonte: própria

4.3 Preparação do halo de inibição

Após preparação do ágar de acordo com as instruções do fabricante e imediatamente após a esterilização a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 15 minutos, o meio foi resfriado e a solução de HI foi geleificada nas placas de Petri, para garantir uma profundidade uniforme para inoculação das placas. Essas placas de Petri já com a solução de ágar, foram divididas ao meio. Em cada hemi-porção foram realizadas perfurações padronizadas de 6 mm de diâmetro e centralizadas em cada placa, totalizando dois

furos por placa. Foram colocados 50 μ L da suspensão de *Escherichia coli*, que é uma bactéria bacilar Gram negativa que se encontra normalmente no trato gastrointestinal inferior e *Staphylococcus aureus*, que é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis.

Antes da execução da perfuração (Fig. 4), que foi realizada realizada por um *punch* 6 mm de diâmetro e centralizadas em cada placa, totalizando dois furos por placa, o ágar foi contaminado com 50 μ L de suspensão bacteriana que com auxílio de alça de Drigalski (Fig. 5) foram espalhadas por toda a superfície do ágar.

Figura 4 – Confecção das amostras com perfuração realizada com bisturi tipo *punch* 6 mm realizado em cada metade da placa de Petri.



Fonte: própria

4.4 Grupos experimentais

O óleo ozonizado foi gentilmente cedido pela empresa Ozone Life, que realizou a ozonização e enviou o cálculo dos índices de peróxidos para cada amostra.

Cada bactéria foi dividida em sete grupos numerados de 0 a 6, sendo G-0 óleo de girassol não ozonizado com concentração de 9mmol-Eq/kg, lembrando que o óleo de girassol sem estar ozonizado, já é bactericida mas não o suficiente para levar a inibição dos microorganismos estudados, , G-1 óleo de girassol ozonizado retirado após 2 horas com uma concentração de 80 mmol-Eq/kg, G-2 óleo de girassol ozonizado, retirado após 4 horas, com uma concentração de 170 mmol-Eq/kg, G-3 óleo de girassol ozonizado retirado após 6 horas com uma concentração

de 308 mmol-Eq/kg, G-4 óleo de girassol ozonizado retirado após 9 horas com concentração de 444 mmol-Eq/kg, G-5 óleo de girassol ozonizado retirado após 10 horas com concentração de 702 mmol-Eq/kg, G-6 óleo de girassol retirado após 12 horas com concentração de 1290 mmol-Eq/kg, G-7 foi feita uma amostra com clorexidina 2%. As placas foram divididas ao meio e numeradas para que o processo fosse didático, sendo a primeira G-0, óleo de girassol não ozonizado e clorexidina 2% e as demais da G-1 até a G-6 onde foram colocados os óleos correspondentes, pré-selecionados para serem feitas as análises.

Os detalhes da metodologia para o halo são demonstrados nas figuras 5 e 6.

Figura 5. Imagem ilustrativa da alça de Drigalski.



Fonte: própria

Figura 6. Procedimento de inoculação das bactérias nas placas para metodologia do halo de inibição.



Fonte: própria

Figura 7. Distribuição do inóculo na superfície do ágar com auxílio de alça de Drigalski.



Fonte: própria.

Após a contaminação do ágar e aplicação das diferentes concentrações de óleo no poço central das placas (Fig. 8), elas foram levadas para a estufa por 24 horas a 37°C para permitir o crescimento bacteriano.

Figura 8. Aplicação do óleo ozonizado nos poços confeccionados na placa de ágar BHI.



Fonte: própria

Após 24h as placas foram removidas e o tamanho dos halos formados foi mensurado com auxílio de sonda metálica milimetrada, como mostrado na Fig. 9.

Figura 9. Halos de inibição sendo medidos com uma sonda milimetrada.



Fonte: própria

Por fim, menciona-se que a pesquisa se realizou em triplicata. Foram feitas três placas amostras em três dias diferentes para cada grupo experimental.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado teste de normalidade *Shapiro-Wilk* da distribuição dos dados e o resultado obtido encontra-se na tabela 1. De acordo com o resultado consideramos os dados com distribuição não normal e foi então realizado teste de *Kruskall-Wallis* seguido do teste de *Dunn's*

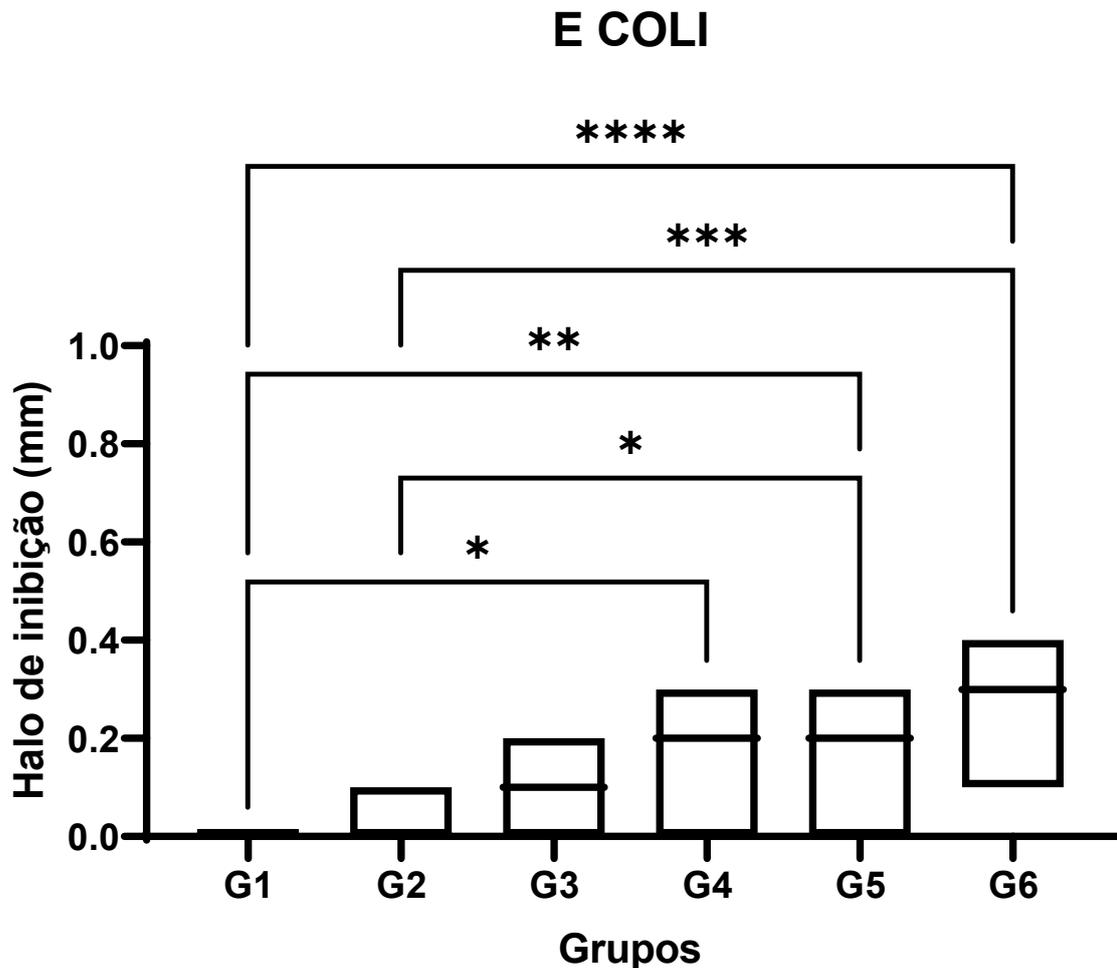
Tabela 1. Resultados do teste de normalidade dos dados Shapiro-Wilk.

Teste Shapiro-Wilk						
W calculado		0,6173	0,6931	0,9131	0,6379	0,9165
Vaor de P		0,0002	0,0012	0,3379	0,0003	0,3644
Passa no teste de normalidade (alpha=0.05)?		No	No	Yes	No	Yes
Sumário do valor de P		***	**	ns	***	ns

Fonte: própria

A Fig.10 apresenta o gráfico da mensuração do halo de inibição produzido em culturas de *E. coli* após exposição a diferentes concentrações de ozônio em óleo de girassol.

Figura 10 - Gráfico representativo das medidas de halo de inibição entre os grupos. Os dados são apresentados através da mediana de cada grupo e as barras demonstram onde foram observadas diferenças significantes entre os grupos * $p=0,0155$, ** $p=0,0011$, *** $p=0,0004$, $p<0,0001$.



Fonte: própria

Podemos observar que o efeito antimicrobiano é diretamente proporcional ao aumento da concentração do índice de peróxido. De acordo com a comparação estatística apenas as concentrações dos grupos G5 e G6 são significativamente diferentes de concentrações G1 e G2, apesar de não terem sido identificadas diferenças significantes entre G3, G4, G5 e G6.

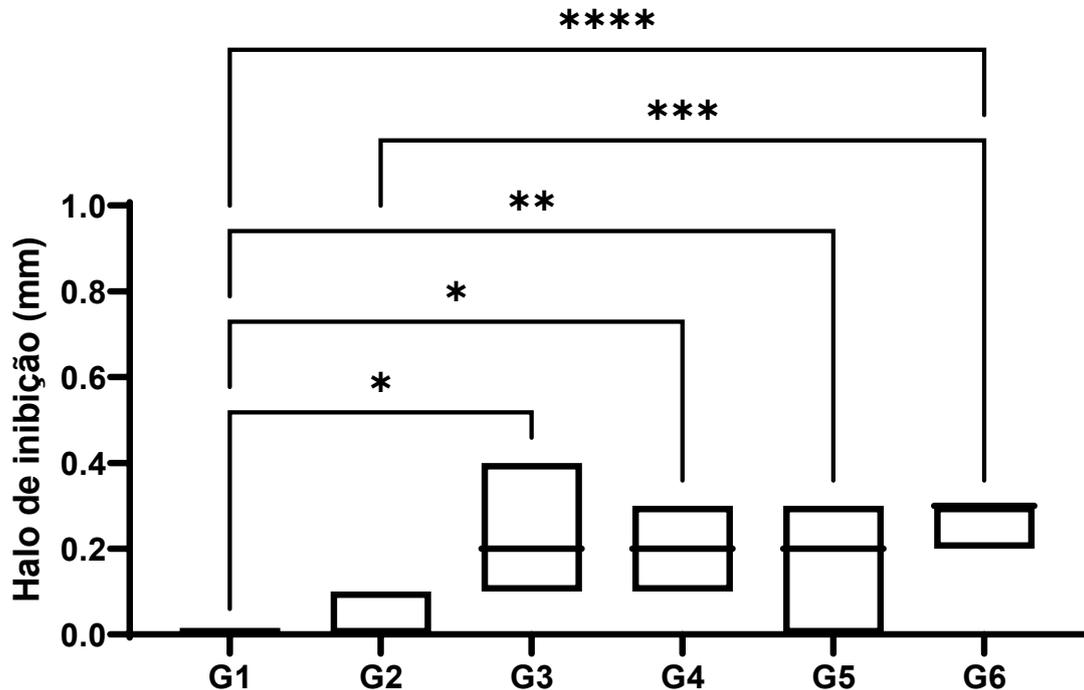
Cardoso, Santos, Cardoso e Almeida (2021), ao realizarem revisão integrativa do potencial antimicrobiano de óleos vegetais ozonizados frente a espécies bacterianas demonstraram consonância com a presente pesquisa, pois ao mensurar resultados, destacam o maior efeito antibacteriano dos óleos ozonizados com maiores concentrações de peróxidos.

No gráfico da Fig. 11 observamos o resultado obtido para o efeito antimicrobiano utilizando a bactéria Gram positiva *S. aureus*.

Figura 11 - Gráfico representativo das medidas de halo de inibição entre os grupos para medidas realizadas com a bactéria *S. aureus*. Os dados são apresentados através da mediana de cada grupo e as barras demonstram onde foram observadas diferenças significantes entre os grupos. * $p=0,0129$, ** $p=0,0042$, *** $p=0,0001$,

**** $p < 0,0001$.

S AUREUS



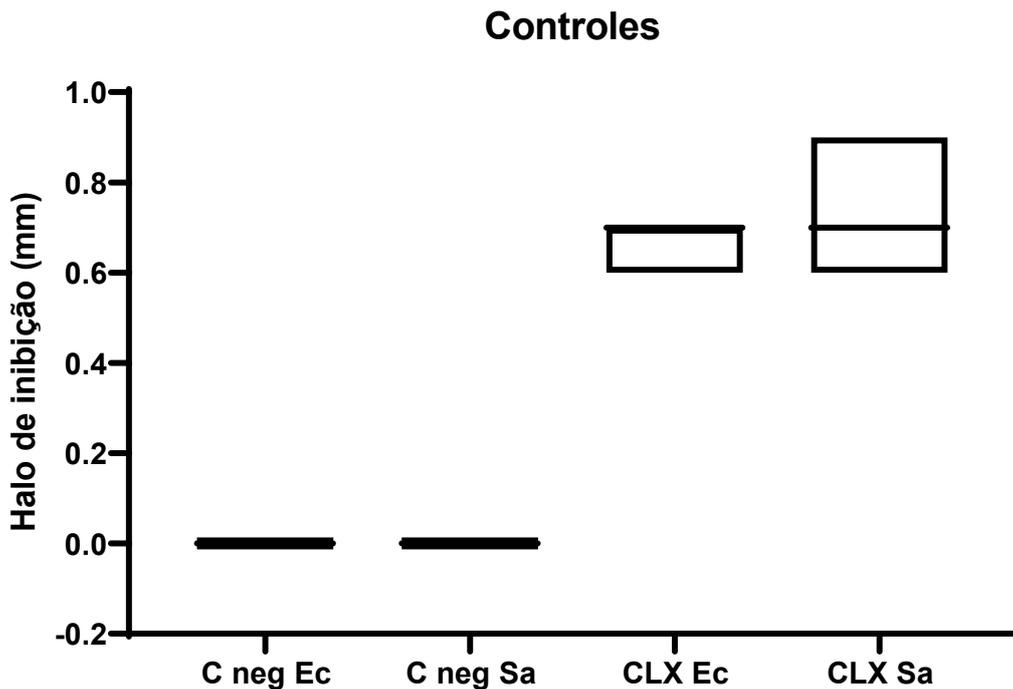
Fonte: própria

Observamos que o efeito antimicrobiano é proporcional ao aumento da concentração de índice de peróxido, porém a partir da concentração de 308mmol-Eq/kg (G3) as medianas estão muito próximas com pequena variação não significativa para a concentração de 1290 mmol-Eq/kg (G6). De acordo com a comparação estatística apenas a concentração do grupo G6 é significativamente diferente das concentrações de G1 e G2, mesmo com maior mediana de G6 não foram identificadas diferenças significantes entre G3, G4, G5 e G6.

Nesse ponto, faz-se necessário mencionar a susceptibilidade dos microrganismos em relação ao ozônio. Notou-se sobre a susceptibilidade de cada microrganismo é diferente. Ou seja, existem micro-organismo mais susceptíveis ao ozônio e outros mais resistentes, sendo necessário estudo específico para verificar a vulnerabilidade.

Com a finalidade de verificar a eficácia do óleo de girassol ozonizado frente aos controles negativos e controle positivo realizado com emprego de solução de gluconato de clorexidina a 2% os dados analisados são apresentados na Fig. 12.

Figura 12 - Controles negativos e positivos realizados para a ambos os microrganismos. Cneg Ec (controle negativo *E.coli*), C neg Sa (controle negativo *S. aureus*), CLX Ec (solução de gluconato de clorexidina a 2% *E. coli*) e CLX Sa (solução de gluconato de clorexidina a 2% *S. aureus*).



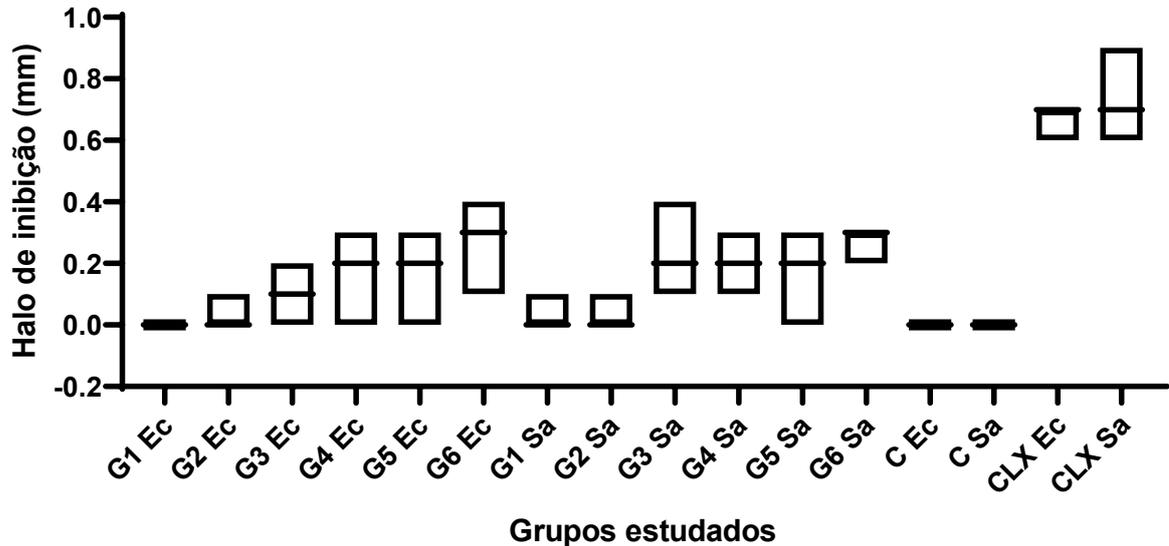
Fonte: própria

O gluconato de clorexidina é uma substância com ação antimicrobiana, eficaz no controle da proliferação de bactérias na pele e mucosas, sendo um produto muito utilizado como antisséptico na prevenção de infecções. É uma substância química com ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Segundo Hortense *et al.* (2010) a clorexidina é muito utilizada na odontologia por seu grande potencial antimicrobiano.

Na presente pesquisa, confirmando, percebeu-se que as bactérias apresentavam menor resistência ao gluconato de clorexidina, possuindo, esse

maior potencial antimicrobiano do que o óleo ozonizado conforme demonstrado na Fig. 13.

Figura 13 - Gráfico das medianas obtidas em todos os grupos estudados. Ec= *E.coli*, As = *S.aureus*, C = controle negativo, CLX = Gluconato de clorexidina e grupos experimentais com diferentes concentrações de ozônio.



Fonte: própria

Na comparação estatística entre os grupos clorexidina e a maior concentração de óleo ozonizado obtida nos grupos G6Ec e G6Sa obtemos significância estatística com valor de $p < 0,001$ nas comparações para as duas bactérias.

Diante disso, percebe-se que, assim como Diaz (2006), os óleos ozonizados foram comparados microbiologicamente. Contudo, enquanto utilizamos para o presente trabalho científico apenas o óleo de girassol ozonizado, a referida autora (DIAS, 2006) utilizou também o óleo de oliva ozonizado.

De acordo com Cardoso, Santos, Cardoso e Almeida (2021), o efeito antibacteriano dos óleos relacionou-se às condições de sua ozonização, submetidos à composição final de peróxidos, o que promove as alterações celulares e impede o crescimento bacteriano.

Segundo L. A. Sechi *et al.* (2000), o óleo de girassol ozonizado se mostrou muito eficaz em todas as bactérias por eles estudadas, a saber, *Mycobacteria*, *Staphylococci*, *Pseudomonas*, *Enterococci*, *Streptococci* e *Escherichia coli*. Nossos estudos com estas duas últimas bactérias estão em acordo com esses resultados anteriores, mostrando ação antimicrobiana quando em concentrações mais altas.

De acordo com Cardoso *et al.* (2021), o óleo de girassol ozonizado pode ser considerado uma alternativa terapêutica promissora contra infecções bacterianas. De acordo com seu estudo foi evidenciado a capacidade antibacteriana que o óleo vegetal ozonizado possui contra cepas Gram positivas e Gram negativas. Nossos resultados confirmam o apontado pelos autores.

Colombo *et al.* (2018), em seu artigo, estudaram o azeite de oliva ozonizado e o gluconato de clorexidina a 2%, para avaliar a sua citotoxicidade, o azeite ozonizado testado, mostrou-se biocompatível, enquanto os géis á base de clorexidina demonstraram maiores efeitos citotóxicos. Devido á sua citocompatibilidade, o oléo ozonizado pode ser considerado uma alternativa aos agentes antimicrobianos.

Nossos resultados não explicam os resultados clínicos positivos reportados na literatura. Além do potencial antimicrobiano direto podemos hipotetizar que o emprego de óleos ozonizados possa agir de forma múltipla em uma situação clínica. Neste contexto Xiao e colaboradores (XIAO *et al.* 2017) realizaram estudo para compreender os mecanismos de sinalização celular envolvidos no processo de cicatrização de lesões de pele tratadas com óleo ozonizado. No estudo destes autores foi observado pelo ensaio de *Western blotting* que o óleo de ozônio aumentou a fosforilação de PI3K, Akt e mTOR para regular o processo de TME (transição celular mesenquimal - epitelial), enquanto a inibição de PI3K reverteu

esse efeito do óleo de ozônio. No mesmo estudo os resultados do *Cytometric Bead Array* demonstraram que o óleo de ozônio diminuiu significativamente a inflamação nos fibroblastos. Os resultados demonstraram que o óleo de ozônio facilitou a cicatrização de feridas por meio do aumento da migração de fibroblastos e do processo TME por meio da via de sinalização PI3K / Akt / mTOR in vivo e in vitro. Os mecanismos celulares e moleculares reportados, segundo os autores, podem fornecer novos alvos terapêuticos para o tratamento de lesões cutâneas.

Os resultados obtidos nesse estudo devem conduzir a investigações mais aprofundadas tanto em ensaios clínicos, como em termos de mecanismo de ação, afim de, avaliar possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos clínicos do ozônio, bem como, dos óleos ozonizados.

6- CONCLUSÃO

Concluiu-se, com o presente trabalho, o efeito do óleo ozonizado como antimicrobiano, contudo, o resultado vinculou-se com sua concentração do índice de peróxido. Logo, nos óleos mais concentrados obtêm-se maior função antimicrobiana. Além disso, cabe-se mencionar que os resultados obtidos com o óleo ozonizado foram inferiores ao do gluconato de clorexidina á 2%.

REFERÊNCIAS

BERTOL, Charise Dallazem. Pesquisa estuda os benefícios do óleo ozonizado no tratamento de osteoartrose. Universidade de Passo Fundo. Maio, 2019.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects Medical Gas Research, v.1, 6-15 (2011).

CARDOSO, Irlaine da Conceição Costa; SANTOS, Airton Cesar; CARDOSO, Luana da Conceição Costa; ALMEIDA, Mônica Batista de. Potencial antimicrobiano de

óleos vegetais ozonizados frente a espécies bacterianas: uma revisão integrativa. *Research, Society And Development*, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-10, 13 fev. 2021.

CARVALHO, M. M. L. Atividade Antimicrobiana De Óleos Ozonizados Sobre *Neisseria Gonorrhoeae*. 2015. Tese (Mestrado em Bioengenharia) - Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia, Universidade Camilo Castelo Branco, São Paulo, 2015. Disponível em: (https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=3538129).

COLOMBO, Marco; CECI, Matteo; FELISA, Eleonora; POGGIO, Claudio; PIETROCOLA, Giampiero. Cytotoxicity evaluation of a new ozonized olive oil. *European Journal Of Dentistry*, [S.L.], v. 12, n. 04, p. 585-589, out. 2018.

DIAZ, Maritza F. *et al* . Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 403-407, Apr. 2006.

DIETRICH, L.; COSTA, M. D. M. de A. .; TEODORO, T. A. D. .; PARANHOS, L. R.; SILVA, G. R. da. Ozone therapy in the treatment of recurrent herpes labialis: a clinical case report. *Research, Society and Development*, [S. L.], v. 9, n. 10, p. e1349108418, 2020.

GUIMARÃES, N.; OLIVEIRA, I.; Nara Moraes Guimarães, Kozusny-Andreani, D. Eficácia de óleos vegetais in natura e ozonizados no controle de *sporothrix schenckii*. *International Journal of Development Research*, Vol. 10, Issue, 11, pp. 41970-41974, November, 2020.

HORTENSE, S. R.; CARVALHO, E. da Silva; CARVALHO, F. S. de; SILVA, R. P. R. da; BASTOS, J. R. de M. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo* 22(2): 178-84, mai-ago (2010).

KUMAR, T. *et al*. Efficacy of ozonized olive oil in the management of oral lesions and conditions: A clinical trial. *Contemp Clin Dent.*, Mumbai, v.7, n.1, p.51-54, 2016.

LEZCANO, I. *et al*. Actividad in vitro del Oleozon frente a agentes etiológicos de infecciones en la piel. *Rev. CENIC Ciencias Biol.*, Havana, v.29, n.3, p.207-214, 1998.

RENSI, M.V., Avaliação do efeito de óleos ozonizados de girassol e coco no controle de *Propionibacterium acnes*. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014.

SILVA, T. C.; SHIOSI, R., RAINERI NETO, R., Ozonioterapia: um tratamento clínico em ascensão na medicina veterinária. Revisão de Literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* (31) julho, 2018.

SECHI, L. A. *et al*. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J. Appl. Microbiol Biochem.*, Wilmington, v.90, n.2, p.279-284, 2001.

SKALSKA, K. *et al.* Germicidal Properties of Ozonated Sunflower Oil. *Ozone Sci Eng., Chelsea*, v.31, n.3, p.232-237, 2009.

TRAVAGLI, V. *et al.* Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm., Oxford*, v.3, n.1, p.1-9, 2010.

XIAO, W. *et al.* Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via pi3k/akt/mtor signaling pathway. *Biosci Rep.*; 37 (6): bsr20170658, 2017.