

Artigo Original

A ATIVIDADE INIBITÓRIA DO GÁS DE OZÔNIO EM MEIO SÓLIDO E MEIO LÍQUIDO SOBRE A CANDIDA ALBICANS, IN VITRO

(THE INHIBITORY ACTIVITY OF OZONE GAS IN SOLID HALF AND HALF NET ON CANDIDA ALBICANS, IN VITRO)

Autores: Ana Paula Ferreira¹, Ana Carolina Ferro¹, Ana Utiana¹, Jane de Araujo¹, Maria Neves¹, Armando Bega².¹Discentes da Universidade Anhembi Morumbi.²Docente do Curso de Graduação em Podologia da Universidade Anhembi Morumbi.

Informações do artigo

Palavras Chave:

Candida albicans. Fator de virulência, Inativação. Ozônio.

Resumo

A *Candida albicans* é 50% mais prevalente dentre as variedades presentes na *Candidíase*, 84% das unhas dos pés são acometidas por onicomicoses. Nos últimos tempos tem se desenvolvido o uso do ozônio nas suas diversas apresentações por ser altamente oxidativo. O objetivo deste trabalho é comparar diferentes tempos e concentrações de aplicação do ozônio, sobre a inativação da *Candida albicans* in vitro. As aplicações ocorreram em meio sólido no *Bag* de polietileno, solução salina e água potável, devido o alto fator de virulência e resistência adquirida por antifúngicos. Foi utilizada a linhagem padrão de *Candida albicans* do laboratório de Humanas da Universidade Anhembi Morumbi campus centro e um equipamento gerador de ozônio marca *Ozone & Life*, modelo O&L 1.5M acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal. A eficácia dos meios ozonizados foi determinada pelo cultivo de amostras após o tratamento com ozônio em Caldo Sabouraud Dextrose e incubados a 37 °C por 24 – 48 horas quando as colônias foram contadas. Os resultados obtidos em solução salina no grupo um promoveu crescimento exponencial de UFC, em 25 minutos á $\frac{1}{4}LO_2 \times 25mg/O_3$. No grupo dois em solução salina á $\frac{1}{4}LO_2 \times 65mg/O_3$ ocorreu 100% de inativação das colônias. E na água potável e em meio sólido houve 100% de inativação.

²Autor correspondente:

Docente do Curso de Graduação em Podologia UAM; E-mail: armando.bega@gmail.com.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9820-3943>.

DOI: <https://doi.org/10.36271/iajp.v1i1.4> - Artigo recebido em: 01 de agosto de 2019 ; aceito em 15 de agosto de 2019 ; publicado em 20 de agosto de 2019. Revista Ibero-Americana de Podologia, Vol. 1, N.1, Agosto 2019. Disponível online a partir de 29 de Agosto de 2019, ISSN 2674-8215. <http://journal.iajp.com.br> - Todos os autores contribuíram igualmente com o artigo. Este é um artigo de acesso aberto sob a licença CC - BY: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0> . Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Article ID

Keywords:

Candida albicans.
Virulence factor.
Inactivation. Ozone.

Abstract

The species *Candida albicans* is 50% more prevalent among the varieties in the candidiasis, 84% of toenails are affected by onychomycosis. In recent times it has developed the use of ozone in its various presentations to be highly oxidative. The objective of this study is to compare different times and ozone application rates on the inactivation of *Candida albicans* in vitro. The applications took place on solid media in a polyethylene bag, brine and fresh water, because the high virulence factor and acquired resistance to antifungal agents. It used the standard line of Humanities Lab *Candida albicans* Anhembi Morumbi University campus center and an ozone generator equipment brand Ozone & Life, model O & L 1.5M coupled to the medical oxygen cylinder. The effectiveness of ozonized media was determined by the cultivation of samples after treatment with ozone in Sabouraud dextrose broth and incubated at 37 ° C for 24 - 48 hours when the colonies were counted. The results obtained in the saline group one promoted exponential growth of CFU in 25 minutes $\frac{1}{4}$ LO₂ x 25mg / O₃. In group two in saline will $\frac{1}{4}$ LO₂x65mg/O₃ was 100% inactivation of the colonies. And in drinking water and in a solid medium was 100% inactivation.

Introdução

A espécie *Candida albicans* é 50% mais prevalente dentre as variedades presentes na Candidíase [1]. Segundo Martins, 2009, 84% das unhas dos pés são acometidas por onicomicoses [2]. Algumas espécies de *Candida albicans* estão presentes na microbiota humana e pode se manifestar mediante á alterações do sistema, principalmente em situações como diabetes, imunossuprimidos, orticosteróides, agentes citotóxicos, antibióticos e contraceptivos orais, tendo que atravessar pela própria barreira natural do organismo para instalar a doença [3].

A *Candida albicans* são leveduras que se encontram em mucosas e na presença de compostos como soro de mamíferos, expressa seus fatores de virulência como a formação de hifas. Uma vez na corrente sanguínea tem a capacidade de invadir tecidos mais profundos, sua colonização, invasão e disseminação é facilitada pela capacidade de desenvolver em biofilme [4,5].

Entre brotamento e filamentação, o fungo ainda pode exibir uma variedade de morfologias durante seu crescimento, formando assim as pseudo-hifas. A mudança leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura e de pH [6].

A habilidade de formar biofilme descrito por Cardoso, 2013 [1], tem grande importância quando as células

estão livres e entram em contato com uma superfície sólida, assim as leveduras se aderem, formam uma espessa camada de células rica em β -1,3 - glucano, protegendo assim da ação do sistema imune do organismo humano. Os microrganismos organizados em biofilmes apresentam características de resistência, principalmente devido à penetração insuficiente de antimicrobianos, velocidade de crescimento e alteração do estágio metabólico que garante a sobrevivência de tais células em ambientes hostis. [7,8].

Segundo Barbedo, 2010 [6], ele difere as dificuldades associadas no tratamento da onicomicose sendo prolongado devido à resistência a alguns medicamentos e ao estilo de vida que expõe as unhas em situações que diferem para um resultado eficaz. A onicomicose pode ser tratada de diversas formas, como tratamentos sistêmicos e tópicos com fármacos e terapias complementares ou alternativas com produtos naturais, fitoterápicos e óleos essenciais onde traz ao paciente a facilidade, custo acessível e sem efeitos colaterais [9].

Uma das formas de tratamento que nos últimos tempos tem se desenvolvido é o uso do ozônio nas suas diversas apresentações, como em processos de desinfecção e esterilização, por ser altamente oxidativo, sendo 35 vezes mais

potente que o cloro com a vantagem de não ter resíduos tóxicos. Sendo utilizado diretamente, em água ou

em óleo para inativação de fungos, bactérias e vírus [10].

O ozônio foi descoberto em 1785 por Van Marum, mas Schonbein em 1840 evidenciou que esse odor ocorria devido a um gás específico, particular, que ele nomeou de Ozone (do grego Ozein) [11].

A Associação Brasileira de Ozonioterapia [12], afirma que o ozônio age como filtro, protegendo o planeta dos raios ultravioletas (UV) do sol. Forma-se quando as moléculas de oxigênio (O₂) se rompem, e os átomos separados se unem individualmente com outra molécula de oxigênio (O₂), formando assim o ozônio (O₃) que é um gás reativo e altamente instável, logo se recompõe a oxigênio (O₂).

Como agente farmacológico o ozônio deve ser extraído do oxigênio puro através de descargas elétricas e ser utilizado em concentrações terapêuticas variadas [13]. Mistura de (O₂) e (O₃) sob condições fisiológicas é um agente terapêutico com reatividade seletiva, os hidroperóxidos, produtos reagentes da ozonólise, atuam nos fosfolípidos da membrana celular, alcançando o meio intracelular e conseguindo, assim, influenciar o metabolismo [13]. Marques, (2008) [14], também relata que o ozonídeo age nos constituintes da membrana citoplasmática reagindo com ácidos graxos polissaturados, inibindo e bloqueando o sistema de controle enzimático, causando ozonólise com isso causa alterações da permeabilidade e a lise celular. Estas características conferem ao ozônio uma gama de aplicações, sendo utilizado em medicina como - Aplicação sistêmica via endovenosa onde ativa o metabolismo, aplicação via intramuscular, aplicação tópica por um sistema fechado de circulação do ozônio e um sistema de sucção conectado a um catalisador de ozônio, por exemplo, uma perna é colocada dentro de um Bag, feito de material ozônio-resistente, cujas bordas são vedadas junto à pele, água bidestilada ozonizada e azeite ozonizado, onde a aplicação tópica de água bidestilada ou de azeite previamente ozonizado, diretamente sobre áreas afetadas da pele. Aplicação insuflação retal que é uma via sistêmica e aplicação intra-articular para vertebral e intra discal [12].

O ozônio é um gás nocivo apenas para as vias respiratórias, devendo sua utilização ser feita sempre com cautela [13]. Marques, 2008 [14], afirma que é contra indicado associar ozônio à solução salina, por formar ácido hipocloroso, que pode provocar vasculites ou flebites.

Segundo Cepero, 2008 [15], a água ozonizada foi um dos primeiros métodos utilizados pela experiência médica, favorecendo a melhora dos processos inflamatórios

bucais e atualmente é muito utilizada em tratamentos estomacais. A pureza da água ozonizada é um fator importante para sua maior efetividade germicida, para isso recomenda – se o uso da água desmineralizada e bidestilada. Se essas recomendações não forem seguidas a concentração do gás de ozônio é reduzido.

Neste trabalho será analisada a eficácia da inativação de *Candida albicans*, in vitro, em diferentes tempos, concentrações de ozônio em solução salina, água potável e bag de polietileno, devido seu alto fator de virulência e a resistência

adquirida por antifúngicos sistêmicos, tópicos e alternativos.

Material e Método

Para desenvolver esta pesquisa utilizou-se um tubo esterilizado contendo 10 ml de salina, a partir daí desta solução foram realizadas diluições seriadas resultando uma concentração de $1,50 \times 10^3$ UFC/ml ajustada ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland executando assim um grupo controle, primeiro grupo, antes de ozonizá-lo, foi usada a diluição de *Candida albicans*. O segundo grupo recebeu o ozônio aplicado diretamente sobre a solução salina em triplicata contaminada por 25 minutos; o terceiro grupo recebeu o ozônio aplicado diretamente em água potável em duplicata por 25 minutos; o quarto grupo teve a semeadura em Placa de Petri em triplicata da salina contaminada e posteriormente recebeu o ozônio direto em Bag de polietileno por 20 minutos. A técnica foi realizada em um cone de esterilização com bico de BUNSEN para impedir contaminação cruzada. As concentrações de O₃ encontram-se nos resultados. Na sequência foram mantidas em estufa a 37°C durante 24 horas e observadas por 48 horas para futura contagem de UFC.

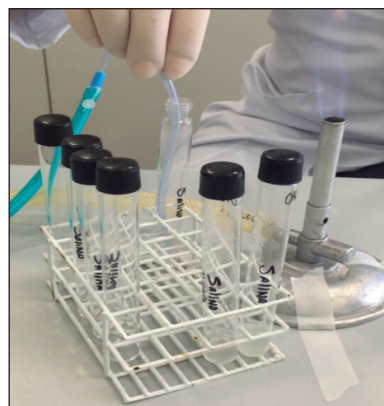


Figura 1: Tubos de meios líquidos em suspensão ozonizando. Imagem do autor.

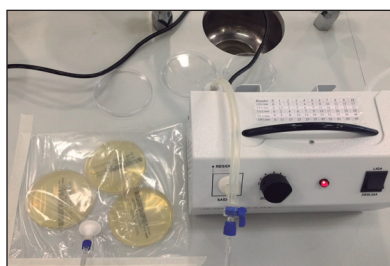


Figura 2: Placas de Petri semeadas ozonizando em triplicata. Imagem do Autor.

Resultados

De acordo com a tabela 1, houve crescimento

exponencial de 23, 54 e 77 UFC, após ozonização em solução salina a $1/4\text{L O}_2 \times 25\text{mg/ O}_3$ durante 25 minutos. Na figura 2 demonstra o percentual de crescimento microbiológico: PL1 16,5%, PL2 38,8% e PL3 54,4%. A solução salina ozonizada em triplicata a $1/4\text{L O}_2 \times 65\text{mg/ O}_3$ no mesmo tempo, inativou 100% da *Candida albicans*. As amostras de água potável em duplicata nas concentrações de: $1/4\text{L O}_2 \times 25\text{mg/ O}_3$ e $1/4\text{L O}_2 \times 65\text{mg/ O}_3$ há 25 minutos: houve 100% de inativação. E as placas de Petri em triplicata em BAG de polietileno nas concentrações de: $1/8\text{LO}_2 \times 25\text{mg/ O}_3$ e $1/8\text{LO}_2 \times 65\text{mg/ O}_3$ com exposição de 20 minutos, ocorreu 100% de inativação.

Tabela 1: Determinação das UFCs de *Candida albicans*, in vitro após exposição de ozônio em salina com $1/4\text{LO}_2 \times 25\text{mg/ O}_3$ por 25'(min.).

Tubos/Placas	UFC	Tempo	Concentração de O ₃	UFC
Tb1 – PL1	1,50	25'	25mg/ O ₃	2,3 x 10 ³ UFC
Tb1 – PL2	1,50	25'	25mg/ O ₃	5,4 x 10 ³ UFC
Tb1 – PL3	1,50	25'	25mg/ O ₃	7,7 x 10 ³ UFC

Tabela 1. Dados do autor

Gráfico1: Tb- tubo /PL- Placa. Percentual de crescimento de *Candida albicans* após o ozonização em triplicata na concentração de $1/4\text{LO}_2 \times 25\text{mg/ O}_3$ por 25'(min.).

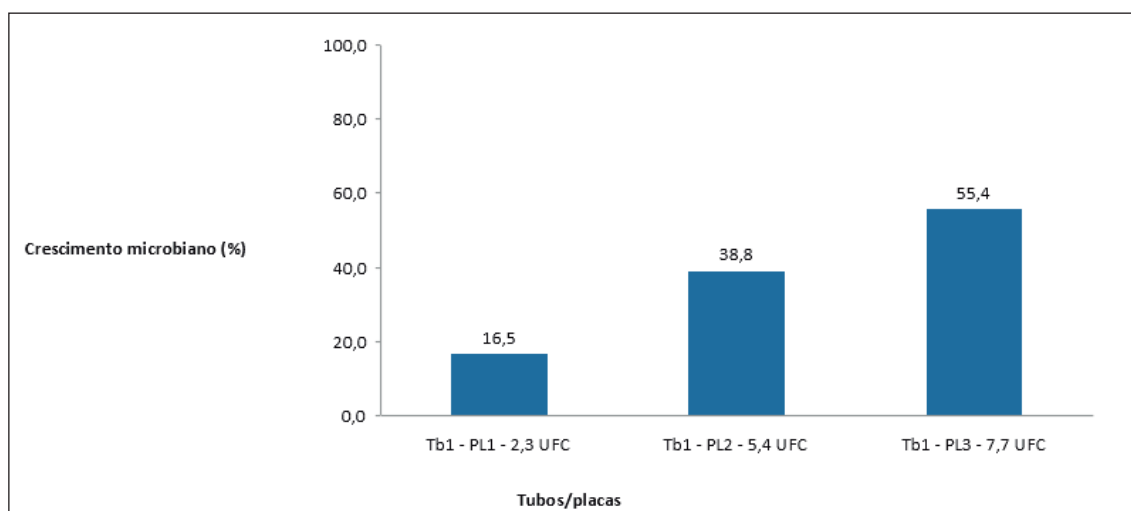


Gráfico 1. Dados do autor

Discussão

Na tabela 1 em solução salina houve crescimento na placa 1, 2 e 3, no entanto em solução salina a $\frac{1}{4}$ LO₂ x 65mg/O₃ por 25'(min.) ocorreu à inativação total das unidades formadoras de colônia, devido a maior concentração de ozônio aplicado [16], afirma que concentrações baixas de ozônio têm efeitos imunomodulador onde há suspeitas de compromisso do sistema imunológico, já as concentrações altas se utilizam especialmente em úlceras, feridas, ozonização de azeite e água [5], explana que na presença de fluidos orgânicos, a *Candida albicans* expressa seus fatores de virulência, capacitando então à invasão e disseminação na célula. Na tabela 1 comparando-se os resultados das placas de

Petri 1, 2 e 3 foi verificado que, ao utilizar-se solução salina em suspensão contendo um elevado número de UFC, não resultou na inativação total, houve crescimento de unidade formadora de colônia crescentemente, mesmo com o tempo de 25 minutos.

A solução salina em suspensão, não demonstrou a inativação total, devido sua igualdade ou semelhança de fluidos corporais [17], afirma que os estudos in vitro simulam as condições de absorção em laboratório enquanto que em estudos in vivo utilizam cobaias, logo houve crescimento de unidade formadora de colônia crescente, mesmo com o tempo de 25 minutos. Já Cardoso, 2013 [1], diz que devido o pH do meio ser ácido, proporciona a expressão dos fatores de virulência da *Candida albicans*. Assim é necessário inativação da *Candida albicans* em tempo e concentrações de ozônio maiores.

E nas ozonizações de água potável foram de 100% de inativação da *Candida albicans*. (Deboni, 2009) comparou a solução salina ozonizada com a água ozonizada, observou-se que a água ozonizada foi eficaz na redução de microorganismos, porém para ocorrer 100% da inativação do agente na salina seria necessário o aumento do tempo e concentração de ozônio em sua pesquisa.

A ozonização em meio sólido com *Bag*, onde ocorreram 100% de inativação do agente, devido às doses altas de ozônio, afirma a Declaração de Madrid sobre Ozonoterapia [16].

Conclusão

Os estudos, dentro de seus limites metodológi-

cos, permitiram concluir que a ozonização em água potável e em meios sólidos no *Bag*, inativaram todas as unidades formadoras de colônias, de acordo com Quaresma [11], nossos resultados demonstram que quanto maior a concentração de ozônio, maior será a inativação microbiológica. No entanto em solução salina ozonizada houve crescimento exponencial de UFC, devido o pH do meio ser ácido, proporcionando a expressão dos fatores de virulência da *Candida albicans* [1].

A água potável ozonizada e placa de petri com meio de cultura em Agar Sabouraud Dextrose ozonizada em *Bag* apresentaram 100% de eficiência na eliminação da *Candida albicans* em suspensão. Esses achados corroboram várias pesquisas in vitro, conforme demonstra Deboni, 2009 [18], porém se faz necessárias pesquisas in vivo pela existência de variáveis entre a barreira natural, meios ácidos e em pesquisas in vitro.

Referências bibliográficas

1. CARDOSO, TOMÉ S.; Papel do ATP na Infecção de macrófagos por *Candida albicans*. 36f. Dissertação – Faculdade De Ciências E Tecnologia Universidade De Coimbra. 2013.
2. MARTINS, GUSTAVO G.; Terapêutica De Onicomioses Humanas: Epidemiologia, Manifestações Clínicas E Uso Clínico De Antifúngicos, Belo Horizonte, 2009.
3. PEREIRA, CAROLINA Q.M.; Identificação De Espécies De Fungos Causadores De Onicomioses em Idosos Institucionalizados No município De São Bernardo Do Campo, São Paulo, 2012.
4. GOBI, GISELE L.M.; Análise Cicatricial De Úlceras Por Pressão Utilizando O Óleo De Coco Ozonizado, São José dos Campos, SP / UNICASTELO, 2013.
5. KUMAMOTO, C.A; *Candida* biofilms. Curr. Opin. Microbiol. Ed. Board. 2002; vol.5: p 608 –611.
6. BARBEDO, LEONARDO S.; SGARBI, DIANA B.G. *Candidíase*. DST – J. bras. Doenças Sex. Transm., 22(1), 22-38, 2010.
7. PEREIRA, CRISTIANE A.; Efeitos Da Terapia Fotodinâmica In Vitro Biofilmes Formados Por *Candida albicans* *Staphylococcus Aureus* E *Streptococcus Mutans* 2009 In Vitro Em *Candida albicans*, *Streptococcus Mutans*, São José Dos Campos / UNESP – Faculdade De Odontologia, 2009.

8. COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP; Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.

9. ROQUE, SUSANA S.O.; Atualização No Tratamento Das Onicomicoses. Monografia Apresentada Ao Programa De Pós-Graduação do ICS – FUNORTE - Montes Claros, MG – Núcleo Alfenas, 2013.

10. BEGA, ARMANDO; Tratado de Podologia. Segunda Edição Rev e Ampliada. São Caetano Do Sul: Yendis, 2014. P.310.

11. QUARESMA, TATIANE C.; Aplicação De Ozônio E Ultrassom Na Desinfecção Das Mãos De Profissionais Da Saúde, São José Dos Campos, 2013.

12. ABOZ, Disponível em: < www.aboz.org.br > , Acesso em 8 de Abril de 2015.

13. OLIVEIRA, JULIANA T.C.; Revisão Sistemática De Literature Sobre O Uso Terapêutico Do Ozônio Em Feridas. 256p. Dissertação – Escola De Enfermagem Da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

14. MARQUES, MARIANA L.; Estudo Da Ozonioterapia Como Contribuição Para A Odontologia Veterinária. 65f. Dissertação – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento De Cirurgia, São Paulo, 2008.

15. CEPERO, SILVIA A.M. et al, Ozono: Aspectos Básicos Y Aplicaciones Clínicas. Primeira Edição. Ciudad de La Habana, Cuba: Editora CENIC, 2008.

16. DECLARAÇÃO DE MADRID SOBRE OZONOTERAPIA; Disponível em: < www.aepromo.org/declaracion_madrid>, acesso em : 23 de maio de 2015.

17. LIMA, ROSILDA M.G.; Avaliação da solubilidade em líquido pulmonar simulado dos metais presentes no rejeito gerado por uma indústria metalúrgica de zinco, Rio de Janeiro, RJ / Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

18. DEBONI M.C.Z.; Antissepsia de aveólos pós – exodontias empregando irrigações transoperatória de solução de ozônio diluído em água. Monografia apresentada a Faculdade de odontologia da Uni. de São Paulo – São Paulo, SP, 2009.