

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Fellipe de Oliveira Cabral

**EFEITO DE BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE OZÔNIO SOBRE BACTÉRIAS DE  
IMPORTÂNCIA SANITÁRIA**

Rio de Janeiro

2022

Fellipe de Oliveira Cabral

## **EFEITO DE BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE OZÔNIO SOBRE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Preceptora: Dra. Karyne Rangel

Tutora: Dra. Bruna Peres Sabagh

Rio de Janeiro

2022

Fellipe de Oliveira Cabral

## **EFEITO DE BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE OZÔNIO SOBRE BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA**

Monografia apresentada ao Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Especialista por ter concluído o Curso de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Membro da COREMU (Doutor(a))  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Talita Coelho de Souza (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Liliane Simpson Lourêdo (Doutora)  
Instituto Municipal de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e Inspeção Agropecuária

---

Maria Helena Simões Villas-Bôas (Doutora)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho à minha família, meus pais, irmãs e sobrinho e também a todos que me apoiaram durante o período de sua realização.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Deus, que sempre me coloca em lugares especiais e no caminho de pessoas maravilhosas, colocando um chão firme pra andar onde eu nem poderia imaginar que houvesse possibilidade.

À minha tutora, Bruna, pela receptividade, preocupação e carinho em todo o período da residência.

À minha preceptora Karyne, por ser essa pessoa extraordinária com a qual eu sempre pude contar. Sem ela esse trabalho não teria acontecido. Obrigado por toda a confiança, valorização e reconhecimento, obrigado por compartilhar toda experiência e expertise da sua vida profissional e acadêmica. Eu aprendi que devemos dar honra a quem é merecedor de honra, a Karyne é essa pessoa.

Também agradeço à Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Simões Villas-Bôas pelo espaço e pelo apoio.

Aos colegas do CDTS pela colaboração com as análises estatísticas e de microscopia.

À empresa Astech na pessoa da senhora Astrid por ceder todo equipamento pertinente à geração e monitoramento do gás ozônio.

Aos profissionais do Setor de Meio de Cultura do Departamento de Microbiologia, pelo preparo dos meios de cultura utilizado.

Aos profissionais da Central de Esterilização do Departamento de Microbiologia, pelo preparo dos materiais utilizados durante as análises.

À todos que me apoiaram e incentivaram durante a realização deste trabalho.

O que prevemos raramente ocorre, o que menos esperamos geralmente acontece.

Benjamin Disraeli

## RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são consideradas como o efeito adverso de maior frequência durante a prestação de cuidados a saúde e as superfícies, os equipamentos e dispositivos médicos presentes nos hospitais desempenham um importante papel na sua disseminação. Apesar da desinfecção eficaz de superfícies e ambientes ser considerada uma das principais medidas de controle da disseminação de IRAS, hospitais permanecem como reservatórios negligenciados estimulando a busca por novos métodos de descontaminação. Sendo assim, o ozônio ( $O_3$ ) surge como um composto promissor para controle antimicrobiano em diversas áreas. O estudo teve como objetivo avaliar o poder bactericida de baixas concentrações do  $O_3$  gasoso sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sensíveis ou multirresistentes de importância sanitária. A viabilidade celular, permeabilidade da membrana, os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular (ERO) e as alterações morfológicas visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) também foram investigadas. Quatro cepas padrão e uma cepa clínica multirresistente (MDR) foram expostas a baixas doses de  $O_3$  em diferentes tempos de exposição e concentrações bacterianas. A inativação bacteriana (cultivabilidade, dano de membrana) foi investigada usando contagens de colônias, resazurina como indicador metabólico e iodeto de propídio (IP). Uma sonda fluorescente (H2DCFDA) foi usada nas análises de ERO. Após a exposição ao  $O_3$  não foi detectada nenhuma redução na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em comparação ao grupo controle. No entanto, a viabilidade celular de *Escherichia coli* (30%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%) e *Acinetobacter baumannii* (15%) foi consideravelmente reduzida. A membrana bacteriana de todas as cepas não foi afetada pelo  $O_3$ , mas apresentou aumento significativo de ERO em *E. coli* ( $90 \pm 14\%$ ), *P. aeruginosa* ( $62,5 \pm 19\%$ ) e *A. baumannii* ( $52,6 \pm 5\%$ ). Baixas doses de  $O_3$  foram capazes de interferir na viabilidade celular da maioria das cepas estudadas e, embora não cause danos à membrana bacteriana, níveis elevados de ERO são responsáveis por causar um efeito prejudicial no metabolismo de lipídios, proteínas e DNA. A análise morfológica mostrou que *A. baumannii*, *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentam alterações de membrana após o tratamento com  $O_3$ .

Palavras-chave: Ozônio. IRAS. Resistência antimicrobiana. ERO. Desinfecção.



## ABSTRACT

Health care-associated Infections (HAIs) are considered the most frequent adverse effect during the provision of health care and surfaces, equipment and medical devices present in hospitals play an important role in their spread. Although the effective disinfection of surfaces and the environment is considered one of the main measures to control the spread of HAI, hospitals remain neglected reservoirs, stimulating the search for new decontamination methods. Thus, ozone (O<sub>3</sub>) appears as a promising compound for antimicrobial control in several areas. The study aimed to evaluate the bactericidal power of low concentrations of gaseous O<sub>3</sub> on Gram-positive and Gram-negative sensitive or multidrug-resistant bacteria of sanitary importance. Cell viability, membrane permeability, levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and morphological changes visualized by scanning electron microscopy (SEM) were also investigated. Four standard strains and one clinical multidrug-resistant (MDR) strain were exposed to low doses of ozone at different exposure times and bacterial concentrations. Bacterial inactivation (culturability, membrane damage) was investigated using colony counts, resazurin as a metabolic indicator, and propidium iodide (PI). A fluorescent probe (H<sub>2</sub>DCFDA) was used in the ROS analyses. After exposure to O<sub>3</sub>, no reduction in colony forming units (CFU) count was detected compared to the control group. However, the cell viability of *Escherichia coli* (30%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%) and *Acinetobacter baumannii* (15%) was considerably reduced. The bacterial membrane of all strains was not affected by O<sub>3</sub>, but showed a significant increase in ROS in *E. coli* (90 ± 14%), *P. aeruginosa* (62.5 ± 19%) and *A. baumannii* (52.6 ± 19%). 5%); Low doses of O<sub>3</sub> were able to interfere with the cell viability of most of the strains studied and, although it does not cause damage to the bacterial membrane, high levels of ROS are responsible for causing a harmful effect on the metabolism of lipids, proteins and DNA. Morphological analysis showed that *A. baumannii*, *E. coli* and *P. aeruginosa* show membrane changes after O<sub>3</sub> treatment.

Keywords: Ozone. HAIs. Antimicrobial resistance. ROS. Disinfection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

- Figura 1 - Disposição das placas na bancada contendo a suspensão bacteriana nas diferentes concentrações ( $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  UFC/mL) e tempos de exposição (10h e 12h). A - *S. enterica* (ATCC 10708) e *S. aureus* (ATCC 6538); B - *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *A. baumannii* (MDR); C – *E. coli* (ATCC 25922)..... 25
- Figura 2 - Representação da sala teste utilizada para a exposição das cepas ao  $O_3$ ..... 26
- Figura 3 - Contagem do número de colônias em diferentes espécies de bactérias (*A. baumannii* MDR, *S. aureus* (ATCC 6538), *S. enterica* (ATCC 10708), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442). A quantificação do número de colônias foi realizada no grupo controle (sem tratamento) e nas suspensões bacterianas ( $10^3$  e  $10^2$  UFC/mL) após exposição ao  $O_3$  por 10 h e 12 h..... 29
- Figura 4 - Análise da viabilidade celular de diferentes bactérias (*A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. enterica*) após exposição ao ozônio por 10 h usando resazurina como indicador metabólico. Bactérias viáveis convertem a resazurina em resorufina fluorescente, a comparação da exposição ao  $O_3$  de diferentes colônias foi visualizada em um boxplot. Os pontos vermelhos representam a média da fluorescência relativa de cada grupo. Estatisticamente significativo usando o teste t (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )..... 30
- Figura 5 - Quantificação de bactérias vivas/mortas após exposição ao  $O_3$  por 10 h. Porcentagem de células vivas e mortas quantificadas a partir de diferentes imagens microscópicas..... 32
- Figura 6 - Imagens de fluorescência de *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B) e *A. baumannii* (C) expostas ao  $O_3$  por 10h coradas com Syto9 (verde) e iodeto de propídio (IP; vermelho). Bactérias vivas foram evidenciadas usando Syto9, enquanto as bactérias mortas com membranas permeáveis foram coradas

com IP CID: contraste de interferência diferencial. Barra = 20 $\mu\text{m}$ .....	31
Figura 7 - Medição de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas por $\text{O}_3$ nas diferentes bactérias após incubação durante 10h. O peróxido de hidrogênio (1%) foi usado como controle positivo. Os dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas usando diferentes colônias. Teste t (***) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,001$ .....	32
Figura 8 - Análise morfológica do tratamento com $\text{O}_3$ por microscopia eletrônica. <i>A. baumannii</i> (a, b), <i>E. coli</i> (c, d) e <i>P. aeruginosa</i> (e, f) são vistos sem (a, c, e) e sob tratamento com $\text{O}_3$ (b, d, f). Depois do tratamento, foram visualizadas saliências de membrana (setas) vistas em <i>A. baumannii</i> (b). Observe que as células de controle exibem uma superfície homogênea (a). Tanto <i>E. coli</i> quanto <i>P. aeruginosa</i> apresentam alterações de superfície após o tratamento (d, f). Observamos mais células enrugadas comparadas às células controle (c, e), e alguns danos verificados (ponta de seta).....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitros
°C	Graus Celsius
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemests</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Infusão de cérebro e coração
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRF	<i>Code of Federal Regulations</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESKAPE	<i>Enterococcus spp., Staphylococcus aureus, Klebsiella spp., Acinetobacter spp., Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae</i>
g	Gramas
h	Horas
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IP	Iodeto de propídio
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
m	Metros
m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
MDR	Resistente a múltiplas drogas
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina
nº	Número
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
NR	Norma regulamentadora
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PBS	Salina tamponada fosfatada

POP	Procedimento Operacional Padrão
ppm	Partes por Milhão
TSA	Ágar triptona de soja
TSB	Caldo triptona de soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>21</b>
3.1 Cepas bacterianas.....	21
3.2 Aparelho gerador de ozônio e monitoramento.....	21
3.3 Inoculação das superfícies teste.....	22
3.4 Tratamento com ozônio.....	22
3.5 Viabilidade celular.....	23
3.6 Ensaio vivo/morto.....	26
3.7 Medição dos níveis de ERO.....	27
3.8 Microscopia eletrônica de varredura.....	27
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Monitoramento da concentração de ozônio.....	28
4.2 Tratamento com ozônio.....	28
4.3 Efeito do ozônio.....	30
4.4 Análises de ERO.....	33
4.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	34
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) utiliza o termo “Endemia Surda” como referência às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), já que estas são identificadas como o efeito adverso de maior frequência durante a prestação de cuidados a saúde (COELHO et al., 2011). IRAS compreendem qualquer infecção que se adquire após a entrada do paciente no hospital, podendo ocorrer durante a internação ou logo após a alta, desde que tenha relação com a internação ou com os procedimentos feitos durante o período (RATTI; SOUSA, 2009, RENNER; CARVALHO, 2013).

As superfícies, os equipamentos e dispositivos médicos presentes em hospitais desempenham um importante papel na disseminação de IRAS, como reservatórios secundários, capazes de promover contaminação cruzada (WHO, 2011). As mãos dos profissionais da saúde correspondem ao meio mais comum de transferência de patógenos (FERREIRA et al., 2013). Em unidades de tratamento intensivo (UTI), mesmo após a adoção de protocolos rígidos de limpeza e desinfecção, muitos pacientes são infectados por IRAS (CALFEE, 2011, TEERAWATTANAPONG et al., 2018, WALTER et al., 2018, WHO, 2011). Nessas unidades, essas infecções são mais frequentes, sendo onde os surtos costumam se originar (AGABA et al., 2017), já que o uso de antibióticos é aproximadamente dez vezes maior do que em enfermarias de hospitais gerais (CURCIO et al., 2009, CURCIO, 2011). Além disso, as IRAS acarretam o aumento das mortes (morbimortalidade), favorecem o desenvolvimento de patógenos resistentes, prolongam o tempo de internação e, conseqüentemente, os custos com a saúde (FUJIMURA et al., 2007; IOSIFIDIS et al., 2008; MONNET et al., 1998; ROGUES et al., 2007; SALES et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2014; SOUZA et al., 2015).

A Rede Nacional de Segurança em Saúde dos Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimou 687.000 IRAS em hospitais de cuidados agudos dos EUA causando 72.000 mortes e custos estimados em \$ 97-147 bilhões anualmente (MAGILL et al., 2014, CDC, 2015). Em países de baixa e média renda, como o Brasil, a frequência de infecção adquirida na UTI é pelo menos 2-3 e até 5 vezes maior do que em países de alta renda (WHO, 2016, ROSENTHAL et al.,

2016) e 5-10 vezes maior do que aquelas adquiridas em enfermarias gerais clínicas e cirurgia (WEBER et al., 1999).

No Brasil, um estudo encontrou incidência de eventos adversos de 8,4% em pacientes hospitalizados, sendo as IRAS a segunda mais frequente (20% dos casos) após os eventos cirúrgicos (24,6%) (MENDES et al., 2013). Uma pesquisa multiestadual, realizada no Brasil com uma equipe de coletores de dados treinados, detectou uma taxa geral de prevalência de IRAS de 10,8% (FORTALEZA et al., 2017). Outro estudo realizado no Brasil demonstrou a prevalência geral de IRAS, que foi maior (51,2%) do que a relatada para os EUA (6,1%) e Europa (48,4%) em estudos de vigilância multicêntricos (RICHARDS et al., 2000, VINCENT et al., 2009, ALBERTI et al., 2012), mas semelhante a outros estudos brasileiros (SILVA et al., 2012, LISBOA et al., 2007). Neste estudo, a maior prevalência (78,6%) foi observada em uma unidade localizada na região norte do estado, região de menor renda (BRAGA et al., 2018).

A resistência antimicrobiana é um dos mais complexos desafios de saúde hoje. Apesar dos alertas de organizações internacionais, o mundo há muito tempo ignora os avisos de que antibióticos e outros medicamentos estão perdendo sua eficácia após décadas de uso excessivo e impróprio na medicina humana, saúde animal e agricultura (WHO, 2020, UNITED NATIONS, 2019). Doenças comuns como pneumonia, infecções pós-operatórias, diarreia, dentre outras estão se tornando cada vez mais intratáveis devido ao surgimento e disseminação da resistência aos medicamentos. Infelizmente a tendência para o consumo de antibióticos continua a aumentar em alguns países, especialmente em países de baixa e média renda (KLEIN et al., 2018). Nos últimos anos, alguns países de alta renda conseguiram diminuir o consumo de antibióticos, sugerindo que as estratégias educacionais/regulatórias desenvolvidas nos últimos anos estão tendo algum impacto na redução do consumo (O'NEILL et al., 2016). Entretanto a projeção do consumo global de antibióticos em 2030, caso nenhuma mudança de política seja realizada, será em até 200% (KLEIN et al., 2018).

Em 2017, a OMS publicou um relatório que identificou a resistência antimicrobiana como um dos três problemas mais importantes para a saúde humana (WHO, 2017, BASSETTI; GINOCCHIO; MIKULSKA, 2011) e os agentes patogênicos



resistentes à múltiplas drogas (MDR) mais comuns e graves que causam IRAS são *Clostridium difficile* e as bactérias englobadas na sigla "ESKAPE" (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacteriaceae) (MAGILL et al., 2018). Muitas dessas bactérias exibem resistência antimicrobiana e podem causar infecções da corrente sanguínea, do trato urinário, pneumonia grave e infecção do sítio cirúrgico (AGABA et al., 2017, LAX; GILBERT, 2015). A única defesa possível contra a ameaça de resistência antimicrobiana e a possibilidade de uma era pós-antibiótica é um esforço global e coordenado de todas as partes interessadas em apoiar o desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos, diagnósticos, vacinas e outras ferramentas.

O ambiente hospitalar é apontado como um importante reservatório de microrganismos, especialmente os multirresistentes. Dentre os fatores que favorecem a contaminação do ambiente dos serviços de saúde, podemos citar: mãos dos profissionais de saúde em contato com as superfícies, manutenção de superfícies úmidas, molhadas e empoeiradas, condições precárias de revestimentos e manutenção de matéria orgânica (GARNER, 1996, OLIVEIRA, 2005). A presença de sujidades, principalmente matéria orgânica de origem humana, pode servir como substrato para a proliferação de microrganismos ou favorecer a presença de vetores, que podem carrear passivamente esses agentes. Daí a importância da limpeza e desinfecção rápida de qualquer área com presença de matéria orgânica, independentemente da área do hospital (PELCZAR et al., 1997, FERNANDES et al., 2000, HAN et al., 2015, RUTALA et al., 2013). Apesar da desinfecção eficaz de superfícies e ambiente ser considerada uma das principais medidas de controle da disseminação de IRAS, as superfícies dos hospitais permanecem reservatórios negligenciados.

A aparente falta de eficácia de alguns métodos tradicionais de desinfecção de ambientes hospitalares (BLYTHE et al., 1998, FRENCH et al., 2004) estimulou a busca por novos métodos de descontaminação que também são "amigos do ambiente". Como resultado, tem havido interesse no uso do gás O<sub>3</sub> como elemento químico para controle antimicrobiano em diversas áreas (FAN et al., 2002, de BOER et al., 2006, HUDSON et al., 2007, SHARMA; HUDSON, 2008; ELVIS; EKTA, 2011, WALLACE, 2016) e também como desinfetante (MARTINELLI et al., 2017, BITTER

et al., 2017, HUTH et al., 2009, ROSENBLUM et al., 2012, SHARMA; HUDSON, 2018).

O  $O_3$  é um desinfetante oxidante bioativo que se decompõe em  $O_2$  e  $O_1$ , essa última molécula é extremamente reativa que provoca o rompimento das paredes celulares bacterianas e altera a função de proteínas e carboidratos (MARTINELLI et al., 2017, BITTER et al., 2017). O ozônio gasoso e à base de água são utilizados para desinfecção na indústria de alimentos e saneamento dos sistemas hídricos, e atualmente estão sendo estudados para interromper biofilmes em periodontias (HUTH et al., 2009, ROSENBLUM et al., 2012, MARTINELLI et al., 2017, BITTER et al., 2017). Na fase gasosa, o  $O_3$  tem meia-vida de aproximadamente 20 min, o que tem restringido algumas aplicações diante de exposições de baixa concentração por períodos prolongados, com eficácia limitada (BERRINGTON; PEDLER, 1998). Contudo, o ozônio já foi aplicado na limpeza de roupas hospitalares (CARDOSO et al., 2000), e um estudo recente demonstrou a erradicação de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) no ambiente doméstico de uma enfermeira após descontaminação com ozônio (de BOER et al., 2006). O ozônio gasoso concentrações relativamente altas (25 ppm), também têm sido usado para inativar norovírus e bactérias em ambientes de escritórios e quartos de hotel, com a remoção desse ozônio após uso de purificador de sistema (HUDSON et al., 2007, SHARMA; HUDSON, 2008). Na medicina, o ozônio já foi utilizado em diferentes formas de aplicação (parenteral ou local), visando combater isquemias, doenças articulares, imunodepressão, doenças degenerativas e infecções (BOCCI, 1998, BOCCI, 1999, DI PAOLO, 2004) e para fins terapêuticos (CARVALHO; BRIOSCHI; TEIXEIRA, 2015, MANOTO; MAEPA; MOTAUNG, 2018). No entanto, em concentrações elevadas ele se torna tóxico (SILVA et al., 2009). Assim, se usado de modo correto e de forma controlada, diferentes efeitos benéficos podem ser obtidos.

Desta forma, o  $O_3$  mostra-se um composto promissor para controle antimicrobiano. Considerando o surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais e, conseqüentemente, desinfetantes disponíveis no mercado, utilizados nas Instituições de Assistência à Saúde, o emprego do  $O_3$  como agente desinfetante é uma opção efetiva e de baixo custo. No entanto, são necessárias mais pesquisas para evidenciar suas possibilidades e restrições de uso, já que a eficiência dos resultados varia provavelmente devido às diferenças na

concentração de ozônio, modo de distribuição e tempo de exposição juntamente com diferentes bactérias e condições de crescimento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o poder bactericida de baixas concentrações do gás ozônio sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Monitorar a concentração ambiental de  $O_3$  emitido.
- Avaliar se o tratamento com  $O_3$  é capaz de interferir na contagem de colônias bacterianas.
- Observar a viabilidade celular através da redução enzimática da resazurina.
- Avaliar a permeabilidade da membrana por microscopia de fluorescência.
- Observar o efeito do  $O_3$  através do uso dos corantes Syto9 e iodeto de propídio.
- Medir os níveis intracelulares de ERO com uso de sonda fluorescente.
- Examinar alterações morfológicas nas cepas bacterianas através de microscopia eletrônica de varredura.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas padrão – *American Type Culture Collection* (ATCC) conforme descrição a seguir: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar *choleraesuis* (ATCC 10708), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) adquiridas na empresa Plastlabor (Plast Labor Ind e Com E H Lab Ltda-RJ) com certificado de análise (Anexo 1). Também foi utilizada uma cepa de *Acinetobacter baumannii* multirresistente (MDR) de origem hospitalar, carreadora do gene *bla<sub>OX1A-23</sub>* e representativa de um dos genótipos disseminados no Brasil (ST15/CC15). Esta cepa foi gentilmente cedida pela Dra. Maria Helena Simões Villas-Bôas do laboratório de Saneantes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz). Esta cepa faz parte da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz. Estas cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas de acordo com as instruções da ATCC, em seguida aliquotadas, estocadas em criotubos contendo Caldo Triptona de Soja (TSB) (Difco) com 20% de glicerol (v/v) e mantidas em freezer a -20°C para posterior utilização.

#### 3.2. Aparelho gerador de Ozônio e monitoramento

Para o experimento, utilizamos o purificador de ar/gerador de ozônio comercialmente denominado SANITECH PURI-MU - Purificador de ambiente (Gerador de ozônio e eliminador de impurezas do ar) com capacidade suficiente para área de até 30m<sup>3</sup> da Empresa Astech (Petrópolis-RJ). O monitoramento e a medição da concentração ambiental de O<sub>3</sub> emitido foram realizados por meio de um detector de gás portátil BH-90A (Single Gas Detector - Forensics Detectors). A medição foi feita encostando o detector diretamente na grade frontal do aparelho. Este detector pode fazer a detecção contínua de gases combustíveis e tóxicos, com

sensor de excelente qualidade que faz a detecção por difusão natural. Possui boa sensibilidade e reprodutibilidade. O detector adota controlador MCU embutido e de acordo com suas especificações mede o intervalo de 0 a 20ppm com dois alarmes configurados para 5ppm e 10ppm. O detector possui certificado de calibração.

### 3.3. Inoculação da superfície teste

Para a reativação das cepas, as mesmas foram retiradas da cultura estoque, semeadas em Caldo Triptona de Soja (TSB) (Difco) respectivamente, e incubadas a 37°C, por 24 horas. Após o crescimento, os microrganismos foram suspensos em solução salina a 0,85 % estéril e usando um dispositivo fotométrico (colorímetro padrão Densichek™ Plus, BioMérieux, USA). Posteriormente, foram feitas diluições sucessivas em caldo BHI, de modo a se obter uma concentração final de células de  $10^4$  UFC/mL,  $10^3$  UFC/mL e  $10^2$  UFC/mL, respectivamente para cada microorganismo. Alíquotas de 100 µL das suspensões bacterianas de *S. aureus* (ATCC nº 6538), *S. enterica* (ATCC 10708), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *A. baumannii* (MDR) em diferentes concentrações ( $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  UFC/mL) foram plaqueadas por espalhamento em Ágar Triptona de Soja (TSA) (Difco) em triplicata e incubadas a 37°C por 24 h.

### 3.4 Tratamento com Ozônio

As placas inoculadas contendo os diferentes microrganismos foram dispostas em uma bancada medindo 2,55 m<sup>2</sup> (2,50m x 0,62m) equidistantes e simetricamente opostas (**Figura 1**), em seguida abertas e expostas a apenas um aparelho SANITECH PURI-MU disposto acima das placas (no centro da bancada) a uma distância de 1,15m (ligado 1h antes de iniciar o experimento) por 10h e 12h em uma sala teste medindo cerca de 38m<sup>3</sup> (3,60m x 3,65m x 2,90m) (**Figura 2**), mantida fechada, exceto no momento da medição e monitoramento da concentração

ambiental de ozônio. Após o tempo de exposição, as placas foram fechadas e incubadas a 37°C por 24h.

Como controle positivo do ensaio, foram utilizadas placas com TSA contendo as mesmas suspensões bacterianas, porém sem exposição ao ozônio. Essas placas controle permaneceram a temperatura ambiente e foram incubadas a 37°C por 24h juntamente com as placas expostas ao ozônio. Uma placa contendo apenas TSA foi utilizada como controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata. A contagem das colônias foi realizada apenas nas placas que obtiverem número de colônias de 0 a 300.

### **3.5 Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi medida em suspensão bacteriana selecionada de  $10^3$  UFC/mL após 10 h de exposição ao  $O_3$  com base em resultados anteriores (contagem de células – UFC/mL). Todo o experimento anterior foi realizado novamente (na concentração e tempo definidos), e após 24 h de incubação, três colônias distintas de cada placa foram inoculadas separadamente em um tubo de ensaio contendo caldo BHI (Difco). Como controle positivo do ensaio, realizamos o mesmo procedimento com as placas que não foram expostas ao  $O_3$ , onde três colônias distintas de cada placa foram inoculadas separadamente em um tubo de ensaio contendo caldo BHI (Difco). Em seguida, 100  $\mu$ L da suspensão bacteriana de cada colônia foram transferidos, em triplicata, para os poços da microplaca de 96 poços, que foi incubada a 37°C por 24 h. Cada cepa foi testada em duplicata e o crescimento bacteriano foi detectado pela adição de 0,02% de resazurina (nome IUPAC: 7-hidroxi-10-oxidofenoxazina-10-ium-3-ona; Sigma-Merck, St Louis, MO, EUA) 1 h de incubação. A resazurina é um reagente azul não tóxico e não fluorescente que, após a redução enzimática, torna-se altamente fluorescente. Essa conversão ocorre apenas em células viáveis e, como tal, a quantidade de resofurina produzida é proporcional ao número de células viáveis na amostra. Como controle negativo, utilizou-se caldo BHI, e a medida em 590 nm foi feita em leitor de placas ELISA (Flex Station 3, Molecular Devices, San José, CA, EUA).

Os dados coletados foram analisados por meio do programa R (versão 3.6.0) e R Studio, onde foi aplicado o teste t pareado para comparar a significância estatística entre as duas amostras (com e sem tratamento com O<sub>3</sub>) com  $\leq 0,01$ . Cada experimento foi repetido três vezes para cada microrganismo tratado com O<sub>3</sub>.



**Figura 1** - Disposição das placas na bancada contendo a suspensão bacteriana nas diferentes concentrações ( $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  UFC/mL) e tempos de exposição (10h e 12h). A - *S. enterica* (ATCC 10708) e *S. aureus* (ATCC 6538); B - *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *A. baumannii* (MDR); C - *E. coli* (ATCC 25922).

A

$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	O <sub>3</sub>	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$
$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$		$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$
$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$		$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$
1º Exp.: <i>S. choleraesuis</i>			2º Exp.: <i>S. choleraesuis</i>			3º Exp.: <i>S. choleraesuis</i>			3º Exp.: <i>S. choleraesuis</i>			2º Exp.: <i>S. choleraesuis</i>			1º Exp.: <i>S. choleraesuis</i>			
10h Exposição									12h Exposição									
$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	
$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	
$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	
1º Exp.: <i>S. aureus</i>			2º Exp.: <i>S. aureus</i>			3º Exp.: <i>S. aureus</i>			3º Exp.: <i>S. aureus</i>			2º Exp.: <i>S. aureus</i>			1º Exp.: <i>S. aureus</i>			
10h Exposição									12h Exposição									

B

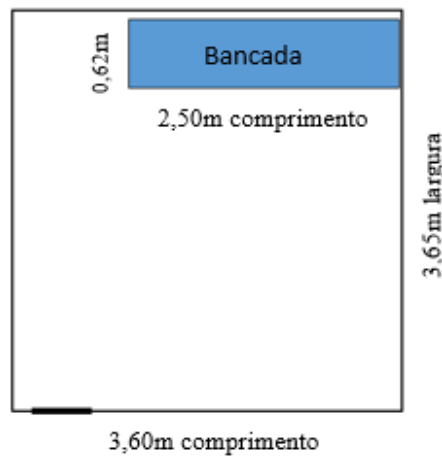
$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	O <sub>3</sub>	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$
$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$		$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$
$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$		$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$
1º Exp.: <i>A. baumannii</i>			2º Exp.: <i>A. baumannii</i>			3º Exp.: <i>A. baumannii</i>			3º Exp.: <i>A. baumannii</i>			2º Exp.: <i>A. baumannii</i>			1º Exp.: <i>A. baumannii</i>			
10h Exposição									12h Exposição									
$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	
$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	
$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	
1º Exp.: <i>P. aeruginosa</i>			2º Exp.: <i>P. aeruginosa</i>			3º Exp.: <i>P. aeruginosa</i>			3º Exp.: <i>P. aeruginosa</i>			2º Exp.: <i>P. aeruginosa</i>			1º Exp.: <i>P. aeruginosa</i>			
10h Exposição									12h Exposição									

									O <sub>3</sub>									
$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	
$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	
$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	
1º Exp.: <i>E.coli</i>			2º Exp.: <i>E.coli</i>			3º Exp.: <i>E.coli</i>			3º Exp.: <i>E.coli</i>			2º Exp.: <i>E.coli</i>			1º Exp.: <i>E.coli</i>			
10h Exposição									12h Exposição									

C

Fonte: o autor

**Figura 2** - Representação da sala teste utilizada para a exposição das cepas ao ozônio.



Fonte: o autor

### 3.6 Ensaio vivo/morto

O efeito do ozônio na permeabilidade da membrana bacteriana foi medido usando sondas fluorescentes para corar bactérias vivas (Syto9) e mortas com a membrana rompida (IP). Resumidamente, a suspensão de bactérias ( $10^3$  UFC/mL) foi cultivada em caldo BHI por 24 h em placas de 24 poços na presença de  $O_3$ . Após exposição, as culturas foram incubadas com  $15 \mu\text{M}$  de IP (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, EUA) e  $2 \mu\text{M}$  de Syto9 (Thermo, Waltham, MA, EUA) por 15 min no escuro. As células foram lavadas em PBS três vezes por centrifugação ( $4000 \times g$  por 5 min). Em seguida, a suspensão celular foi espalhada em uma lâmina de vidro e analisada em um microscópio Axio Imager M2 (Carl Zeiss do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). A fluorescência foi capturada de células vivas/mortas e imagens de contraste de interferência diferencial (CDI) para cada campo de visão de várias áreas para análise. A quantificação foi realizada usando o fluxo de trabalho Knime de diferentes colônias de bactérias (RANGEL et al, 2020).

### 3.7 Medição dos níveis de ERO

Os níveis intracelulares de ERO foram medidos em bactérias tratadas e não tratadas com O<sub>3</sub> (*A. baumannii* MDR, *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442)). A suspensão de bactérias em BHI (10<sup>3</sup> UFC/mL) foi cultivada em placas de 24 poços por 10 h na presença de O<sub>3</sub>. As bactérias foram incubadas por 30 min em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1% v/v) como controles positivos. Após a incubação, as bactérias foram carregadas com 20 µM de H<sub>2</sub>DCFDA por 45 min. O sinal de fluorescência, gerado pela oxidação da sonda por ROS intracelular, foi medido usando comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/535 nm com um leitor de microplacas SpectraMax M2 (Molecular Devices, CA, EUA) (LARA et al, 2018).

Cada experimento foi repetido três vezes para cada microrganismo tratado com O<sub>3</sub>. O teste t pareado foi aplicado para comparar a significância estatística entre as duas partes (com e sem tratamento com O<sub>3</sub>), sendo as diferenças consideradas significativas se  $p \leq 0,05$ .

### 3.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As alterações morfológicas nas espécies de bactérias foram visualizadas usando MEV. Para análise, as células controle ou o tratamento com O<sub>3</sub> foram fixadas por 1 h com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS por 5 min, pós-fixadas por 15 min em tetróxido de ósmio a 1% (OsO<sub>4</sub>) e lavadas novamente três vezes em PBS por 5 min. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série ascendente de etanol (7,5, 15, 30, 50, 70, 90 e 100% etanol) por 15 min cada etapa, ponto crítico seco com CO<sub>2</sub>, revestido com 15 nm de espessa camada de ouro e examinada em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390 (Tóquio, Japão).

## 4 RESULTADOS

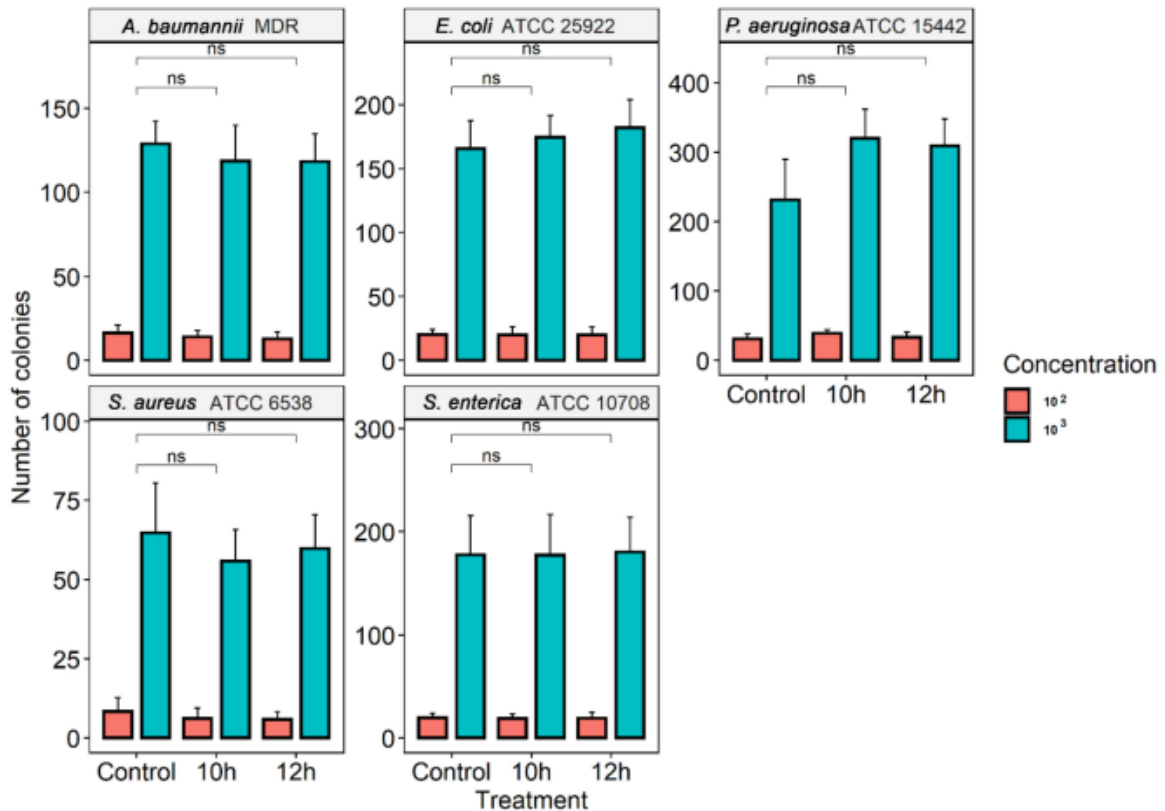
### 4.1 Monitoramento da concentração de Ozônio

O monitoramento da concentração de O<sub>3</sub> na sala teste mostrou que a emissão diretamente do aparelho variou de 0,6 ppm a 2,1 ppm com a média de todas as medições em torno de 1,4 ppm. Todos os ensaios foram realizados a uma temperatura ambiente de 27°C.

### 4.2 Tratamento com Ozônio

No tratamento com O<sub>3</sub> em diferentes tempos de exposição (10 e 12h), nossos resultados mostraram que a aplicação de uma baixa dose de O<sub>3</sub> gasoso não preveniu completamente o crescimento *in vitro* de todas as cepas bacterianas testadas (**Figura 3**), já que não houve redução estatisticamente significativa na contagem de colônia em comparação ao grupo controle (não tratado com O<sub>3</sub>). Para as cepas *A. baumannii* MDR e *S. aureus* ATCC 6538, a contagem das colônias bacterianas no grupo controle foi maior que as que sofreram o tratamento com O<sub>3</sub>, porém sem diferença estatística significativa. Nas demais cepas de *S. enterica* ATCC 10708, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *E. coli* ATCC 25922 o O<sub>3</sub> não teve efeito sobre a proliferação bacteriana, em comparação com o grupo de linha de base.

**Figura 3** - Contagem do número de colônias em diferentes espécies de bactérias *A. baumannii* (MDR), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. enterica* (ATCC 10708), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442). A quantificação do número de colônias foi realizada no grupo controle (sem tratamento) e nas suspensões bacterianas ( $10^3$  e  $10^2$  UFC/mL) após exposição ao  $O_3$  por 10 h e 12 h.

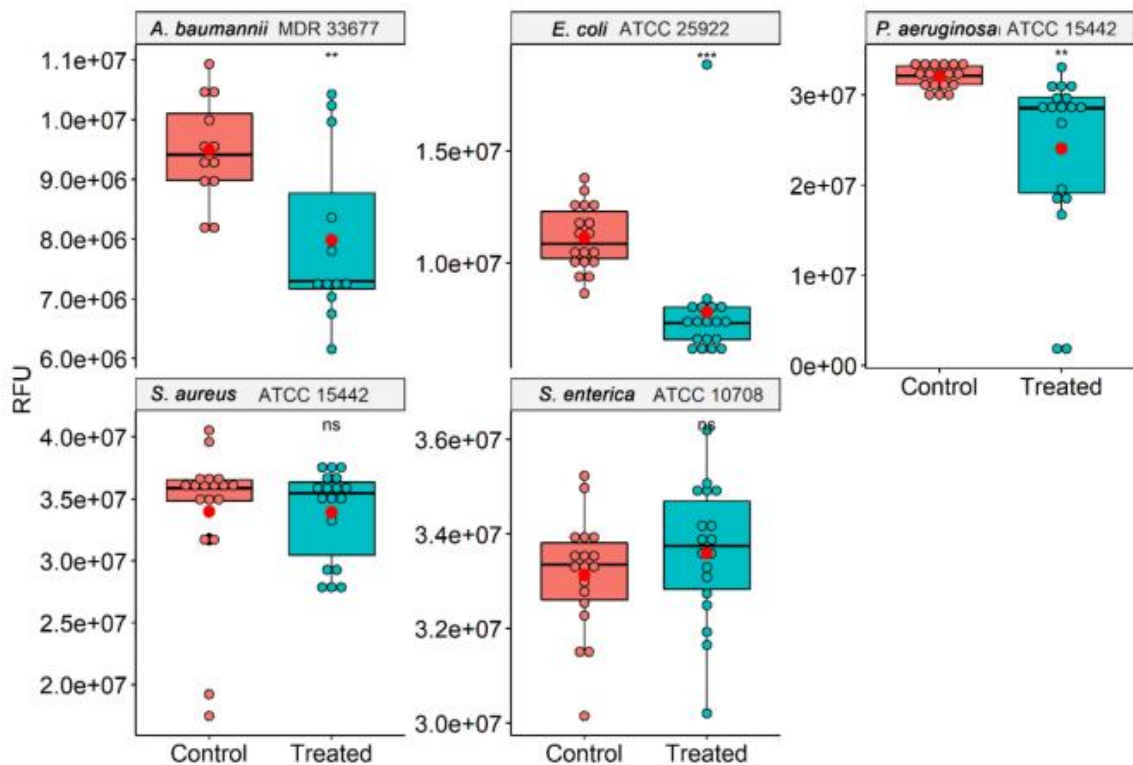


Fonte: o autor. ns: estatisticamente não significativo usando o teste t.

Uma vez que a contagem de colônias não fornece informações quanto ao estado metabólico, funcional e capacidade proliferativa das bactérias, foi realizado o ensaio viabilidade celular em solução utilizando resazurina como indicador metabólico. Após tratamento com  $O_3$  três colônias aleatórias foram incubadas em meio e após 24 horas a viabilidade das diferentes espécies foi medida (**Figura 4**). Foi observado uma diferença significativa na viabilidade do grupo tratado com ozônio em 3 diferentes espécies, *A. baumannii* MDR, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 15442. O tratamento com  $O_3$  reduziu principalmente o crescimento bacteriano em *E. coli*, levando a uma inibição de cerca de 30 %, seguido de *P. aeruginosa* (25 %) e *A. baumannii* (15%). Nenhuma diferença na

viabilidade bacteriana foi encontrada após o tratamento com  $O_3$  nas espécies *S. aureus* e *S. enterica*.

**Figura 4** - Análise da viabilidade celular de diferentes bactérias (*A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. enterica*) após exposição ao  $O_3$  por 10 h usando resazurina como indicador metabólico. Bactérias viáveis convertem a resazurina em resorufina fluorescente, a comparação da exposição ao  $O_3$  de diferentes colônias foi visualizada em um boxplot. Os pontos vermelhos representam a média da fluorescência relativa de cada grupo. Estatisticamente significativo usando o teste t (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )



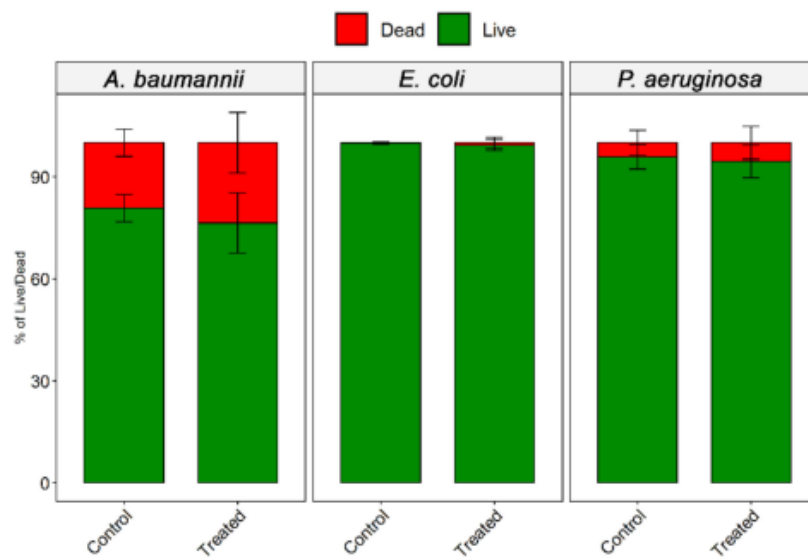
Fonte: o autor.

### 4.3 Efeito do Ozônio

O uso de IP como indicador de permeabilidade da membrana mostrou que as membranas bacterianas de todas as cepas ATCC não foram afetadas pelo  $O_3$ . Nenhuma diferença estatística foi observada em comparação com o controle não

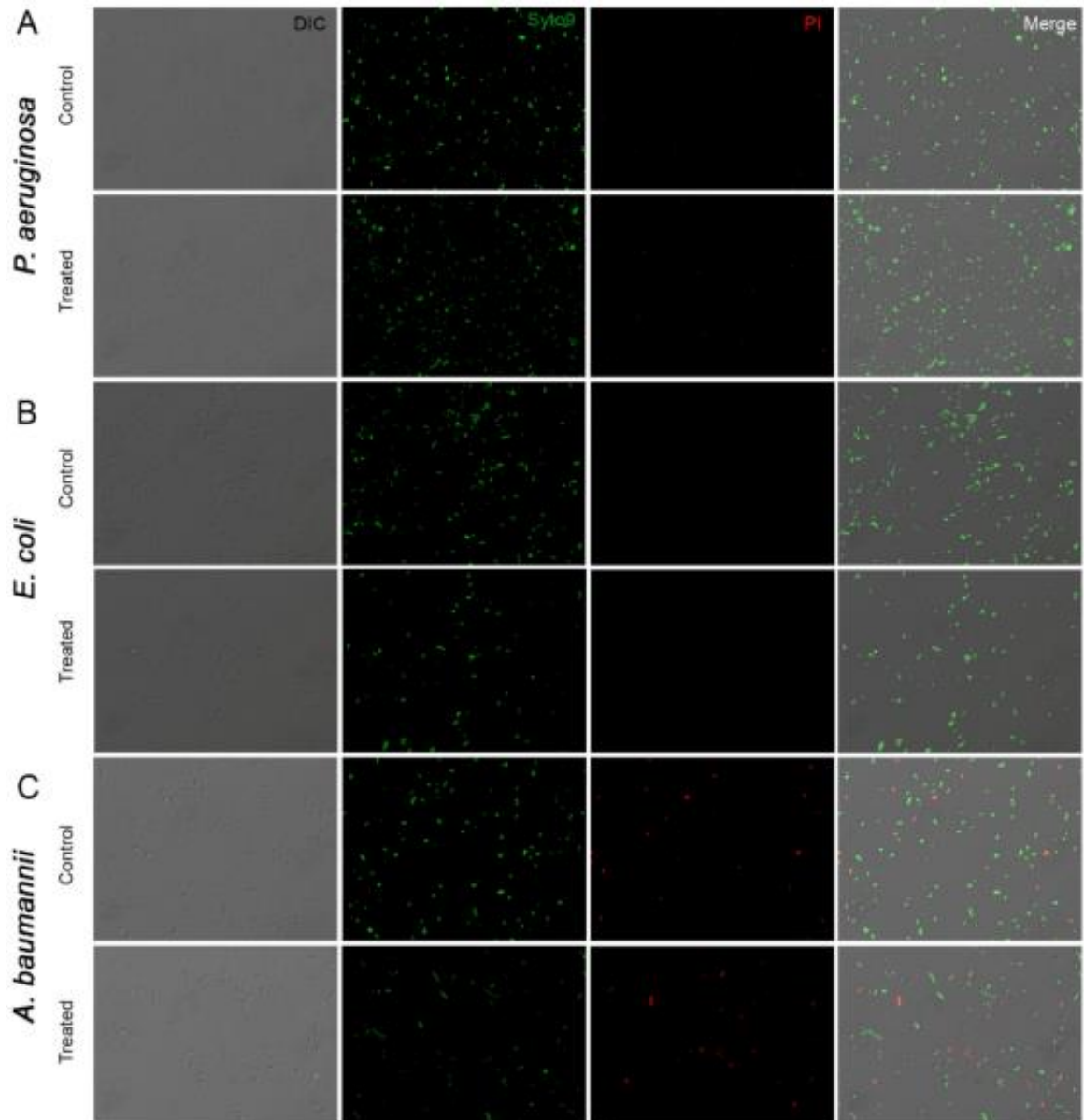
tratado (**Figura 5**). Imagens de fluorescência representativas da comparação dos grupos não tratados e tratados com O<sub>3</sub> também não mostraram diferença na distribuição de bactérias permeáveis a IP (**Figura 6**).

**Figura 5** - Quantificação de bactérias vivas/mortas após exposição ao O<sub>3</sub> por 10 h. Porcentagem de células vivas e mortas quantificadas a partir de diferentes imagens microscópicas.



Fonte: o autor

**Figura 6** - Imagens de fluorescência de *P. aeruginosa* (A), *E. coli* (B) e *A. baumannii* (C) expostas ao O<sub>3</sub> por 10h coradas com Syto9 (verde) e iodeto de propídio (IP; vermelho). Bactérias vivas foram evidenciadas usando Syto9, enquanto as bactérias mortas com membranas permeáveis foram coradas com IP CID: contraste de interferência diferencial. Barra= 20 µm.



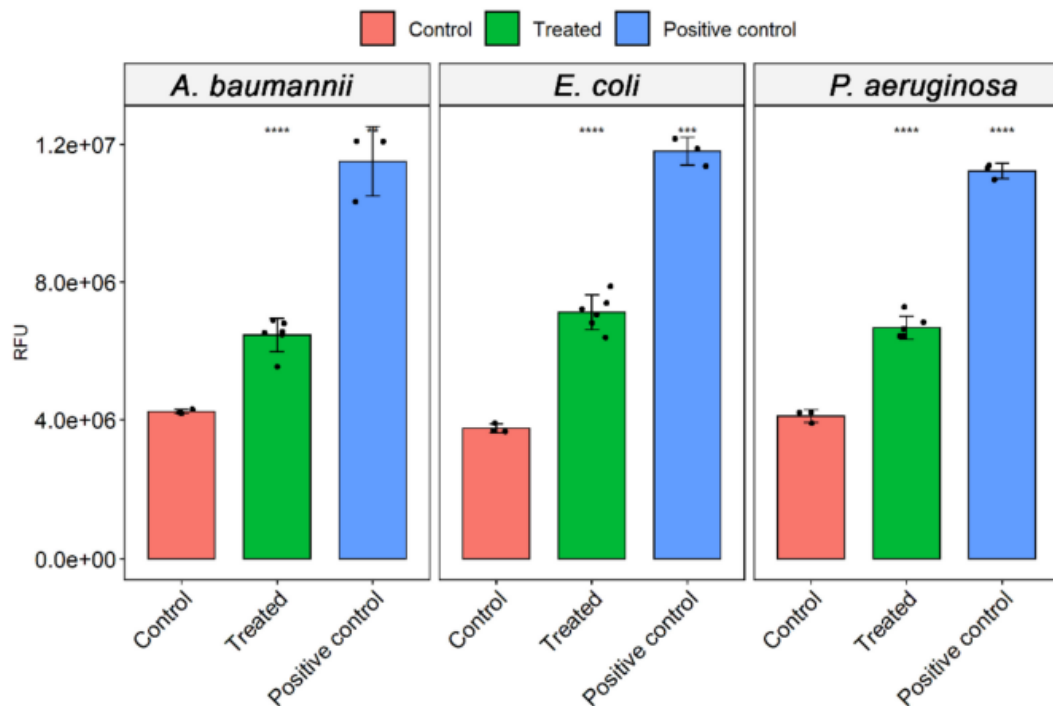
Fonte: o autor



#### 4.4 Análises de ERO

Como o  $O_3$  se difunde em solução e se decompõe em oxigênio elementar e radicais livres, medimos o estresse oxidativo produzido pelo tratamento com  $O_3$  usando uma sonda fluorescente. Os resultados demonstram um aumento significativo de ERO no grupo tratado com  $O_3$  para as três bactérias patogênicas. Comparado ao controle não tratado, o aumento de ERO foi maior em *E. coli* ( $90 \pm 14\%$ ), seguido por *P. aeruginosa* ( $62,5 \pm 19\%$ ) e *A. baumannii* ( $52,6 \pm 5\%$ ) (**Figura 7**). *E. coli* é mais sensível aos agentes oxidantes, pois o  $H_2O_2$  leva a um aumento de aproximadamente 215% em relação à produção basal de ERO do grupo controle. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* tiveram um aumento semelhante no tratamento com  $H_2O_2$ , 171 e 173%, respectivamente (**Figura 7**).

**Figura 7** - Medição de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas por  $O_3$  nas diferentes bactérias após incubação durante 10h. O peróxido de hidrogênio (1%) foi usado como controle positivo. Os dados representam a média e o desvio padrão de triplicatas usando diferentes colônias. Teste t (\*\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ .

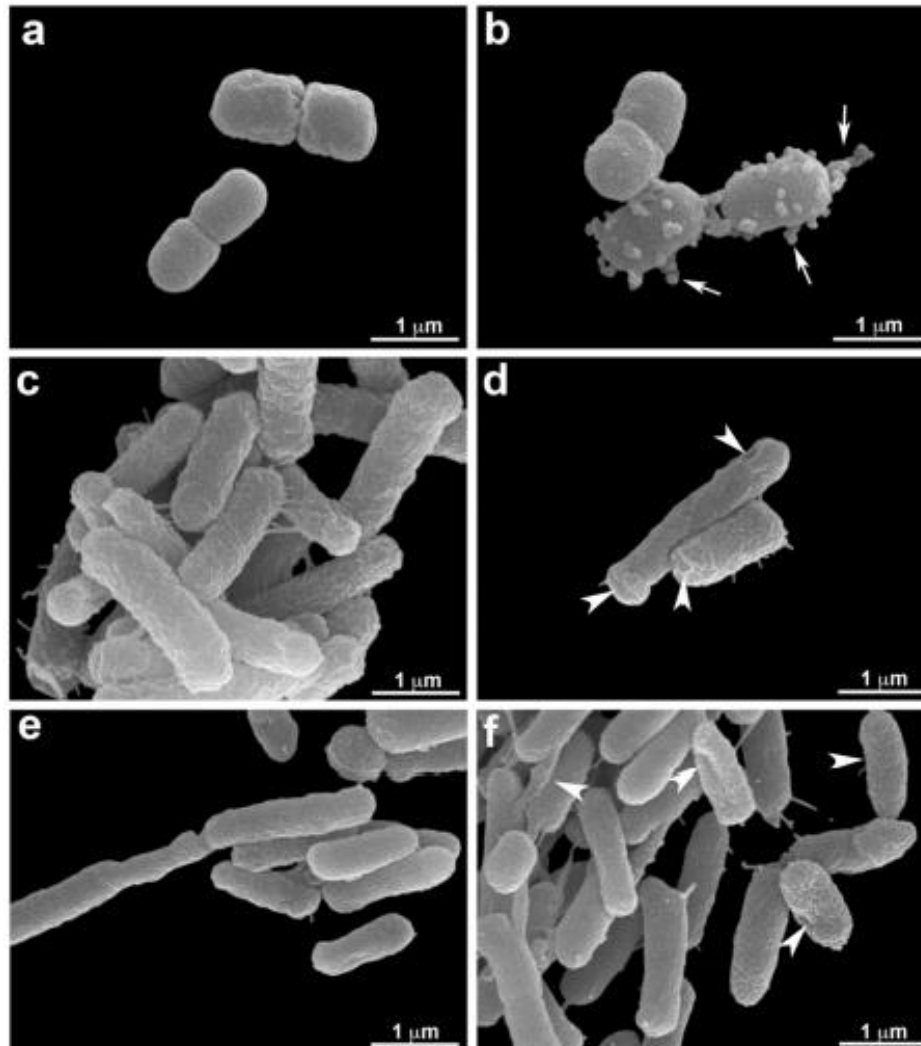


Fonte: o autor

#### 4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada para confirmar o dano à membrana das espécies bacterianas. A análise morfológica mostrou um efeito marcante do O<sub>3</sub> em *A. baumannii*. As bactérias tratadas mostraram muitas saliências que se assemelham a bolhas de membrana. Todos os controles bacterianos apresentaram superfícies lisas e homogêneas. Tanto *E. coli* quanto *P. aeruginosa* apresentam alterações de membrana após o tratamento com O<sub>3</sub>. O tratamento produziu, nas membranas das células bacterianas, enrugamento com áreas danificadas com invaginação (**Figura 8**).

**Figura 8** - Análise morfológica do tratamento com  $O_3$  por microscopia eletrônica. *A. baumannii* (a, b), *E. coli* (c, d) e *P. aeruginosa* (e, f) são vistos sem (a, c, e) e sob tratamento com  $O_3$  (b, d, f). Depois do tratamento, foram visualizadas saliências de membrana (setas) vistas em *A. baumannii* (b). Observe que as células de controle exibem uma superfície homogênea (a). Tanto *E. coli* quanto *P. aeruginosa* apresentam alterações de superfície após o tratamento (d, f). Observamos mais células enrugadas comparadas às células controle (c, e), e alguns danos verificados (ponta de seta).



Fonte: o autor

## 5 DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é um problema crescente e preocupante dentro e fora do ambiente hospitalar. Apesar de diversos estudos terem demonstrado que o efeito bactericida aumenta com a utilização de concentrações mais altas do O<sub>3</sub>, mesmo com tempo de exposição menor (NOGALES et al., 2014; TORMIN et al., 2016), pouco se sabe com relação ao seu efeito bactericida quando utilizado em baixas concentrações (ambientes ocupados) já que os resultados são limitados ou inconclusivos. As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram selecionadas por serem as quatro cepas de referência preconizadas para avaliação da qualidade de produtos desinfetantes de acordo com Método da Diluição de Uso adotado para a avaliação da atividade bactericida de desinfetantes na forma líquida, segundo estabelecido pela *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC (TOMASINO, 2012) e o POP INCQS nº 65.3210.007 (MANUAL DA QUALIDADE, 2013) e uma cepa patogênica MDR de *A. baumannii* já caracterizada, comumente presente em pacientes com infecções nosocomiais graves.

A concentração de O<sub>3</sub> produzida por um Ozonizador depende do tamanho da área, capacidade do equipamento, se há portas abertas ou se há materiais que reagem com O<sub>3</sub> no local (MCCLURKIN, 2013; NEEMICH, 2015).

Os principais órgãos reguladores emitiram regras e leis que regulam o número máximo de horas permitidas para determinadas concentrações de gás no local de trabalho. A Administração de Segurança e Saúde Ocupacional do Departamento de Trabalho dos Estados Unidos (OSHA) permite a exposição máxima de 0,1 ppm de O<sub>3</sub> em ambientes de trabalho de 8 horas (OSHA, 1992). A Agência de Proteção Ambiental (EPA), através do Código de Regulamentações Federais (CRF) título 21, permite a exposição máxima de 0,05 ppm de gás (EPA, 2015). No Brasil, as dosagens seguras de O<sub>3</sub> em ambientes de trabalho são indicadas pelo Ministério do Trabalho, por meio da Norma Regulamentadora (NR 15, anexo 11) (BRASIL, 2016), o que significa uma exposição máxima de 0,08 ppm (0,16 mg/m<sup>3</sup>) para jornada de trabalho de até 48 horas semanais. Existem fatores no ambiente de trabalho que devem ser considerados, como ventilação e outros elementos que atuam na destruição da molécula de O<sub>3</sub>.

As medições foram realizadas para estimar a concentração de O<sub>3</sub> no ar ambiente gerado pelo purificador/esterilizador de ar com O<sub>3</sub>, diretamente na grade de saída do dispositivo SANITECH O3 PURI-MU com emissão variando de 0,6 a 2,1 ppm. De acordo com a Eco Sensors Divisão da KWJ Engineering Inc, que é a principal designer de instrumentos de detecção de gás e detecção de O<sub>3</sub> para ambientes industriais e proteção pessoal, atendendo às necessidades de segurança do trabalhador na detecção de O<sub>3</sub> e gás desde 1992 (EcoSensors Company 2020a), a concentração de O<sub>3</sub> diminui rapidamente à medida em que se aumenta a distância de medição do gerador. Quando se lê 10 ppm de O<sub>3</sub> diretamente na grade de saída raramente excede 0,1 ppm a 1 metro do gerador (EcoSensors Company 2020b). Portanto, o aparelho utilizado no estudo produziu baixas concentrações de O<sub>3</sub> no ambiente, estando de acordo com as normas brasileiras (NR 15) com emissão de níveis seguros de O<sub>3</sub> em ambientes ocupados assegurando sua toxicidade.

Embora a eficácia do O<sub>3</sub> para desinfecção de superfícies e quartos tenha sido examinada em vários estudos anteriores, muitos usaram baixas concentrações de O<sub>3</sub> por causa da natureza tóxica do gás e sua meia-vida relativamente longa (MASAOKA et al., 1982, DYAS et al., 1983, ISHIZAKI et al., 1986, WHISTLER; SHELDON 1989, BERRINGTON; PEDLER, 1998). No entanto, baixas concentrações de O<sub>3</sub> geralmente levam a resultados limitados ou inconclusivos. Apesar de não termos obtido uma redução significativa do crescimento bacteriano *in vitro*, quando investigamos sua capacidade metabólica através da resazurina, encontramos uma diminuição significativa nos valores para três das cinco bactérias estudadas, mostrando que mesmo em baixas concentrações, o O<sub>3</sub> foi capaz de interferir na viabilidade. Além disso, verificamos que o O<sub>3</sub> apresentou o maior efeito inibitório sobre *E. coli* (30%), seguido por *P. aeruginosa* (25%) e *A. baumannii* (15%). Entre as bactérias, a *E. coli* é o mais sensível ao O<sub>3</sub>.

Baixas doses de O<sub>3</sub> podem efetivamente controlar o protozoário *Cryptosporidium* e a espécie bacteriana *Mycobacterium avium* (WHO, 2004). Um estudo mostrou que uma única aplicação tópica por nebulização de uma pequena quantidade de O<sub>3</sub> pode inibir completamente o crescimento de várias cepas bacterianas potencialmente patogênicas com resistência conhecida a agentes antimicrobianos (FONTES, 2012). Cocos gram-positivos (*Staphylococcus* e *Streptococcus*) e vírus são mais resistentes ao O<sub>3</sub>.

Embora, o O<sub>3</sub> possa matar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ALMAZ, 2015), o O<sub>3</sub> é uma molécula instável que decai rapidamente para O<sub>2</sub> e libera um único átomo de oxigênio. O único átomo de oxigênio reage com a membrana celular da bactéria, ataca os componentes celulares, interrompe a atividade celular normal e depois destrói as bactérias (ALMAZ, 2015; YAMAYOSHI, 1993; KOMANAPALLI, 1998). Outro estudo verificou a eficácia do O<sub>3</sub> como desinfetante terminal avaliando diferentes microrganismos inoculados em quadrados de aço inoxidável e incubados em várias temperaturas e umidade relativa por até 4 h. Os pátios contaminados foram configurados para serem identicamente comparados após exposição ao O<sub>3</sub> (2 ppm/4 h) a sobrevivência desses microrganismos. A liberação de O<sub>3</sub> nas superfícies sujas resultou em uma redução na viabilidade microbiana que variou de acordo com o tipo de organismo (valores log de 7,56 a 2,41), sugerindo que, se aplicado após a limpeza adequada, o ozônio pode ser usado como um desinfetante terminal eficaz (MOORE, 2000). Um estudo *in vitro* observou que o O<sub>3</sub> reduz efetivamente as concentrações de *A. baumannii*, *Clostridium difficile* e *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) em amostras secas e úmidas, sugerindo que pode ser usado como desinfetante (SHARMA, 2008).

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante em favor dos pró-oxidantes, levando a danos potenciais à célula (SIES, 2015). O excesso de pró-oxidantes pode resultar em estresse oxidativo, danificando componentes celulares, como proteínas, lipídios e DNA. (FARR, 1991; YOSHIKAWA, 2002). O estresse oxidativo induz radicais livres com elementos altamente reativos, como espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem atacar moléculas biológicas e levar à morte (VATANSEVER, 2013). O O<sub>3</sub> é um oxidante forte que gera espécies reativas de oxigênio (ERO) no tecido e causa danos celulares (CHENG, 2003). Em nossa análise, a permeabilidade da membrana bacteriana de todas as cepas ATCC não foi significativamente afetada pelo ozônio, não havendo diferença na distribuição de bactérias IP positivas. No entanto, observamos um aumento significativo de ERO no grupo tratado com ozônio para *E. coli* (90 ± 14%), seguido por *P. aeruginosa* (62,5 ± 19%) e *A. baumannii* (52,6 ± 5%) e certos danos à membrana observados por MEV.

É bem sabido que o ozônio é venenoso; este é um fator essencial na poluição do ar, afetando principalmente as crianças; a inalação pode danificar os pulmões

com possíveis consequências graves (MATHINEU-NOLF, 2002). No entanto, em comum com muitas outras terapias que induzem ERO, o resultado do tratamento com ozônio, em doses rasas, pode ser benéfico em vez de prejudicial (BOCCI, 2004; BOCCI, 2009; VALACHCI, 2005).

Embora o efeito microbicida do  $O_3$  seja conhecido, seu mecanismo de ação é desconhecido. Um estudo anterior avaliou o efeito bactericida sob baixa concentração de  $O_3$  e descobriu que os íons negativos e positivos gerados durante a exposição induzem estresse oxidativo, incluindo oxidação de aminoácidos, reação da parede celular (VELANO, 2001) e danos ao DNA (PARK, 2016), causando morte celular. Foi hipnotizado que a lise celular depende da extensão da reação (VELANO, 2001). Os alvos celulares primários para  $O_3$  são ácidos nucleicos, onde os danos podem variar de lesões de base a quebras de fita simples e dupla (VON SONNTAG, 2012). As lesões podem levar a mutações pontuais mais ou menos comprometedoras, enquanto a quebra maciça do DNA é letal se não for reparada (HAMELIN, 1974; HAMELIN, 1977; HAMELIN, 1978). Muitos outros estudos fornecem evidências de que o envelope celular é afetado durante a ozonização, provavelmente mesmo antes de ocorrerem danos graves ao DNA (SCOT, 1963; HUNT, 1999; DODD, 2012).

A eficácia do  $O_3$  como desinfetante varia significativamente entre os diferentes tipos de bactérias, mesmo no nível da cepa, conforme mostrado anteriormente (VON SONNTAG, 2012; VON GUNTEN, 2003) e por nossa análise. No entanto, seu efeito depende de vários fatores intrínsecos, como estágio de crescimento, envelope celular, eficiência dos mecanismos de reparo e tipo de indicador de viabilidade utilizado (BROADWATER, 1973; CASOLARI, 1988; PATIL, 2011). Além disso, outros fatores extrínsecos, como concentração e tipo de material orgânico dissolvido ou a presença de flocos ou partículas, podem reduzir a estabilidade do  $O_3$  ou proteger os microrganismos de seus efeitos, diminuindo a eficiência da desinfecção (XU, 2002; PATIL, 2009; TANG, 2011; PAK, 2016). No entanto, o gás ozônio foi aplicado com sucesso em vírus de desinfecção em superfícies e aerossóis (TSENG, 2006; CANNON, 2013).

## 6 CONCLUSÕES

Dadas as internações prolongadas em hospitais e o aumento dos custos de tratamento observados em pacientes que desenvolvem IRAS, as abordagens de descontaminação com base no O<sub>3</sub> podem ser uma intervenção extremamente econômica e promissora. O presente estudo constitui uma investigação preliminar, contudo, nossos resultados foram promissores e estimulam a continuação das investigações do uso do O<sub>3</sub> gasoso a baixas concentrações como desinfetante ou antisséptico, avaliando seu efeito bactericida, já que poderá contribuir na redução da transmissão desses microrganismos e na manutenção e/ou desinfecção de ambientes de saúde. Portanto, novos estudos devem ser incentivados.



## REFERÊNCIAS

- AGABA, P. et al. Nosocomial bacterial infections and their antimicrobial susceptibility patterns among patients in Ugandan intensive care units: a cross sectional study. **BMC Res Notes**, v.10, p. 349, 2017.
- ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicenter cohort study. **Intensive Care Med**, v. 28, p. 108-21, 2002.
- ALMAZ, M.E.; SÖNMEZ, I.S. Ozone therapy in the management and prevention of caries. **J. Formos Med. Assoc.** 114, 3–1,1, 2015.
- BASSETTI, M.; GINOCCHIO, F.; MIKULSKA, M. New treatment options against gramnegative organisms. **Crit Care**, v.15, n.2, p.215, 2011.
- BERRINGTON, A.W.; PEDLER, S.J. Investigation of gaseous ozone for MRSA decontamination of hospital side-rooms. **J Hosp Infect**, v. 40, p. 61-65, 1998.
- BOCCI, V. Is ozone therapy therapeutic? **Perspect Biol Med**, v. 42, p. 131-43, 1998.
- BOCCI, V. Biological and clinical effects of ozone: Has ozone therapy a future in medicine? **Br J Biomed Sci.** v. 56, p. 270-9, 1999.
- BOCCI, V. Ozone as Janus: This controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediat. Inflamm.** ,13,3–11,2004.
- BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. **Med. Res. Rev.** 29, 646–682, 2009.
- BITTER, K. et al. Effects of diode laser, gaseous ozone, and medical dressings on *Enterococcus faecalis* biofilms in the root canal ex vivo. **Biomed Res Int.** 6321850, 2017.
- BLYTHE, D. et al. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J Hosp Infect**, v. 38, p. 67–69, 1998.

BRAGA, I.A. et al. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. **J Hosp Infect**, v. 99, p. 318-324, 2018.

BRASIL (2016) Ministério do Trabalho e Emprego. **Norma Regulamentadora (NR) 15, NR 15, Anexo 11: Atividades e Operações Insalubres**. Disponível em: [http://www.mte.gov.br/legislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_15\\_anexo11.pdf](http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_15_anexo11.pdf). Acesso em 22/11/2020.

BROADWATER, W. T.; HOEHN, R. C.; KING, P. H. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. **Appl Microbiol**, v. 26, p. 391-393, 1973.

CALFEE, D.P. Crisis in hospital-acquired, healthcare-associated infections. **Annu Rev Med**, v. 63, p. 359–71, 2011.

CANNON, J.L.; KOTWALL, G.; WANG, Q. Inactivation of norovirus surrogates after exposure to atmospheric ozone. **Ozone Sci. Eng.** , 35, 217–219, 2013.

CARDOSO, C.C., et al. Disinfection of hospital laundry using ozone: microbiological evaluation. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 248-249, 2000.

CARVALHO, C.F.; BRIOSCHI, M. L.; TEIXEIRA, M. J. Uso da termografia na avaliação da ozonioterapia como tratamento da epicondilite lateral. **Pan American Journal of Medical Thermology**, v. 2, n. 2, p. 90-93, 2015.

CASOLARI, A. Microbial Death. In *Physiological Models in Microbiology*; Bazin, M. J., Prosser, J. I., Eds.; **CRC Press: Boca Raton, FL**, 1988; Vol. II, pp 1–44.

CDC (2015) Healthcare-associated infections-Hospital Prevalence Survey. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/index.html>. Acesso em: 21/11/20.

CHENG, T.J.; KAO, H.P.; CHAN, C.C.; CHANG, W.P. Effects of ozone on D.N.A. single-strand breaks and 8-oxoguanine formation in A549 cells. **Environ. Res.**, 93, 279–284, 2003.

COELHO, F. et al. Velhos Problemas, novos desafios. **Rev Tecn Hospitalar**, v. 43, p. 3032, 2011.

CURCIO, D. et al. Latin American Antibiotic Use in Intensive Care Unit Group. Prescription of antibiotics in intensive care units in Latin America: an observational study. **J Chemother**, v. 21, p. 527-34, 2009.

CURCIO, D.J. On behalf of the Latin American antibiotic use in intensive care unit group. Antibiotic prescription in intensive care units in Latin America. **Rev Argent Microbiol**, v.43, p. 203-11, 2011.

DE BOER, H.E.L. et al. Use of gaseous ozone for eradication of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* from the home environment of a colonised hospital employee. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, p. 1120–1122, 2006.

DI PAOLO, N.; BOCCI, V.; GAGGIOTTI, E. Ozone therapy editorial review. **Int J Artif Organs**. n. 27, p. 168-1675, 2004.

DODD, M. C. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. **J Environ Monit**, v. 14, p. 1754, 2012.

DYAS, A.; BOUGHTON, B.; DAS, B. Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator. **J Clin Pathol**, v. 36, p. 1102-1104, 1983.

ECO Sensors Company (2020a). Disponível em: <https://www.ecosensors.com/company/>. Acesso em 20/11/2020.

ECO Sensors Company (2020b). Disponível em: <http://www.ecosensors.com/wpcontent/uploads/old/MO-100.pdf>. Acesso em 20/11/2020.

ELVIS, A.M.; EKTA, J.S. Ozone therapy: A clinical review. **J Nat Sc Biol Med**, v. 2, p. 66-70, 2011.

EPA (2015) **Environmental Protection Agency**. Disponível em: <http://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/ozone-generators-are-sold-air-cleaners#generators-effective>. Acesso em: 25/11/2020.

FAN, L. et al. Interaction of ozone and negative air ions to control micro-organisms. **J. Appl. Microbiol**, p. 93, p. 144–148, 2002.

FARR, S.B.; KOGOMA, T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Microbiol. Rev.** 1991, 55, 561–585.

FERNANDES, A.T. et al. Infecção Hospitalar e suas interfaces na Área da Saúde. São Paulo: **Atheneu**, 2000.

FERREIRA, A. M. et al. Superfícies do ambiente hospitalar: um possível reservatório de micro-organismos subestimado? – Revisão Integrativa. **Revista de Enfermagem UFPE On Line**, v. 7, p. 4171-4182, 2013.

FRENCH, G.L., et al. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. **J Hosp Infect**, v. 57, p. 31-37, 2004.

FONTES, B. et al. Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 358, 2012.

FORTALEZA, C.M.C.B. et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. **J Hosp Infect**, v. 96, p. 139-44, 2017.

FUJIMURA, S. et al. Relationship between the usage of carbapenem antibiotics and the incidence of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **J Infect Chemother**, v. 13, p. 147-50, 2007.

GARNER, J.S. The hospital infection control practices advisory committee. Guideline for isolation precautions in hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.17, p. 54-80, 1996.

HAMELIN, C.; CHUNG, Y. S. Optimal conditions for mutagenesis by ozone in *Escherichia coli* K12. **Mutat. Res., Fundam. Mol Mech Mutagen**, v. 24, p. 271–279, 1974.

HAMELIN, C.; SARHAN, F.; CHUNG, Y. S. Ozone induced DNA degradation in different DNA polymerase I mutants of *Escherichia coli* K12. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 77, p. 220–224, 1977.

HAMELIN, C.; SARHAN, F.; CHUNG, Y. S. Induction of deoxyribonucleic acid degradation in *Escherichia coli* by ozone. **Experientia**, v. 34, p. 1578–1579, 1978.

- HAN, J. H. et al. Cleaning hospital room surfaces to prevent health care–associated infections. *Annals of Internal Medicine*, v. 163, n. 8, p. 598-607, 2015.
- HUDSON, J.B.; SHARMA, M.; PETRIC, M. Inactivation of *Norovirus* by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J Hosp Infect*, v. 66, p. 40–45, 2007.
- HUNT, N. K.; MARIÑAS, B. J. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. **Water Res**, v. 33, p. 2633–2641, 1999.
- HUTH, K.C. et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. **Int Endod J**. v. 42, p. 3-13, 2009.
- IOSIFIDIS, E. et al. Differential correlation between rates of antimicrobial drug consumption and prevalence of antimicrobial resistance in a tertiary care hospital in Greece. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, p. 615-22, 2008.
- ISHIZAKI, K. et al. Effect of ozone on plasmid DNA of *Escherichia coli* in situ. **Water Res**, v. 21, p. 823–827, 1987.
- KLEIN, E.Y. et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 115, p. E3463–E3470, 2018.
- KOMANAPALLI, I.R.; LAU, B.H. Inactivation of bacteriophage lambda *Escherichia coli* and *Candida albicans* by ozone. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 49, 766–769, 1998.
- LALL, N. et al. Viability Reagent, PrestoBlue, in Comparison with Other Available Reagents, Utilized in Cytotoxicity and Antimicrobial Assays. **Int J Microbiol**, p. 420601, 2013.
- LARA, L.S.; MOREIRA, C.S.; CALVET, C.M.; LECHUGA, G.C.; SOUZA, R.S.; BOURGUIGNON, S.C.; FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.; PEREIRA, M.C.S. Efficacy of 2-hydroxy-3-phenyl sulfanyl methyl-[14]-naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: Identification of a promising hit compound. **Eur. J. Med. Chem.** 144, 572–581, 2018.
- LAX, S.; GILBERT, J.A. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. **Trends Mol Med**, v. 21, p. 427-32, 2015.

LISBOA, T. et al. Prevalência de Infecção Nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. **Rev Bras Ter Int**, v. 19, p. 414-20, 2007.

MAGILL, S.S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections, **N Engl J Med**, 370:1198–208, 2014.

MAGILL, S.S. et al. Changes in prevalence of health care–associated infections in U.S. Hospitals. **N Engl J Med**, v. 379, p. 1732-44, 2018.

MANOTO, S.L.; MAEPA, M.J.; MOTAUNG, S.K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. **Saudi J of Biological Sciences**, v. 25, p. 672-679, 2016.

Manual da qualidade, método da diluição de uso. Rev. 10. In: **Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ**, 2013. Seção 10. 21 p. (65.3210.007 rev. 10).

MARTINELLI, M. et al. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. **J Prev Med Hyg**. v. 58, n. E48–E52, 2017.

MASAOKA, T. et al. Ozone decontamination of bioclean rooms. **Appl Environ Microbiol**, v. 43, p. 509-513, 1982.

MCCLURKIN, J.D.; MAIER, D.E.; ILELEJI, K.E. Half-life time of ozone as a function of air movement and conditions in a sealed container. **J of Stored Products Research**, v. 55, p. 41-47, 2013.

MATHINEU-NOLF, M. Poisons in the air: A cause of chronic disease in children. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** , 40, 483–491, 2002.

MENDES, W. et al. Características de eventos adversos evitáveis em hospitais do Rio de Janeiro. **Rev Assoc Med Bras**, v. 59, p. 42188, 2013.

MONNET, D.L. et al. Antimicrobial use and resistance in eight US hospitals: complexities of analysis and modeling. Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology Project and National NISSH. Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 19, p. 388-94, 1998.

MOORE, G.; GRIFFITH, C.; PETERS, A. Bactericidal Properties of Ozone and Its Potential Application as a Terminal Disinfectant. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 8, p.11001106, 2000.

NEMMICH, S. et al. Optimal Sizing of a DBD Ozone Generator Using Response Surface Modeling, Ozone: Science & Engineering. **The J Int Ozone Assoc**, v. 37, p. 3-8, 2015.

NOGALES, C.G.; FERREIRA, M.B.; LAGE-MARQUES, J.L. Comparison of the antimicrobial activity of three different concentrations of aqueous ozone on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis* – in vitro study. **Rev Esp Ozonoterapia**, v. 4, p. 9-15, 2014.

NOGUEIRA, JR.C.; PADOVEZE, M.C.; LACERDA, R.A. Governmental surveillance system of healthcare-associated infection in Brazil. **Rev Esc Enferm USP**, v. 48, p. 657-62, 2014.

OLIVEIRA, A. Infecções Hospitalares, Epidemiologia, Prevenção e Controle. Rio de Janeiro: **Medsj**, 2005.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. **Rev. Antimicrob. Resist.** 2016.

OSHA (1992) Occupational Safety and Health Administration; U.S. **Department of Health and Human Services** Disponível em: [http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling /data/CH\\_259300.html](http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_259300.html). Acesso em: 25/11/2020.

PAK, G. et al. Comparison of antibiotic resistance removal efficiencies using ozone disinfection under different pH and suspended solids and humic substance concentrations. **Environ Sci Technol**, v. 50, p. 7590–7600, 2016.

PARK et al. The bactericidal effect of an ionizer under low concentration of ozone. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 173, 2016.

PATIL, S. et al. Inactivation of *Escherichia coli* in orange juice using ozone. **Innovative Food Sci. Emerging Technol**, v. 10, p. 551–557, 2009.

PATIL, S. et al. Assessing the microbial oxidative stress mechanism of ozone treatment through the responses of *Escherichia coli* mutants. **J Appl Microbiol**, v. 111, p. 136–144, 2011.

PELCZAR, M.J. et al. Microbiologia, conceitos e aplicações. São Paulo: **Makron Books**, 1997.

PRÄBST, K. et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: GILBERT, D.; FRIEDRICH, O., Cell Viability Assays. **Springer Protocols**, 2017. p. 5.

RANGEL, K.; LECHUGA, G.C.; SOUZA, A.L.A.; CARVALHO, J.P.R.S.; VILLAS-BÔAS, M.H.S.; DE-SIMONE, S.G. Pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* but not other strains are resistant to the bee venom peptide melittin. **Antibiotics**, 9, 178, 2020.

RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 137– 143, 2009.

RICHARDS, M.J. et al. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 21, p. 510-5, 2000.

RISS, T.; MORAVEC, R.; NILES, A. Assay Development for Cell Viability and Apoptosis for High-Throughput Screening. In: CHEN, T. A Practical Guide to Assay Development and High-Throughput Screening in Drug Discovery. **CRC Press**, p. 109-110, 2010.

RISS, T. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. et al. **Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, p. 1012, 2017.

ROGUES, A.M. et al. Relationship between rates of antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 47 French hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 28, p. 1389-95, 2007.



ROSENBLUM, J. et al. Ozonation as a clean technology for fresh produce industry and environment: sanitizer efficiency and wastewater quality. **J Appl Microbiol.** v. 113, p. 837-845, 2012

ROSENTHAL, V.D. et al. International nosocomial infection control consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: device-associated module. **Am J Infect Control**, v. 44, p. 1495-504, 2016.

RUTALA, W. A. et al. Rapid hospital room decontamination using ultravioleta (UV) light with a nanostructured UV-reflective wall coating. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 34, n. 5, p. 527-529, 2013.

SALES, V. M. et al. Análise microbiológica de superfícies inanimadas de uma Unidade de Terapia Intensiva e a segurança do paciente. **Revista de Enfermagem Referência**, v. 4, n. 3, p. 45-53, 2014.

SCOTT, D. B. M.; LESHNER, E. C. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 85, p. 567–576, 1963.

SHARMA, M.; HUDSON, J.B. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. **Am J Infect Control**, v. 36, p. 559-63, 2008

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biol**, 4, 180–183, 2015.

SILVA, E. et al. Prevalence and outcomes of infections in Brazilian ICUs: a subanalysis of EPIC II study. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 24, p. 143-150, 2012.

SILVA, R.A. et al. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. **Acta Cir Bras**. N. 24, p. 124-7, 2009.

SOUZA, E. S. et al. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 24, n. 1, p. 220-228, 2015.

TANG, K. W.; DZIALLAS, C.; GROSSART, H.P. Zooplankton and aggregates as refuge for aquatic bacteria: protection from UV, heat and ozone stresses used for water treatment. **Environ Microbiol**, v. 13, p. 378–390, 2011.

TEERAWATTANAPONG, N. et al. A systematic review of the burden of multidrug-resistant healthcare-associated infections among intensive care unit patients in Southeast Asia: the rise of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 39, p. 525-33, 2018.

TOMASINO, S. Disinfectants. In: Official Methods of Analysis. 19th ed. **Association of Official Analytical Chemists**, cap. 6, 2012.

TORMIN, S. C. et al. Análise do efeito bactericida do ozônio sobre bactérias multirresistentes. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 61, p. 138-141, 2016.

TSENG, C.; LI, C. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. **Aerosol. Sci. Technol.** 40, 683–689, 2006.

UN (2019) UNITED NATIONS (Health Agency Steps Up Fight against 'Invisible Pandemic of Antimicrobial Resistance. **UN News**, 2019. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2019/06/1040741>. Acesso em: 24/11/2020).

VATANSEVER, F.; DE MELO, W.C.M.A.; AVCI, P.; VECCHIO, D.; SADASIVAM, M.; GUPTA, A.; CHANDRAN, R.; KARIMI, M.; PARIZOTTO, N.A.; YIN, R.; et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species Bactericidal antibiotics photodynamic therapy and beyond. **FEMS Microbiol.** Ver. 37, 955–989, 2013.

VALACCHI, G.; FORTINO, V.; BOCCI, V. The dual action of ozone on the skin. **Br. J. Dermatol.** 153, 1096–1100, 2005.

VELANO, H.E., et al. Avaliação in vitro da Atividade Antibacteriana da Água Ozonizada Frente ao *Staphylococcus aureus*, **Pesqui Odontol Bras**, v. 151, p. 18-22, 2001.

VINCENT, J.L. et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Jama**, v. 302, p. 2323-9, 2009.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. **Water Res**, v. 37, p. 1469–1487, 2003.

VON SONNTAG, C.; VON GUNTEN, U. Chemistry of Ozone in Water and Wastewater Treatment from Basic Principles to Applications; **IWA Publishing**: London, 2012.

WALLACE, C.A. New developments in disinfection and sterilization. **Am J Infect Control**. v. 44, p. e23-7, 2016.

WALTER, J. et al. Healthcare-associated pneumonia in acute care hospitals in European union/European economic area countries: an analysis of data from a point prevalence survey, 2011 to 2012. **Euro surveillance**, v. 23, p. 1-12, 2018.

WEBER, D.J.; RAASCH, R.; RUTALA, W.A. Nosocomial infections in the ICU: the growing importance of antibiotic-resistant pathogens, **Chest**, v. 115, p. 34S-41S, 1999.

WHISTLER, P.E.SHELDON, B. Comparison of ozone and formaldehyde as poultry hatchery disinfectants. **Poult Sci**, v. 68, p. 1345-1350, 1989.

WHO (2004) World Health Organization. Water Treatment and Pathogen Control, London, UK.

WHO (2011) World Health Organization. Report on the Burden of Endemic Health Care Associated Infection Worldwide. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80135>. Acesso em: 20/11/2020

WHO (2016) World Health Organization. Health care-associated infections fact sheet. Available at: [http://www.who.int/gpsc/country\\_work/gpsc\\_ccisc\\_fact\\_sheet\\_en.pdf](http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf). Acesso em: 18/11/2020.

WHO (2017) World Health Organization. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics, 2017. Disponível em: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPLShort\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPLShort_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf). Acesso em: 20/11/2020.

WHO (2020) World Health Organization - Antibiotic Resistance. **Newsroom**, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibioticresistance>. Acesso em 24/11/2020.

XU, P. et al. Wastewater disinfection by ozone: main parameters for process design. **Water Res**, v. 36, p. 1043–1055, 2002.

YAMAYOSHI, T.; TATSUMI, N. Microbicidal effects of ozone solution on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Drugs Exp. Clin. Res.**, 19, 59–64, 1993.

YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y. What is oxidative stress? **Jpn. Med. Assoc. J.** 45, 271–276, 2002.