



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Maicon Henrique Caetano

**Gás ozônio: avaliação da eficácia de desinfecção de ambientes**

São José do Rio Preto  
2018

Maicon Henrique Caetano

**Gás ozônio: avaliação da eficácia de desinfecção de ambientes**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Margarete Teresa  
Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto  
2018

Caetano, Maicon Henrique.

Gás ozônio: avaliação da eficácia de desinfecção de ambientes /  
Maicon Henrique Caetano . -- São José do Rio Preto, 2018  
63 f. : il., tabs.

Orientador: Margarete Teresa Gottardo de Almeida  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Ozônio. 3. Ozonização. 4. Desinfecção. 5. Ar -  
Qualidade. 6. Candida albicans. 7. Aspergillus fumigatus. I.  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE UNESP -  
Campus de São José do Rio Preto

Maicon Henrique Caetano

## **Gás ozônio: avaliação da eficácia de desinfecção de ambientes**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

### Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarete Teresa Gottardo de Almeida  
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira  
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Adriano Menis Ferreira  
UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

São José do Rio Preto  
07 de junho de 2018

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel Aparecido Caetano e Rosemeire Conceição do Bem Caetano, à minha irmã Emanuely Caetano e à minha avó, Alzira Conceição Teixeira do Bem, pelo incentivo, apoio e preces a mim direcionadas. Obrigado por acreditarem em meu potencial e estarem felizes por eu ter chegado até aqui. À minha querida tia Conceição Aparecida Caetano Martins (*in memoriam*) que sempre torceu e me acompanhou em todos os momentos, um exemplo de mulher, uma pessoa iluminada e que faz muita falta.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo ingresso e conclusão deste trabalho. Por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Obrigado, meu Deus, por me dares muito mais do que eu preciso, e por me abençoares muito mais do que eu mereço.

Aos meus pais Rosemeire Conceição do Bem Caetano e Manoel Aparecido Caetano, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida, pois sem eles este trabalho e muito dos meus sonhos não se realizariam. Não é só pela vida que vocês me deram que eu devo agradecer. É também por me ensinarem todos os valores que achavam importantes e por me tornarem na pessoa que sou hoje. À minha irmã do coração Emanuely Caetano, que me ama muito e por sempre estar do meu lado. À minha Vó Alzira Conceição Teixeira do Bem, que sempre ajudou e me acompanhou em todos os momentos da minha vida. Sempre torcendo e vibrando com as minhas conquistas. Sem ela este trabalho não seria possível. Amo vocês!

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, primeiramente pela oportunidade, confiança e ter acreditado que eu seria capaz de realizar este projeto. Agradeço também por tudo que me ensinou, pela paciência, dedicação, carinho e por mostrar-se sempre disposta a me ajudar. Obrigado pelos conselhos, amizade e por fazer parte do meu crescimento pessoal e profissional. Para mim você é uma inspiração e um grande exemplo de vida, foi muito bom trabalhar ao seu lado. Você foi mais que uma orientadora, foi uma mãe, uma amiga. Muito obrigado do fundo do meu coração!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elza Maria Castilho, que foi fundamental na realização deste trabalho, sempre ajudando, dando conselhos e dicas para o meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigado!

Ao meu amigo Luis Paulo Teixeira, que confiou e acreditou na minha capacidade e apresentou-me para a professora Margarete, começando assim um grande capítulo na minha vida. À Máisa Guimarães Sartim, que me ajudou a entrar no mestrado, com suas dicas, conselhos, dando apoio e me emprestando seus cadernos e livros, isso foi essencial. E também a Eduardo José de Carvalho Reis pelos conselhos e dicas para o ingresso no mestrado.

À Emília Cristina Gianizella e Thiago Henrique Lemes, duas pessoas especiais, que eu conheci no laboratório e tornaram-se grandes amigos, irmãos, parceiros, formando um trio. Agradeço a amizade de vocês, os conselhos, conversas e ótimos momentos juntos, por me aturar, sempre me ajudar e estar do meu lado em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos e companheiros do laboratório, uma segunda família: Natalia Seron Brizzotti, Emília Cristina Gianizella, Thiago Henrique Lemes, Luceli Ferreira de Souza, Mariela Domiciano Ribeiro, Bianca Gottardo de Almeida, Juliana Maria Finoti Fernandes, João Paulo Zen Siqueira, Taiza Maschio de Lima, Camila Adriane da Silva, Letícia Monteiro Bianco e Cleuzenir Toschi Gomes Barbieri, pela amizade de vocês, carinho, parceria e ajuda. Obrigado pelos ótimos momentos de descontração durante todo esse tempo! Vocês moram no meu coração! Também aqueles que não estão mais no laboratório, mas que estão ligados ao meu coração em amizade e agradecimento: Diego Maximiano da Conceição, Luis Paulo Teixeira, Crislene Barbosa de Almeida, Maísa Guimarães Sartim, Larissa Spósito, Luciani Gaspar de Toledo, Eduardo José de Carvalho Reis, Beatriz Gomes Ricardo, Matheus Aparecido dos Santos Ramos e Lorena Galete Cano da Silva.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferrari pela realização e ajuda com as análises estatísticas.

Aos professores Dr. Tiago Casella e Dr<sup>a</sup>. Natalia Martin por participarem da banca examinadora de qualificação, contribuindo com a melhoria deste projeto.

Aos membros da comissão examinadora deste trabalho, Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira e Prof. Dr. Adriano Menis Ferreira, por terem aceitado o convite e por dispensarem seu tempo na correção deste trabalho, agregando experiência e conhecimento ao mesmo.

Ao laboratório de Microbiologia e à FAMERP, pela infraestrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, professores, coordenadores e equipe técnica, pela disponibilidade, dedicação aos alunos e prontidão em esclarecer todas as dúvidas.

À OZON, pela disponibilização dos aparelhos geradores de ozônio.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os meus amigos, colegas e professores que não foram citados, mas que fizeram parte da minha formação e acreditaram em meu potencial.

Meus sinceros agradecimentos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

## RESUMO

Em serviços de saúde, a garantia de qualidade é prioritária. Neste cenário, a permanência ou ocorrência primária de micro-organismos é considerada a principal fonte de contaminação ou infecção em humanos. Além do que, as infecções fúngicas tiveram enorme importância nos últimos anos, com destaque para as espécies: *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. O uso do gás ozônio ( $O_3$ ) pode elevar os padrões de qualidade do ar e superfícies por redução da carga microbiana, dada à oxidação de compostos e, conseqüentemente a morte celular, sem deixar resíduos tóxicos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano do gás  $O_3$  sobre ar e superfícies de ambientes. Para isto, foram utilizados dois equipamentos geradores de  $O_3$  da OZON®, em dez salas, onde foram coletadas amostras com *swab* antes e após o  $O_3$ , sobre superfícies de bancadas, paredes e chão, no tempo de uma hora. O ar ambiental também foi avaliado, com uma placa de meio de cultura aberta contendo *Brain Heart Infusion Agar* DIFCO® (BHI) em todas as salas, antes e após o  $O_3$ . A atividade antifúngica foi testada, por meio de placas contendo BHI, contaminadas com culturas de *C. albicans* e *A. fumigatus* e avaliadas pelos dois aparelhos geradores de  $O_3$ , pelo tempo de uma hora, sobre as variáveis: distâncias, direcionamentos e ar condicionado ligado e desligado. Os resultados foram obtidos com base no número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os dois aparelhos mostraram atividade antimicrobiana, com diminuição do número de UFC, comparadas as placas controles. As superfícies de chão e bancadas apresentaram maior número de UFC, e ao mesmo tempo, maior inibição pelo  $O_3$ . Observou-se uma associabilidade entre as distâncias e direcionamentos, interferindo assim na atividade antifúngica produzida pelo  $O_3$ . A levedura *C. albicans* mostrou-se mais sensível ao  $O_3$  do que o fungo filamentoso *A. fumigatus*. Ressalta-se ainda que, os testes realizados com o ar condicionado desligado apresentaram melhor atividade antifúngica, independente da espécie e aparelho ozonizador. Este recurso rápido, de fácil condução, poderá compor os protocolos de higienização e desinfecção hospitalar, uma vez que, micro-organismos são eliminados das superfícies e ar.

**Palavras-chave:** Ozônio. Ozonização. Desinfecção. Qualidade do ar. *Candida albicans*. *Aspergillus fumigatus*.

## ABSTRACT

One priority in health services is to guarantee quality. In this setting, the occurrence or permanence of microorganisms is considered the main source of contamination or infection in humans. Hence, fungal infections have been considered of great importance in recent years, especially those involving the species: *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. The use of ozone gas (O<sub>3</sub>) can raise air and surface quality standards by reducing the microbial load by the oxidation of compounds and, consequently, cell death without leaving toxic waste. Therefore, the present work aimed to evaluate the antimicrobial effect of O<sub>3</sub> gas on air and ambient surfaces. Swab samples were collected from the surfaces of laboratory workbenches, walls and floors of ten rooms before and after two OZON® O<sub>3</sub> generators were used for one hour. Ambient air was also evaluated with open Petri dishes containing culture medium containing DIFCO® Brain Heart Infusion Agar (BHI) in all rooms, before and after decontamination using O<sub>3</sub>. Antifungal activity was tested using well plates containing BHI contaminated with cultures of *C. albicans* and *A. fumigatus* treated for one hour using the two O<sub>3</sub> generators in respect to the distance and direction, and whether the air conditioning was turned on or off. The results report the number of colony forming units (CFU). The two devices displayed antimicrobial activity, with a decrease in the number of CFUs compared to control well plates. The floor surfaces and workbenches presented higher numbers of CFUs, and at the same time, greater inhibition by O<sub>3</sub>. In the air decontamination tests, an association was observed between the distance and direction of antifungal activity produced by the O<sub>3</sub> generators. The yeast *C. albicans* was more sensitive to O<sub>3</sub> than the filamentous fungus *A. fumigatus*. Tests carried out with the air conditioning turned off had better antifungal activity than with the air conditioning on, independent of the species and the ozonation generator. These fast and easy-to-use devices can be used for disinfection protocols of hospitals, as microorganisms are eliminated from work surfaces and from the air.

**Keywords:** Ozone. Ozonation. Disinfection. Air quality. *Candida albicans*. *Aspergillus fumigatus*.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Histórico-ozônio</b> .....	16
<b>2.2 Produção do ozônio</b> .....	17
<b>2.3 Propriedades físico-químicas do ozônio</b> .....	18
<b>2.4 Ação antimicrobiana do ozônio</b> .....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	24
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	24
 <b>CAPÍTULO 2 – Artigo I</b> .....	 25
<b>Resumo</b> .....	27
<b>Introdução</b> .....	28
<b>Métodos</b> .....	29
<b>Resultados</b> .....	31
<b>Discussão</b> .....	33
<b>Conclusão</b> .....	35
<b>Referências</b> .....	36
 <b>CAPÍTULO 3 – Artigo II</b> .....	 40
<b>Resumo</b> .....	42
<b>Introdução</b> .....	43
<b>Materiais e Métodos</b> .....	44
<b>Resultados</b> .....	46
<b>Discussão</b> .....	48
<b>Referências</b> .....	52

<b>CAPÍTULO 4</b> .....	55
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	56
<b>Referências</b> .....	57



## 1 INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) têm aumentado em todo o mundo, principalmente associadas a micro-organismos resistentes (SALES et al., 2014). IRAS compreendem qualquer infecção que se adquire após a entrada do paciente no hospital e podem ocorrer durante a internação ou logo após a alta, desde que hajam relação com a internação ou com os procedimentos feitos durante o período. Também podem estar relacionadas com procedimentos feitos em consultórios, ambulatorios e unidades de atendimento à saúde (RATTI; SOUSA, 2009; RENNER; CARVALHO, 2013). Representam um problema de saúde pública, por aumentar as taxas de mortalidade, morbidade, o período de permanência dos pacientes no hospital e os gastos do tratamento (SOUZA et al., 2015).

O ambiente atua na transmissão de micro-organismos, sobretudo os multidrogas-resistentes, onde a contaminação de superfícies inanimadas são potenciais reservatórios de micro-organismos. Os equipamentos e as superfícies de áreas hospitalares desempenham um papel na disseminação de IRAS, como reservatórios secundários, capazes de promover contaminação cruzada. As mãos dos profissionais da saúde correspondem ao meio mais comum de transferência de patógenos (FERREIRA et al., 2013). O uso de condicionadores de ar em ambientes, mantem o ar reciclado com contaminantes biológicos ou bioaerossóis, propiciando a colonização e contribuindo para surtos de IRAS, por meio da contaminação de filtros de ar condicionado por esses agentes (SILVA et al., 2013).

Nota-se nos últimos anos que as infecções fúngicas têm aumentado, e com isso, passaram a ter uma enorme importância em instituições de assistência à saúde, devido às elevadas taxas de mortalidade e morbidade. Apesar de novas espécies fúngicas serem identificadas, as infecções mais predominantes são causadas por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013; PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

A levedura *Candida albicans* faz parte da microbiota humana normal, mas quando acontece uma ruptura do equilíbrio biológico, por condições predisponentes, sejam patológicos, mecânicos, fisiológicos ou imunológicos, podem causar infecções. A formação de biofilme é um dos mais importantes mecanismos de virulência, e devido a essa estrutura, os antifúngicos mostram uma susceptibilidade

reduzida (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; MAYYER; WILSON; HUBE, 2013; SANTANA et al., 2013).

No ambiente hospitalar, outro agente infeccioso oportunista relevante é o *Aspergillus fumigatus*, sendo a segunda infecção fúngica mais comum. Este fungo caracteriza-se como organismo ubíquo, presente em diversos nichos ambientais, sendo principal causador de doenças respiratórias e alergias. Mediante a produção de metabólitos secundários e produção de bombas de efluxo, esta espécie torna-se um patógeno de importância clínica, devido aos fatores de virulência e resistência antifúngica (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; VAN DE VEERDONK et al., 2017).

A conservação do ambiente biologicamente seguro para a prevenção das IRAS, especialmente por contaminação cruzada, é essencial. Assim, as mãos dos profissionais da saúde, devem ser monitoradas quanto à higienização. Além disso, é fundamental que as práticas de limpeza e desinfecção (L/D) de ambientes, bem como as superfícies e equipamentos, façam parte dos programas de controle de infecção, reduzindo o risco de IRAS, cujo objetivo é reduzir a carga microbiana (FERREIRA et al., 2013; HAN et al., 2015; RUTALA et al., 2013).

Existe uma preocupação em relação à proteção dos profissionais de saúde que trabalham nos hospitais, pois os agentes químicos usados para L/D têm causado sérios impactos ambientais e danos à saúde humana. Esses problemas estão relacionados à toxicidade, às práticas e hábitos laborais e à vulnerabilidade da população exposta, conforme a frequência e tempo de exposição. Além de que, a utilização indiscriminada de desinfetantes tem provocado a seleção dos micro-organismos como resposta (CORREIA et al., 2013; FRENCH, 2004; OMIDBAKHS; SATTAR, 2006). Essa resistência dá-se por fatores intrínsecos do organismo, pelo aumento de tolerância ou resistência adquirida por alteração genética (AVANCINI; BOTH, 2017). Diante desta realidade, a busca por novos agentes antimicrobianos é fundamental, na tentativa de ajudar e prevenir as doenças infecciosas causadas por esses micro-organismos presentes nos ambientes.

Tornou-se evidente nos últimos anos o uso do gás  $O_3$  como elemento químico para controle antimicrobiano em diversas áreas. Devido ao seu alto poder oxidante se destaca como composto útil para desinfecção e/ou esterilização. Na oxidação de materiais biológicos, o efeito bactericida do  $O_3$  é maior que o cloro. O  $O_3$  atua sobre bactérias, vírus, helmintos e fungos, por meio da oxidação da parede celular, membrana citoplasmática e demais constituintes da estrutura celular microbiana,

ocasionando a sua destruição e resultante morte celular (MARTINS; KOZUSNY-ANDREANI; MENDES, 2015; TORMIN et al., 2016).

Dentre algumas aplicações do O<sub>3</sub>, podemos citar: no tratamento de água (CARDOSO et al., 2003; KOROL et al., 1995; UMAR et al., 2013); alimentos (KIM; YOUSEF; CHRISM, 1999; MURRAY et al., 2018; PONCE et al., 2010; SANTOS et al., 2016; YESIL et al., 2017); efluentes (OTURAN; AARON, 2014; WU et al., 2012); ambientes e superfícies (CAVALCANTE et al., 2014; GARCIA et al., 2008; PINTO et al., 2007); na área da saúde: em resíduos de serviços hospitalares (MARTINS; KOZUSNY-ANDREANI; MENDES, 2015), na desinfecção de máquinas de hemodiálise (CANADA et al., 2014), na odontologia (FERREIRA et al., 2013; OLIVEIRA; MENDES, 2009) e para fins terapêuticos (CARVALHO; BRIOSCHI; TEIXEIRA, 2015; MANOTO; MAEPA; MOTAUNG, 2018).

Desta forma, o O<sub>3</sub> mostra-se um composto promissor para controle antimicrobiano. Considerando o surgimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos convencionais e, conseqüentemente, desinfetantes disponíveis no mercado, utilizados nas Instituições de Assistência à Saúde, o emprego do O<sub>3</sub> 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.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico-ozônio

Em 1839, estudando a decomposição eletrolítica da água, o ozônio foi descoberto por Christian Friedrich Schonbein e só após duas décadas ficou evidentemente identificada à composição triatômica do ozônio, contendo somente oxigênio (LAPOLLI et al., 2003). Meritens, em 1866, o reconheceu como potente desinfetante de água (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; LAPOLLI et al., 2003).

A primeira aplicação do ozônio, em grande escala, ocorreu em 1893, no tratamento de água em Oudshoorn, na Holanda (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; LAPOLLI et al., 2003). Em 1897, o químico Marius Paul Otto criou a primeira companhia especializada na construção e instalação de equipamentos de ozonização, para este fim (LAPOLLI et al., 2003). A partir deste momento, foram construídas plantas de tratamento de água em Paris, Nice e Chartres na França; Wiesbaden e Paderborn na Alemanha; Niagara, no estado de Nova York nos Estados Unidos; São Petesburgo, na antiga União Soviética e Madri, na Espanha (LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991). Logo toda a Europa adotou o uso do ozônio no tratamento de água para abastecimento público (GRAHAM, 1997; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004).

Em 1982, o FDA (*Food and Drug Administration*) certifica o ozônio como um produto seguro (“General Recognized As Safe” – GRAS) para o tratamento de água engarrafada (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999). Na década de 90, o ozônio foi assegurado como uma substância GRAS em produtos alimentícios pelos Estados Unidos, promovendo um crescimento dessa aplicação no processamento de alimentos (GRAHAM, 1997).

A ozonização no Brasil passou a ser empregada a partir de 1983, como opção em relação às técnicas convencionais de pré-cloração e pré-aeração no tratamento de águas superficiais (LAPOLLI, et al., 2003).

Em 2006, foi fundada a Sociedade Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ). A Ozonioterapia consiste em um método onde o ozônio-oxigênio é empregado como agente terapêutico, em um grande número de patologias. A ABOZ trabalha para que esta prática seja realizada de maneira legal, consciente, responsável e ética (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA, 2017).

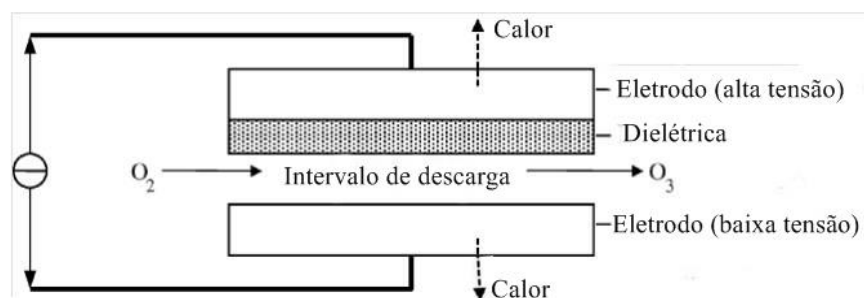
## 2.2 Produção do ozônio

A reação para a geração do ozônio é altamente endotérmica e não espontânea, onde uma molécula de oxigênio é dissociada e o oxigênio livre resultante reage com outras moléculas de oxigênio, formando a molécula de ozônio, com grande gasto de energia (RUSSEL; HUGO; AVLIFE, 1999; USEPA, 1999; VIDAL, 2003).

O ozônio é formado espontaneamente em pequenas quantidades (0,05 mg/L) quando a radiação ultravioleta, de origem solar, interage com o oxigênio, na estratosfera. Na troposfera é produzida também uma pequena quantidade de ozônio, decorrente de reações fotoquímicas entre hidrocarbonetos, oxigênio e nitrogênio, provenientes de indústrias, automóveis, florestas e ação vulcânica. Ao contrário, o gás produzido assim, é instável e decompõe-se rapidamente (HORVÁTH; BILITZKY; HUNTER, 1985).

Esse gás pode ser produzido sinteticamente por descarga eletroquímica, conhecida como efeito corona (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999). O equipamento é composto por dois eletrodos, que são submetidos a diferentes potenciais de ação, e a passagem de ar ou oxigênio puro entre os dois eletrodos gera o  $O_3$  (GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001;). É preciso gerá-lo no local onde vai ser usado, em razão de sua grande instabilidade, pois em contato com o ar, se dissocia rapidamente (LAPOLLI et al., 2003; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; USEPA, 1999). A figura 1 mostra o esquema de um gerador de ozônio pelo efeito corona.

**Figura 1** – Geração do  $O_3$  pelo método de descarga corona.



**Fonte:** Adaptado de Rice et al. (1981).

A formação do ozônio a partir do ar, em geral, depende de um pré-tratamento, que compreende: filtração, compressão, resfriamento e desumidificação. Ao contrário, quando gerado a partir do oxigênio puro, é preciso um tanque de oxigênio líquido, precedido de um evaporador (LAPOLLI et al., 2003).

### 2.3 Propriedades físico-químicas do ozônio

O ozônio é uma molécula composta por três átomos de oxigênio, sendo um gás instável, parcialmente solúvel em água, de odor típico e penetrante (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; LAPOLLI et al., 2003; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; SAINI, 2011). É facilmente detectado em temperatura ambiente, em concentrações baixíssimas (0,01 a 0,05 mg/L) e se apresenta como um gás incolor. Em concentrações mais elevadas, passa a ter uma coloração azulada (RICE et al., 1981; LANGLAIS; RECKHOW; BRINK, 1991; USEPA, 1999; LAPOLLI et al., 2003; SILVEIRA, 2004). Na tabela 1 estão registradas as principais propriedades físico-químicas do ozônio.

**Tabela 1:** Principais propriedades físico-químicas do ozônio.

<b>Propriedades físico-químicas</b>	
Massa molar	48 Da
Massa específica (0°C e 101,3 kPa)	2,154 kg/m <sup>3</sup>
Ponto de ebulição	-111,9 ± 0,3 °C
Ponto de fusão	-192,5 ± 0,3 °C
Solubilidade em água a 0°C	20 g/m <sup>3</sup>
Solubilidade em água a 30°C	1,5 g/m <sup>3</sup>
Temperatura crítica	-12,1 °C
Pressão crítica	5,53 MPa

**Fonte:** Vidal (2003); Manley et al. (1967 apud Guzel-Seydim; Greene; Seydim, 2004).

Em comparação a outros agentes oxidantes, o ozônio é o segundo mais potente, devido ao seu alto potencial de oxidação (2,07 mV). Perde apenas para o flúor (3,06 mV) (RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; LAPOLLI et al., 2003; GUZEL-SEYDIM; GREENE; SEYDIM, 2004). Na tabela 2 é mostrado o valor do potencial de oxidação do ozônio comparado a outros agentes oxidantes.

**Tabela 2:** Agentes oxidantes e respectivos potenciais de oxidação.

<b>Agente oxidante</b>	<b>Potencial de oxidação (mV)</b>
Flúor	3,06
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36

**Fonte:** Manley et al. (1967) apud Guzel-Seydim; Greene; Seydim (2004).

Em solução aquosa, o ozônio é parcialmente instável e apresenta meia-vida que varia de 20 a 30 minutos a 20°C, em água destilada (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; VIDAL, 2003; WICKRAMANAYARE, 1991). Contudo, alguns estudos mencionam uma meia-vida de 165 minutos (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001; RICE et al., 1981; VIDAL, 2003; WALTER; SHERMAN, 1976; YANG; CHEN, 1979). Na fase gasosa, o ozônio além de ser mais estável, possui uma meia-vida de 12 horas no ar atmosférico, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (DI BERNARDO; DANTAS, 2005; GRAHAM, 1997; RICE et al., 1981; RUSSEL; HUGO; AVLIFFE, 1999; VIDAL, 2003; WICKRAMANAYE, 1991).

#### **2.4 Ação antimicrobiana do ozônio**

O ozônio apresenta atividade antimicrobiana contra fungos filamentosos, leveduras, vírus, bactérias e protozoários, além de esporos bacterianos e fúngicos, devido ao seu alto poder oxidante (BIALOSZEWSKI et al., 2010; KIM; YOUSEF; CHRISM, 1999; NAGAYOSHI et al., 2004b; SADATULLAH; MOHAMED; RAZAK, 2014; STÜBINGER; SADER; FILIPPI, 2006).

A inativação de micro-organismos pelo ozônio é um processo complexo, pois ataca vários constituintes celulares: proteínas, lipídios insaturados, enzimas respiratórias, peptidoglicano e ácidos nucleicos (ARANA et al., 1999; BABLON et al., 1991; HUNT; MARIÑAS, 1997; SEIDLER et al., 2008; VICTORIN, 1992; ZHANG et al., 2011).

A ação do ozônio sobre os micro-organismos ocorre pela oxidação de glicopeptídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, alterando a permeabilidade e causando rapidamente a lise. Ao adentrar no interior da célula, o  $O_3$  recombina-se com elementos citoplasmáticos, provocando a oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, ocasionando a clivagem e resultante morte celular. O  $O_3$  ataca também grupos sulfidríla de enzimas, ocasionando o colapso da atividade enzimática celular. Além disto, altera as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos, como acontece com determinados vírus, onde é destruído seu RNA e ainda altera as cadeias polipeptídicas do capsídeo protéico (HUNT; MARIÑAS, 1999; MARTINS; KOZUSNY-ANDREANI; MENDES, 2015; TORMIN et al., 2016).

Alguns fatores podem influenciar essa atividade antimicrobiana, como: concentração do ozônio, tempo de exposição e a espécie microbiana (BAYSAN; WHILEY; LINCH, 2000; CELIBERT; PAZERA; LUSI, 2006; HASS & KAYMAK, 2003; LAPOLLI et al., 2003; LUDDEKE et al., 2015).

Diversos estudos listados a seguir (Quadro 1), comprovam as mais diversas formas do uso do ozônio na microbiologia. Nota-se que não há um padrão em relação aos protocolos, em relação aos métodos de aplicação, concentração, tempo de exposição, tipo de equipamento e muito menos os propósitos a que são destinados. No entanto, a ação antimicrobiana é demonstrada nestas pesquisas. Torna-se imprescindível o desenvolvimento e a realização de estudos controlados e que estabeleçam dosagens específicas e melhorem os métodos e os resultados obtidos.

### Quadro 1 – Aplicações do ozônio na microbiologia.

Autor/Data	Tipo de micro-organismo	Concentração de ozônio	Tempo de contato	Potencial de ação (Redução em log ou contagem)	Material testado
<b>FINCH; SMITH; STILES (1988)</b>	Bactéria	4,4 a 800 microgramas/L	30 a 120 segundos	0,5 a 6,5 logaritmos (log) em contagem	População de <i>E. coli</i>
<b>RAMIREZ et al. (1994)</b>	Bactéria	8% (p / p)	15 segundos	1 log	Pele de frango inoculada com <i>Salmonella enteritidis</i>
<b>KOROL et al. (1995)</b>	Várias bactérias	0,33 mg/L	_____	5 log	Amostras de água inoculadas artificialmente
<b>TORRES; REGÊ FERREIRA; RÍMOLI (1996)</b>	Não especificado	2,1 Partes por milhão (PPM)	_____	95%	Carcaças de frango
<b>DAVE et al. (1998)</b>	Bactéria	1,5 PPM	_____	6 log	População de <i>Salmonella enteritidis</i> em água destilada
<b>KIM; YOUSEF; CHRISM (1999)</b>	Bactérias	1,3 Milimolar (mM)	3 minutos	2 log Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g) em contagem total	Alface picada
<b>VELANO et al. (2001)</b>	Bactéria	_____	_____	100%	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>CARDOSO et al. (2003)</b>	Micro-organismos aeróbios heterotróficos /bactérias	4 mg/L	2 minutos	13% a 100%	Sanitização de galões de água de 20 Litros
<b>NAGAYOSHI et al. (2004a)</b>	Bactérias	_____	_____	Viabilidade diminuída	Dentes bovinos contaminados com <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Streptococcus mutans</i>
<b>PEREIRA et al. (2005)</b>	Bactérias	0,4% (99,6% restante de oxigênio)	1 hora	100%	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na concentração de 10 <sup>4</sup> UFC/mL
<b>PINTO et al. (2007)</b>	Fungos ambientais	30 mgO <sub>3</sub> /h	_____	Superfície dos queijos (0,74 log <sub>10</sub> ); superfície das prateleiras (0,91 log <sub>10</sub> ); Ar (1,5 log <sub>10</sub> )	Sala de maturação de queijos parmesão tipo Grana
<b>GARCIA et al. (2008)</b>	Micro-organismos aeróbios mesófilos; fungos filamentosos e leveduras	_____	30 minutos	Micro-organismos aeróbios mesófilos (71,11%); fungos filamentosos e leveduras (98,38%)	Descontaminação de salas cirúrgicas
<b>HUTH et al. (2009)</b>	Bactérias e leveduras planctônicas; biofilme mono-espécie	1,25 a 20 microgramas por mililitro (µg/mL)	1 minuto-culturas planctônicas 10 minutos – biofilme	5 µg/mL de ozônio aquoso eficaz para células planctônicas 20 µg/mL eficaz para biofilme	Canais radiculares de dentes
<b>PONCE et al. (2010)</b>	Mesófilos aeróbios, fungos filamentos, leveduras e coliformes	50 mg.L <sup>-1</sup>	30 e 60 minutos	Redução significativa em 1,3 ciclos log a contagem de fungos e	Morangos

					leveduras. Coliformes a 45 °C não foram encontrados em morangos após a aplicação dos tratamentos de sanificação adotados.
<b>BIALOSZEWSKI et al. (2011)</b>	Biofilmes de bactérias	1,2 - 3,6 µg/mL	Menos de 30 s	Queda brusca de células viáveis	Cepas clínicas de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>FONTES et al. (2012)</b>	Bactérias	20 µg de O <sub>3</sub> / mL	5 minutos	Inibição do crescimento de todas as cepas	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na concentração de 10 <sup>5</sup> bactérias/prato
<b>CASE et al. (2012)</b>	Biofilme mono-espécie de bactéria	140 PPM	120 segundos	Ineficaz na eliminação total do biofilme, porém útil como adjuvante na desinfecção	Canais radiculares de dentes extraídos
<b>KATTI; CHAVA (2013)</b>	Bactérias anaeróbias gram-negativas	2,40 mg/Litro.	40 segundos (três vezes na semana, durante duas semanas)	Eficaz na redução das bactérias <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>	Tecido periodontal de pacientes com periodontite crônica
<b>CAVALCANTE et al. (2014)</b>	Micro-organismos aeróbios mesófilos e fungos filamentosos	0,03 mg.L <sup>-1</sup>	60 dias	Ar de circulação e superfícies internas da câmara, respectivamente, 0,81 e 1,01 ciclos logaritmos	Sanitização de câmaras frias para a estocagem de queijo minas frescal
<b>AL-SAAD et al. (2015)</b>	Biofilmes e células planctônicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	0,1 mg / minuto	15 a 360 minutos	Redução de 99% de células planctônicas em 15 minutos de exposição. Erradicação total do biofilme em 360 minutos de exposição.	Suspensões de 1 × 10 <sup>9</sup> CFU/mL de <i>S. aureus</i> e Biofilme de <i>S. aureus</i> em discos de liga de titânio
<b>SANTOS et al. (2016)</b>	Fungos filamentosos e leveduras	concentração de 10,13 mg L <sup>-1</sup> , em fluxo contínuo de 1,0 L min <sup>-1</sup>	12, 24, 36, 48 e 60 horas	Redução em 3,8 ciclos log (100%) na contagem de leveduras e inibição total dos fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Grãos de arroz inoculados com <i>Penicillium spp.</i> e <i>Aspergillus spp.</i>
<b>YESIL et al. (2017)</b>	Bactéria	1,5 g de ozônio por kg de mistura de gás	30 minutos	Populações iniciais aproximadas de 10 <sup>8</sup> , 10 <sup>7</sup> e 10 <sup>5</sup> : 0,2, 2,1 e 2,8 log CFU/g, respectivamente e em inóculo a 1,4 x 10 <sup>3</sup> CFU/g: <3 MPN (maior que 3	Folhas de espinafre inoculadas com <i>Escherichia coli</i> O157:H7 em populações iniciais aproximadas de 10 <sup>8</sup> , 10 <sup>7</sup> e 10 <sup>5</sup> CFU/g e 1,4 x 10 <sup>3</sup> CFU/g (que se aproxima do nível de contaminação

				log de redução	natural)
<b>MURRAY et al. (2018)</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>	6 g/h	20 minutos	Redução de 2,12 a 3,07 log UFC	Maças

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito antimicrobiano do gás ozônio sobre ar e superfícies presentes em ambiente experimental.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana do gás ozônio, gerado por dois equipamentos, sobre o ar e superfícies: chão, bancadas e paredes, em dez salas;
- Avaliar e comparar a atividade antifúngica do gás ozônio produzido por dois equipamentos geradores de O<sub>3</sub>, sobre superfície de meio de cultura contaminadas com *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, em diferentes distâncias e posicionamentos, em ambiente com ou sem ar condicionado ligado;

***Capítulo 2 – Artigo 1***

---

**Gás ozônio: avaliação do potencial desinfetante sobre o ar e superfícies**

Maicon Henrique Caetano<sup>1</sup>

Elza Maria Castilho<sup>2</sup>

João Paulo Zen Siqueira<sup>2</sup>

Adriano Menis Ferreira<sup>3</sup>

Denise de Andrade<sup>4</sup>

Álvaro Francisco Lopes de Sousa<sup>4</sup>

Marcelo Alessandro Rigotti<sup>3</sup>

Margarete Teresa Gottardo de Almeida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Câmpus São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Conflitos de interesse: não há conflitos de interesse a declarar.

Autor correspondente

Maicon Henrique Caetano

Av. Brigadeiro Faria Lima, 5641,

São José do Rio Preto, SP, Brasil.

CEP 15090-000

maiconhenrique28@hotmail.com

Artigo a ser submetido na revista Acta Paulista de Enfermagem, de acordo com as normas e formato.

**Resumo**

**Objetivo:** Avaliar o potencial de desinfecção do gás ozônio (O<sub>3</sub>) sobre o ar e superfícies de dez salas.

**Métodos:** Estudo transversal realizado em dez salas de um laboratório de pesquisa. As superfícies demarcadas do chão, parede e bancada foram avaliadas, quanto à presença ou ausência de micro-organismos, a partir de coletas feitas com *swab* umedecido em água destilada estéril, em dois tempos distintos, antes e após a exposição do O<sub>3</sub>, gerado por dois equipamentos distintos. Após este procedimento, o *swab* foi inoculado na superfície do meio de cultura *Brain Heart Infusion Agar* DIFCO® (BHI), seguindo-se a incubação a 35°C por 24h. Para análise microbiológica do ar, uma placa com BHI foi exposta aberta por uma hora, para todas as salas, antes e após o tratamento do gás O<sub>3</sub> e incubadas segundo os mesmos critérios.

**Resultados:** A atividade antimicrobiana do O<sub>3</sub> gerado por ambos os equipamentos foi efetiva para todas as áreas investigadas, com registros de redução do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O potencial de desinfecção dos aparelhos foi avaliado e se manteve próximo para os critérios de análise adotados, no entanto, alguns parâmetros das áreas investigadas apresentaram resultados com diferenças significativas de maior efetividade do ozônio, com destaque às áreas do chão e bancada.

**Conclusão:** A ozonização do ambiente para os critérios aqui investigados, se constitui como um procedimento prático, factível de descontaminação de ar e superfícies, podendo constituir novos protocolos de higienização para segmentos da área de saúde. Adequação de tempo de exposição e concentração do O<sub>3</sub> poderão melhorar os padrões de desinfecção e ou esterilização de ambientes.

**Descritores:** Ozônio; Ozonização; Desinfecção; Salas; Qualidade do ar

## Introdução

O controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) representa um assunto relevante para a saúde pública, motivo de morbidade, mortalidade e grandes custos.<sup>(1-3)</sup>

O ambiente participa efetivamente na transmissão de micro-organismos, onde a contaminação de superfícies inanimadas é o potencial reservatório. Os equipamentos e superfícies de áreas hospitalares exercem um papel na disseminação de IRAS, muitas vezes, como reservatórios secundários, sendo capaz de promover contaminação cruzada.<sup>(4)</sup> Neste cenário, o uso de condicionadores de ar, como prática de climatização ambiental, mantém o ar reciclado com partículas microbianas e aerossóis, que comprometem a qualidade do mesmo, e se constitui como fator de risco para doença infecciosa.<sup>(5)</sup>

As práticas de limpeza e desinfecção (L/D) de ambientes, bem como a higienização de superfícies e equipamentos, fazem parte dos programas de controle de infecção, na tentativa de adequar o ambiente, minimizando o risco de doenças.<sup>(4,6,7)</sup> Neste cenário, o uso de desinfetantes é uma prática padrão para o controle microbiano, incluindo a vaporização com formaldeído, ácido peracético ou clorexidina, hipoclorito de sódio e formulações isoladas ou combinadas com peróxido de hidrogênio.<sup>(8)</sup> Tais métodos têm algumas desvantagens como, o alto custo, a prática laboral de preparo, além do potencial para inalação dos vapores tóxicos pelos profissionais que atuam próximos aos produtos.<sup>(9,10)</sup>

O ozônio (O<sub>3</sub>) vem sendo utilizado como elemento químico de controle de micro-organismos para diversos segmentos da área da saúde, como tratamento aos resíduos hospitalares<sup>(11)</sup>, como antissépticos para cavidade oral e superfície corporal<sup>(12)</sup>, na desinfecção de máquinas de hemodiálise<sup>(13)</sup>, na descontaminação de salas cirúrgicas<sup>(14)</sup>, entre outros.

Considerando o alvo microbiano, é conhecido que o O<sub>3</sub> atua na oxidação de glicopeptídeos, glicoproteínas e aminoácidos da parede celular, modificando a permeabilidade e ocasionando a lise celular. Ao penetrar no interior da célula, o O<sub>3</sub> recombina-se com elementos citoplasmáticos, acarretando a oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, conseqüentemente a clivagem e morte celular. Além disso, o O<sub>3</sub> promove o colapso da atividade enzimática celular, atacando os grupos sulfidrila de enzimas e também modifica as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos.<sup>(11,15,16)</sup>

Neste contexto, o objetivo do atual estudo foi avaliar o potencial de desinfecção do gás O<sub>3</sub>, sobre o ar e superfícies de dez salas laboratoriais.

## Métodos

O presente estudo de caráter descritivo transversal foi realizado em dez salas internas de um laboratório de pesquisa.

### Avaliação da atividade antimicrobiana do gás O<sub>3</sub>

Dez salas de ambiente controlado, com área de 9m<sup>2</sup>, foram submetidas à análise microbiológica antes e após uma hora de exposição do gás O<sub>3</sub>, gerado por dois equipamentos, conforme as especificações abaixo descritas: Geradores de O<sub>3</sub> - GEO 20000/AR-TD (Mod.I) e GEO 20000/AR (Mod.II), produzidos pela empresa OZON®, quadro 1. Os experimentos conduzidos pelos dois equipamentos I e II, ocorreram num intervalo de 6 meses.

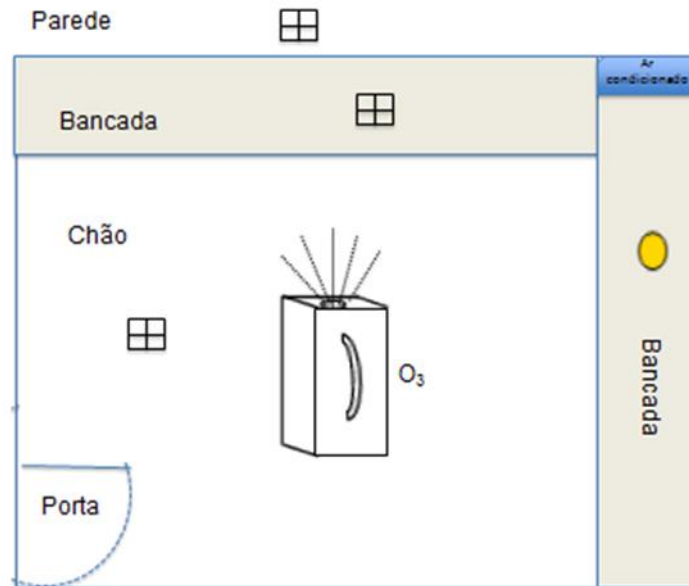
**Quadro 1. Modelos GEO 20000/AR-TD (Mod.I) e GEO 20000/AR (Mod.II)**

Especificações técnicas	GEO 20000–AR/TD (Mod.I)	GEO 20000/AR (Mod.II)
Vazão (m <sup>3</sup> /h)/ppm ozônio	200 – 2,0 ppm	100 – 2,1 ppm
Umidade relativa máxima (%)	75	75
Temperatura de trabalho (°C)	6 – 35	5 – 40
Potência nominal (W)	135	127
Tensão de alimentação (V)	127	110
Peso (kg)	5,40	4,9
Área máxima de trabalho (m <sup>2</sup> )	300	300
Dimensões (cm)	18x30x47,5	18x30x37

Legenda: M<sup>3</sup>/H – Metro cúbico por hora; % - Porcentagem; °C – Grau Celsius; W – Watt; V – Volt; KG – Kilograma; M<sup>2</sup> – Metro quadrado; CM – Centímetro; PPM – Partes por milhão

Para a investigação microbiológica de superfície da parede, chão e bancada, a coleta foi conduzida por um *swab* pré-umedecido em água destilada estéril, e, posto em contato sobre área específica de um quadrante de 30X30cm<sup>2</sup>. Seguiu-se com a inoculação imediata do mesmo na superfície de meio de cultura contendo BHI e incubação a 35°C por 24 horas. Na etapa subsequente do experimento, o equipamento gerador de O<sub>3</sub>, localizado no chão da parte central das salas, foi ligado por uma hora, e a área de investigação mantida fechada e lacradas durante todo o procedimento de desinfecção, sem interferência alguma. Ao término deste

período, nova coleta foi elaborada, utilizando-se um outro *swab*, agora, submetido ao contato da superfície diametralmente oposta do quadrante, seguindo-se os procedimentos de análise como da primeira etapa. A figura 1 ilustra as áreas investigadas, bem como a disposição do aparelho gerador de  $O_3$ .



**Figura 1.** Figura ilustrativa da disposição do ozonizador e pontos coletados  
**Legenda:**  $O_3$  – Aparelho gerador de gás ozônio;  $\square$  - Pontos de coleta;  
 ● - Meio de cultura BHI Agar DIFCO® para análise da qualidade do ar

O ar ambiental, antes e após uma hora de exposição do gás  $O_3$ , constituiu como um parâmetro de investigação, com exposição de placas de Petri, contendo BHI, mantidas abertas por uma hora e incubação das mesmas a  $35^\circ C$ , por 24 horas. Registros de temperatura e umidade das salas foram monitorados.

A ação antimicrobiana foi elaborada por contagem das UFC na superfície da placa de Petri, do inóculo oriundo das superfícies de chão, bancada, parede e ar do ambiente, antes e após o tratamento com  $O_3$ .

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística, onde foi aplicado o teste t pareado para comparar duas amostras, antes e depois, ou seja, verificar se existe diferença significativa de uma variável entre dois grupos de interesse e o teste de Wilcoxon matched pairs test para verificar de modo geral a eficiência dos aparelhos ozonizadores.

## Resultados

A atividade antimicrobiana do gás ozônio foi efetiva para todas as áreas estudadas, com registros de redução do número de UFC, frente aos dois equipamentos (Quadro 2 e 3).

Considerando-se a atividade do ozônio gerado pelo equipamento I, no chão de todas as salas, houve redução da carga microbiana (UFC) e, negatização da contagem para sala 1. Este evento também foi observado para as bancadas, com a exceção da sala 4, que manteve a mesma contagem de colônias, antes e após o ozônio. Considerando-se as paredes, 50% apresentaram redução da contaminação microbiana. Valorizado o ar ambiental como objeto de análise, notou-se uma redução da contaminação em sete salas, sendo que as demais, não foram detectados microrganismos nem antes (A) e após (D) o tratamento.

**Quadro 2. Apresentação numérica da UFC e percentual obtidos antes (A) e após (D) o tratamento de ozônio (APARELHO I) em dez salas**

Local	Sala 1	Sala 2	Sala 3	Sala 4	Sala 5	Sala 6	Sala 7	Sala 8	Sala 9	Sala 10
Chão										
A (UFC)	1	7	2	19	9	17	110	10	11	30
D (UFC)	0	5	1	4	6	10	105	7	5	25
%	100	29	50	79	33	41	5	30	55	17
Bancada										
A (UFC)	10	7	10	2	32	30	18	3	12	44
D (UFC)	7	5	5	2	31	21	2	2	6	10
%	30	29	50	0	3	30	89	33	50	77
Parede										
A (UFC)	1	0	1	1	1	14	0	3	2	1
D (UFC)	0	0	1	1	1	8	0	0	0	0
%	100	0	0	0	0	43	0	100	100	100
Ar										
A (UFC)	0	1	1	3	1	11	0	2	0	6
D (UFC)	0	0	0	1	0	6	0	0	0	3
%	0	100	100	67	100	45	0	100	0	50

Legenda: A – Antes; D – Após; % - Percentagem de redução microbiana

Os resultados obtidos da atividade antimicrobiana do gás ozônio frente ao equipamento II, estão apresentados no Quadro 3. Novamente, ficou evidente a atividade antimicrobiana, uma vez que houve redução da UFC para todas as variáveis estudadas, como ar e superfícies, antes e após o tratamento. Foi observada apenas em duas salas (4 e 9), a manutenção do número de UFC para os dois tempos de investigação.

**Quadro 3. Apresentação numérica da UFC e percentual obtidos antes (A) e após (D) o tratamento de ozônio (APARELHO II) em dez salas**

Local	Sala 1	Sala 2	Sala 3	Sala 4	Sala 5	Sala 6	Sala 7	Sala 8	Sala 9	Sala 10
Chão										
A (UFC)	89	479	309	94	193	182	782	186	55	114
D (UFC)	22	39	68	74	162	69	167	131	53	74
%	75	92	78	22	16	62	79	30	4	35
Bancada										
A (UFC)	23	36	0	281	5	15	9	73	26	54
D (UFC)	16	19	0	55	4	2	5	4	7	41
%	30	47	0	80	20	87	45	95	73	24
Parede										
A (UFC)	3	0	0	1	0	4	1	3	1	1
D (UFC)	0	0	0	1	0	3	0	1	1	0
%	100	0	0	0	0	25	100	67	0	100
Ar										
A (UFC)	0	1	1	0	1	4	0	0	2	1
D (UFC)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%	0	100	100	0	100	100	0	0	100	100

Legenda: A – Antes; D – Após; % - Percentagem de redução microbiana

Independentemente dos equipamentos, o controle microbiano foi maior para as áreas de chão e bancada. Além disso, considerando todas as áreas investigadas, o Mod.I e Mod.II apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). Quando avaliados separadamente, em relação a cada uma das superfícies e o ar ambiental, o Mod.I e Mod.II, os resultados não foram significantes, à exceção da parede ( $p = 0,0639$ ) e bancada ( $p = 0,1267$ ), respectivamente.

Ressalta-se que, os equipamentos I e II apresentam vazão de ar ozonizado e concentração distintos, isto é, de 200 e 100m<sup>3</sup>/h - 2,0 e 2,1 ppm de ozônio, respectivamente .

Os registros de temperatura e umidade das salas mostraram valores médios de 21°C e 58% de umidade para os dois momentos de investigação.

## Discussão

As limitações dos resultados deste estudo estão associadas a alguns motivos, uma vez que, o desenho transversal foi conduzido por especificação e recomendação técnica do fabricante. A condição ambiental das salas laboratoriais foi considerada como parâmetro de análise e inferência ao ambiente hospitalar, o que não descaracteriza a importância da pesquisa como protótipo para a avaliação microbiológica, em dois tempos de investigação, antes e após o tratamento de ozônio. Neste sentido, os pesquisadores pretenderam mimetizar a realidade de ambientes, quanto à ocorrência de microrganismos presentes em superfícies e no ar, introduzir o processo de desinfecção, para depois desenvolver protocolos de higienização ambiental.

Vale ressaltar que os resultados obtidos nesta pesquisa, devem ser considerados, uma vez que trouxeram contribuições expressivas da eficácia do gás ozônio como agente de desinfecção de superfície. Pode-se inferir com este estudo, que a aplicabilidade prática do O<sub>3</sub> em ambiente hospitalar melhora a condição microbiológica, prevenindo e podendo contribuir com a redução das taxas de IRAS. Além disso, considera-se que a característica portátil do equipamento torna o processo de desinfecção móvel e factível para monitoramento de áreas hospitalares específicas.

É conhecido que o O<sub>3</sub> faz parte da rotina de desinfecção e sanitização,<sup>(17)</sup> com controles para bactérias e fungos.<sup>(18,19)</sup> No atual estudo, a negatização do crescimento microbiano, ou redução da contagem de UFC em placas pós o tratamento com O<sub>3</sub> para qualquer superfície analisada, em comparação ao grupo controle, comprova a eficiência do gás ozônio nos processos de controle microbiano. Evento semelhante foi narrado por Garcia e colaboradores (2008)<sup>(14)</sup> com descontaminação de sala cirúrgica de um Hospital Veterinário. Nos dois estudos, fica evidente o potencial do O<sub>3</sub> no processo de desinfecção de ambiente, uma vez que a diminuição na contagem de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras ocorreu com frequência.

Considerando-se o processo de eliminação microbiana pelo O<sub>3</sub>, é conhecido que a destruição celular se dá por oxidação de elementos estruturais, sem especificidade a alvos presentes na célula bacteriana ou fúngica.<sup>(15)</sup> Neste sentido, organismos multirresistentes podem ser eliminados, com ampla vantagem, se comparados aos métodos de desinfecção hospitalar por outros compostos químicos.

São fundamentais nas pesquisas epidemiológicas, amostras biológicas que indicam o ambiente ou superfícies como prováveis reservatórios na transmissão de IRAS.<sup>(1,20,21)</sup> No

ambiente hospitalar, a limpeza terminal é feita abrangendo as áreas e superfícies próximas ou em contato com o paciente, após a saída do mesmo em casos de óbito, transferência, término de isolamento.<sup>(21,22,23,24)</sup> Apesar dos esforços, nem sempre o resultado dos processos de limpeza e desinfecção é satisfatório.<sup>(25,26)</sup> O uso do gás ozônio na pesquisa traz comprovação científica sobre o potencial controle microbiano, desta forma, o O<sub>3</sub> mostra-se um composto capaz de ser utilizado como procedimento de desinfecção de ambiente constituintes de área da saúde.

Nesta pesquisa, buscou-se avaliar diferenças entre dois equipamentos geradores de O<sub>3</sub> em relação ao potencial antimicrobiano sobre as mesmas condições na desinfecção de ambientes, com destaque a vazão e potência nominal dos aparelhos. Os resultados mostraram diferenças significativas para alguns parâmetros, porém de modo geral, de um modelo para outro, o potencial de desinfecção foi próximo. Protocolos inovadores poderão ser criados com o objetivo de melhorar o padrão antimicrobiano aqui detectado.

Os valores de UFC de uma sala para outra apresentaram diferenças, isso mostra que um ambiente nem sempre apresenta as mesmas condições microbiológicas, evento esperado, considerando-se o ambiente hospitalar. Com a delimitação de áreas investigadas, antes e após o tratamento, tem-se apenas uma amostragem de área da superfície, o que não garante que em toda extensão, os resultados seriam os mesmos. Mais uma vez, a prática de esterilização pelo ozônio, gerado por equipamento portátil, certamente viabiliza a implantação de novas medidas de controle microbiano no ambiente hospitalar.

As superfícies do chão e bancadas apresentaram maior contagem no número de UFC, e ao mesmo tempo corresponderam às áreas de maior inibição microbiana pelo ozônio. As partículas microbianas são densas em relação ao ar, fato que normalmente contribui para permanência de patógenos potenciais no chão de ambiente nosocomial.<sup>(27)</sup> Neste sentido, o equipamento portátil pode ser levado próximo às áreas de alta contaminação ambiental e reduzir a carga microbiana.

O efeito antimicrobiano do O<sub>3</sub> aumenta com o aumento da temperatura, da umidade relativa e o tempo de exposição, segundo os dados da pesquisa de Kim, Yousef e Dave (1999).<sup>(28)</sup> No atual estudo, estes critérios foram avaliados e mantidos em igualdade de condições experimentais minimizando possíveis vieses.

Deve-se considerar a pouca importância em relação à qualificação do grupo do Serviço de Limpeza e Desinfecção de Superfícies em Serviços de Saúde, essencial para a redução das IRAS. Desta forma, é fundamental que as práticas de limpeza e desinfecção de ambientes, equipamentos e superfícies façam parte das Comissões de Infecção Hospitalar,

junto com a enfermagem e serviços de limpeza, desenvolvendo atividades relacionadas a protocolos de higiene ambiental, supervisão e treinamento das equipes.<sup>(4,6,29,30)</sup> Sendo assim, a busca de novos produtos ou métodos, bem como de novas práticas hospitalares para desinfecção ou esterilização de superfícies, são imprescindíveis para o controle das IRAS e o gás ozônio surge como um composto promissor.

No geral, avaliando as pesquisas que envolveram a desinfecção de ambientes pelo O<sub>3</sub>, não excluindo nossos achados, nota-se que não há muitos estudos na literatura, porém as condições experimentais são variadas, o que sugere a necessidade de criação de protocolos bem elaborados, para fins de controle microbiano.

## **Conclusão**

Pelo presente estudo, fica evidente que o potencial antimicrobiano do O<sub>3</sub> produzido pelos dois equipamentos e, obedecidos os critérios descritos, a desinfecção é obtida com garantia. Assim a ozonização do ambiente se constitui um procedimento prático de descontaminação do ar e superfícies, factível para rotina doméstica, empresarial e hospitalar. Este recurso poderá compor os protocolos de higienização e desinfecção hospitalar, valorizada a rapidez e facilidade de execução, garantindo o controle de desenvolvimento microbiano, condição fundamental para a manutenção da qualidade ambiental e melhoria para saúde.

## **Colaborações**

Castilho EM; Brizzotti NS; Lemes TH; Almeida BG; Ribeiro MD; Siqueira JPZ; Almeida MTG colaboraram nas etapas de concepção do estudo, análise e interpretação dos dados, redação do artigo, revisão crítica relevante do conteúdo intelectual e aprovação final da versão a ser submetida.

## Referências

1. Renner JDP, Carvalho ÉD. [Microorganisms isolated from environmental surfaces of na adult ICU in a hospital in Vale of the Rio Pardo - RS]. *Rev Epidemiol Control Infect.* 2013;3(2):40–4. Portuguese
2. Brasil. Portaria N° 2.616 de 12 de maio de 1998. Ministério da Saúde [Internet]. 1998[cited 2018 Jan 31]. Available from: <http://portal.anvisa.gov>
3. Sales VM, Oliveira E, Célia R, Ramos Gonçalves F, Carvalho de Melo C. Microbiological analysis of inanimate surfaces in na Intensive Care Unit and patient safety. *Revista de Enfermagem Referência.* 2014;4(3):45–53.
4. Ferreira A, Barcelos L. [Areas of hospital environment: a possible underestimated microbes reservoir?-integrative review]. *Rev enferm UFPE on line.* 2013;7:4171–82. Portuguese
5. Silva D, Nazaré D, Muniz J, Câmara C. [Hospital-acquired infections associated with poor air quality in air-conditioned environments]. *Rev Epidemiol Control Infect.* 2013;3(4):153–7. Portuguese
6. Rutala WA, Gergen MF, Tande BM, Weber DJ. Rapid hospital room decontamination using ultraviolet (UV) light with a nanostructured UV-reflective wall coating. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(5):527-9.
7. Han JH, Sullivan N, Leas BF, Pegues DA, Kaczmarek JL, Umscheid CA. Cleaning Hospital Room Surfaces to Prevent Health Care–Associated Infections. *Ann Intern Med.* 2015;163(8):598-607.
8. Wullt M, Odenholt I. Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(10):765-768

9. French GL, Otter JA, Shannon KP, Adams NMT, Watling D, Parks MJ. 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.* 2004;57(1):31-37
10. Omidbakhsh N, Sattar SA. Broad-spectrum microbicidal activity, toxicologic assessment, and materials compatibility of a new generation of accelerated hydrogen peroxide-based environmental surface disinfectant. *Am J Infect Control.* 2006;34(5):251-257
11. Martins CC, Kozusny-Andreani DI, Mendes ECB. [Ozone in the control of microorganisms in health care waste]. *Revista Baiana de Enfermagem.* 2015;29(4):318-327. Portuguese
12. Ferreira S, Mariano RC, Garcia Júnior IR, Pellizer EP. [Ozone therapy in infection control in oral surgery]. *Revista Odontológica de Araçatuba.* 2013;34(1):36-38. Portuguese
13. Canada MLM, Abelan US, Zangaro RA, Kozusny-Andreani DI, Yamazaki RFC. Effectiveness of ozonated water in the reprocessing of blood dialyzers. *Rev. Bras. Eng. Bioméd.* 2014;30(3):215-219.
14. Garcia CA, Stanziola L, Vieira IS, Helder J, Naves JHFF, Neves SMN. [Ozone gas in the decontamination of surgical environments]. *Vet Not.* 2008;14(2):37–40. Portuguese
15. Tormin SC, Navarini A, Almeida JOCF, Travassos LHR, Negri MVG, Silva RA. [Analysis of bactericidal effect of ozone on multi-resistant bacteria]. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo.* 2016;61:138-41. Portuguese
16. Hunt NK, Mariñas BJ. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. *Water Research.* 1999;33(11):2633-2641.
17. Coelho CC de S, Freitas-Silva O, Campos R da S, Bezerra VS, Cabral LMC. [Ozonation as post-harvest technology in conservation of fruits and vegetables: A review. *R Bras Eng Agríc Ambiental.* 2015;19(4):369–75. Portuguese

18. Pinto AT, Schmidt V, Raimundo SA, Raihmer F. [Moulds control by ozonization in ripening cheese room]. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2007;35(3):333–7. Portuguese
19. Cavalcante DA, Leite Júnior BRDC, Tribst AAL, Cristianini M. [Use of gaseous ozone for sanitation cold room storage]. *Rev do Inst Laticínios Cândido Tostes*. 2014;69(2):121. Portuguese
20. Otter JA, Yezli S, French GL. The role of contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(7):687–99
21. Rutala WA, Weber DJ. Are room decontamination units needed to prevent transmission of environmental Pathogens? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(8):743–747.
22. Oliveira AC, Damasceno QS. [Surfaces of the hospital environment as possible deposits of resistant bacteria: a review]. *Rev Esc Enferm. USP*. 2010;44(4):1118–23. Portuguese
23. Creamer E, Humphreys H. The contribution of beds to healthcare-associated infection: the importance of adequate decontamination. *J Hosp Infect*. 2008;69(1):8–23.
24. Andrade D, Angerami ELS, Padovani CR. [Microbiological condition of hospital beds before and after terminal cleaning]. *Rev Saúde Pública*. 2000;34(2):163–9. Portuguese
25. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies. Brasília (DF): Anvisa [Internet]. 2012[cited 2018 Feb 07]. Available from: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/seguranca-do-paciente-em-servicos-de-saude-limpeza-e-desinfeccao-de-superficies>
26. Graziano MU, Graziano KU, Pinto FMG, Bruna CQM, Souza RQ, Lascala CA. [Efficacy of 70% (w / v) alcohol disinfection of contaminated surfaces without previous cleaning]. *Rev. Latino-Am Enfermagem*. 2013;21(2):1–6. Portuguese

27. Salimifard P, Rim D, Gomes C, Kremer P, Freihaut JD. Resuspension of biological particles from indoor surfaces: Effects of humidity and air swirl. *Science of the Total Environment*. 2017;583:241-247.
28. Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J. Food Prot.* 1999;62(9):1071–1087.
29. Fernando FSL, Ferreira AM, Colombo TE, Rubio FG, Almeida MTG. [Fungal contamination of hospital mattresses before and following cleaning and disinfection]. *ACTA Paul Enferm.* 2013;26(5):485–91. Portuguese
30. Paina T, Rodrigues J, Felipe J, Nogueira P, Paiva S. [Knowledge of housekeeping cleaners about cleaning and disinfection related to hospital infection]. *Rev Enferm UFSM.* 2015;5(1):121–30. Portuguese

***Capítulo 3 – Artigo II***

---

**Efeito do gás ozônio sobre culturas de *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*:  
avaliação de dois equipamentos ozonizadores.**

Maicon Henrique Caetano<sup>1</sup>

Elza Maria Castilho<sup>2</sup>

João Paulo Zen Siqueira<sup>2</sup>

Adriano Menis Ferreira<sup>3</sup>

Denise de Andrade<sup>4</sup>

Álvaro Francisco Lopes de Souza<sup>4</sup>

Thiago Henrique Lemes<sup>1</sup>

Mariela Domiciano Ribeiro<sup>2</sup>

Bianca Gottardo de Almeida<sup>1</sup>

Natalia Seron Brizzotti<sup>2</sup>

Marcelo Alessandro Rigotti<sup>3</sup>

Margarete Teresa Gottardo de Almeida<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Ibilce), Câmpus São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Três Lagoas, MS, Brasil

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Autor correspondente

Maicon Henrique Caetano  
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5641,  
São José do Rio Preto, SP, Brasil.  
CEP 15090-000  
maiconhenrique28@hotmail.com

Artigo a ser submetido na revista Applied Microbiology and Biotechnology, de acordo com as normas e formato.

## Resumo

Foram estudados os efeitos antimicrobianos do gás ozônio ( $O_3$ ), produzido por dois equipamentos comerciais, sobre culturas de dois fungos. Placas de Petri foram inoculadas com concentrações padrões de *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* e colocadas sobre uma bancada, em relação a três distâncias: 30cm, 1m e 2m em três direcionamentos de exposição do  $O_3$ , dois laterais e um central, com e sem ar condicionado ambiente. Ambos os equipamentos demonstraram potencial atividade antifúngica, porém, destacou-se o gerador Mod.I ( $p < 0,05$ ), que apresenta o dobro da vazão de  $O_3$ . Os resultados da atividade inibitória do  $O_3$  gerado pelo Mod.II, à exceção das culturas de *Candida albicans* na distância de 2m e, para *Aspergillus fumigatus*, nas distâncias de 1m e 2m, apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). *Candida albicans* mostrou-se mais sensível ao  $O_3$  ( $p < 0,05$ ) do que o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus*. Destaca-se ainda que, os experimentos realizados com o ar condicionado desligado comprovaram a maior atividade antimicrobiana do gás  $O_3$ . Em relação às distâncias e direcionamentos, o pior resultado foi observado para as placas de *Aspergillus fumigatus*, na distância de 2m e próximas à parede e, o melhor para as placas centrais, na distância de 30cm, para *Candida albicans*. O potencial antifúngico produzido pelos dois equipamentos, como prática de desinfecção de ambiente, é de fácil na execução. O método de desinfecção por  $O_3$  avaliado nesta pesquisa apresenta potencial antimicrobiano factível para estabelecer novos protocolos de higienização e desinfecção hospitalar, reduzindo a contaminação ambiental por fungos.

**Palavras-chave** Ozônio · Ozonização · *Candida albicans* · *Aspergillus fumigatus* · Desinfecção

## Introdução

Em Instituições de Assistência à Saúde, as infecções fúngicas têm enorme importância no cenário das doenças nosocomiais, com crescente taxas de morbidade e mortalidade. Microorganismos transmitidos pelo ar, água, alimentos, podem contaminar as superfícies corpóreas e permanecerem no ambiente hospitalar favorecendo o risco de doenças infecciosas. Diversos fungos, como oportunistas ou patógenos primários são agentes frequentes, com destaque às espécies *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (Ferreira et al., 2013; Nakamura et al., 2013; Paramythiotou et al., 2014; Sales et al., 2014).

*Candida albicans* faz parte da microbiota normal, mas mediante ruptura do equilíbrio biológico, por condições predisponentes patológicas, mecânicas, fisiológicas ou imunológicas, podem causar infecções (Mathé e Dijck, 2013; Mayer et al., 2013; Santana et al., 2013).

*Aspergillus fumigatus* é um fungo saprofítico ubíquo que libera milhões de conídios no meio ambiente e quando inalados, é causa comum de infecções invasivas, bem como agente alérgico (Kwon-Chung e Sugui, 2013; Veerdonk et al., 2017).

Tornou-se evidente nas últimas décadas que o uso do ozônio (O<sub>3</sub>) como antimicrobiano, se destaca como composto químico útil para os processos de desinfecção e/ou, esterilização devido ao seu alto poder oxidante (Martins et al., 2015). Embora os mecanismos de ação não estejam totalmente elucidados, sabe-se que o ozônio age na parede celular, devido à oxidação de glicopeptídeos, glicoproteínas e aminoácidos, modificando a permeabilidade e ocasionando a lise. Ao atingir o interior da célula, o O<sub>3</sub> é recombinado com elementos citoplasmáticos, causando a oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, acarretando a clivagem e consequente morte celular. O O<sub>3</sub> também ocasiona o colapso da atividade enzimática celular, por sua ação nos grupos sulfidríla de enzimas, além de alterar as bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos. (Hunt e Mariñas, 1999; Martins et al., 2015; Tormin et al., 2016).

Este estudo teve como objetivo comparar a atividade antifúngica do gás O<sub>3</sub> produzido por dois equipamentos comerciais, contra culturas de *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*.

## Materiais e Métodos

### Geradores de ozônio – especificações técnicas

Dois equipamentos da Empresa OZON®, denominados GEO 20000/AR-TD (Mod.I) e GEO 20000/AR (Mod.II) foram utilizados na pesquisa, cujas especificações estão indicadas no quadro 1.

**Quadro 1 Modelos GEO 20000/AR-TD (Mod.I) e GEO 20000/AR (Mod.II)**

Especificações técnicas	GEO 20000–AR/TD (Mod.I)	GEO 20000/AR (Mod.II)
Vazão (m <sup>3</sup> /h)/ppm ozônio	200 – 2,0 ppm	100 – 2,1 ppm
Umidade relativa máxima (%)	75	75
Temperatura de trabalho (°C)	6 - 35	5 – 40
Potência nominal (W)	135	127
Tensão de alimentação (V)	127	110
Peso (kg)	5,40	4,9
Área máxima de trabalho (m <sup>2</sup> )	_____	300
Dimensões (cm)	18X30X47,5	18X30X37

Legenda: M<sup>3</sup>/H – Metro cúbico por hora; % - Porcentagem; °C – Grau Celsius; W – Watt; V – Volt; Kg – Kilograma; M<sup>2</sup> – Metro quadrado; Cm – Centímetro; PPM – Partes por milhão

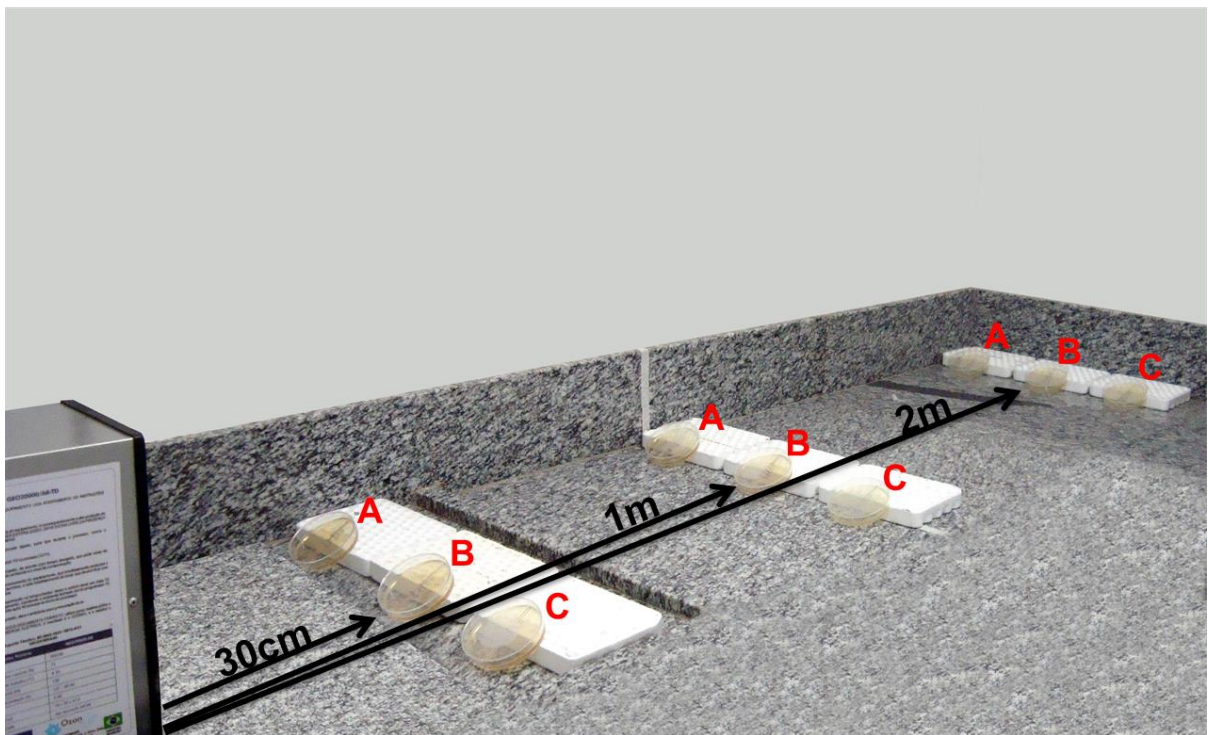
### Inóculo microbiano e local do experimento

Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028) e de *Aspergillus fumigatus* (origem ambiental), pertencentes à Micoteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São Paulo, Brasil, local de realização dos experimentos.

Os inóculos de *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* foram preparados e ajustados às concentrações de micro-organismos por espectrofotometria, em correspondência à escala 0,5 de MAC FARLAND. Dez placas de Petri contendo *Brain Heart Infusion Agar* DIFCO® (BHI) receberam 100µl do inóculo e foram estriadas com alça de Drigalski. Como controle, uma placa recebeu mesmo inóculo, porém, não sendo exposta à ozonização.

## Ozonização com geradores – Mod.I e II

Após semeadura, nove placas foram colocadas sobre a superfície de uma bancada de granito medindo 2,72m de comprimento por 0,58m de largura, em uma sala experimental de 9m<sup>2</sup>. As distâncias de 30cm, 1m e 2m foram determinadas de acordo com o posicionamento do equipamento gerador do gás ozônio. O direcionamento do fluxo de O<sub>3</sub> foi avaliado em três diferentes posições, aqui denominadas de A (placas próximas à parede), B (placas centrais) e C (placas opostas a parede), conforme demonstrado na Figura 1.



**Figura 1** Imagem fotográfica ilustrativa sobre o direcionamento e distância do equipamento gerador de ozônio, em relação às placas de Petri.

A exposição ao gás ozônio ocorreu em ambiente fechado, por uma hora. Após, as placas foram fechadas e submetidas à incubação por cinco dias, a 35°C, com observações diárias sobre o crescimento fúngico. A placa controle, apenas recebeu o inóculo e foi incubada segundo os mesmos critérios. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O procedimento acima descrito foi conduzido em dois momentos distintos: com e sem ar condicionado ligado, registrando-se a temperatura e umidade.

Após a incubação de 24h e 48h, as placas cultivadas para *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente, foram observadas quanto ao número de unidade formadora de colônias (UFC/0,1ml), comparando-as com o grupo controle.

Os dados foram submetidos à análise estatística, segundo média aritmética do crescimento fúngico dos testes em triplicata. Em seguida, foi aplicado o teste Qui Quadrado ( $X^2$ ) para verificar a existência ou não de associabilidade ou dependência entre as variáveis: direcionamentos (A, B e C) e distâncias (30cm, 1m e 2m), com e sem ar condicionado.

## Resultados

Os equipamentos geradores de ozônio (Mod.I e II) mostraram atividade antifúngica sobre as duas espécies de fungos estudadas. Foi possível observar que as placas estudadas apresentaram redução do número de UFC em relação às placas controles.

O aparelho Mod.I mostrou maior eficiência no processo de redução de carga microbiana, valorizados os parâmetros de tempo, distância e direcionamento ( $p < 0,05$ ). Para o aparelho Mod.II, os resultados apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), à exceção da cultura de *C. albicans* na distância de 2m e para *A. fumigatus*, nas distâncias de 1m e 2m, comprovando a associabilidade entre as variáveis.

Considerando-se a distância e direcionamento dos equipamentos frente às culturas, foi observado que as placas mantidas na distância de 2 m, no direcionamento (A), apresentaram o pior resultado antifúngico para *Aspergillus fumigatus* e, o melhor, na distância de 30 cm, no direcionamento B, para *Candida albicans* (Quadro 2).

**Quadro 2** Demonstração numérica da média aritmética das UFC dos fungos sobre as placas de Petri, nas distâncias de 30cm, 1m e 2m e, direcionamentos A, B e C, em sala, com e sem ar condicionado, além do grupo controle.

	GEO 20000/AR-TD (Mod.I)								
	Ar condicionado desligado					Ar condicionado ligado			
		Controle	30 cm	1 m	2 m	Controle	30 cm	1 m	2 m
<b><i>Candida albicans</i></b>	A	4704	481	198	335	4784	1915	2187	2800
	B		186	253	316		318	2843	2997
	C		1175	163	507		461	1373	3339
<b><i>Aspergillus fumigatus</i></b>	A	931	413	411	760	1110	715	851	840
	B		360	267	547		659	840	957
	C		384	608	461		859	795	813
	GEO 20000/AR (Mod.II)								
	Ar condicionado desligado					Ar condicionado ligado			
		Controle	30 cm	1 m	2 m	Controle	30 cm	1 m	2 m
<b><i>Candida albicans</i></b>	A	3845	163	195	184	4199	204	198	265
	B		150	155	185		159	194	225
	C		169	206	213		175	242	263
<b><i>Aspergillus fumigatus</i></b>	A	639	281	281	351	685	366	349	369
	B		228	327	367		297	344	363
	C		281	337	323		370	361	387

No Quadro 3 estão registrados os valores percentuais de inibição para todas as variáveis estudadas. Observou-se que os maiores valores de inibição ocorreram para as culturas de *Candida albicans* pós atividade do ozônio dos dois equipamentos, com diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ). Considerando-se as culturas de *A. fumigatus*, os valores de inibição foram menos expressivos e, próximos a 50%.

Independente da espécie fúngica, evidencia-se que, a atividade antifúngica do ozônio foi melhor para os testes realizados na sala sem ar condicionado, com destaque aos percentuais de inibição de 83% e 78%, respectivamente, ao equipamento Mod.I e Mod.II. Quando ligado o ar condicionado, os valores foram menores, 28% e 67%, respectivamente.

**Quadro 3** Percentual de inibição obtido pela média aritmética das UFC das placas de Petri, nas distâncias de 30 cm, 1 m e 2 m e, direcionamentos A, B e C, em sala, com e sem ar condicionado.

	GEO 20000/AR-TD (Mod.I)						
	Ar condicionado desligado			Ar condicionado ligado			
		30 cm	1 m	2 m	30 cm	1 m	2 m
<i>Candida albicans</i>	A	90	96	93	60	55	42
	B	97	95	94	94	41	38
	C	76	97	90	91	72	31
<i>Aspergillus fumigatus</i>	A	56	56	19	36	24	25
	B	62	72	42	41	25	14
	C	59	35	51	23	29	27
	GEO 20000/AR (Mod.II)						
	Ar condicionado desligado			Ar condicionado ligado			
		30 cm	1 m	2 m	30 cm	1 m	2 m
<i>Candida albicans</i>	A	96	95	96	96	96	94
	B	97	96	96	97	96	95
	C	96	95	95	96	95	94
<i>Aspergillus fumigatus</i>	A	57	57	46	47	50	47
	B	65	49	43	57	50	48
	C	57	48	50	46	48	44

Considerando-se o ambiente experimental, com ar condicionado ligado e desligado, os registros de média de temperatura obtidas foram de 21°C e 25°C. Os registros de umidade foram 58% e 53%, com e sem ar condicionado ligado.

## Discussão

Este estudo é pioneiro quanto à avaliação da ação antifúngica do gás ozônio sobre superfície de meio de cultura contaminada por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, por: (1) testar diferentes distâncias e posicionamentos, por dois equipamentos geradores deste gás; (2) avaliar a interferência do fluxo aéreo do ar condicionado sobre os efeitos antifúngicos.

De acordo com os dados, apesar de se observarem contagens de UFC, após a ozonização, estas contagens sempre foram inferiores às do grupo controle, para ambos os experimentos, considerando-se todas as variáveis: micro-organismos, distâncias, direcionamentos, aparelhos geradores de gás ozônio e ar condicionado ligado ou desligado.

Neste estudo, comparando-se os dois equipamentos geradores, estatisticamente o aparelho Mod.I mostrou eficiência no processo de redução de carga microbiana, independentemente da espécie fúngica testada, fato explicado pela diferente vazão dos aparelhos. Embora as concentrações de ozônio em parte por milhão (ppm) sejam praticamente iguais, o gerador de ozônio Mod.I apresenta o dobro de vazão em relação ao Mod.II. Destaca-

se a exceção da redução da UFC com o Mod.II, que não teve diferença quanto aos resultados com significância estatística das culturas de *C. albicans* na distância de 2 m, e *A. fumigatus*, nas distâncias de 1 e 2 m, independentemente do posicionamento das placas (A, B e C). Comprova-se aos demais, portanto, uma associabilidade ou dependência entre os direcionamentos e as distâncias, interferindo na atividade antifúngica do gás ozônio.

Neste contexto, a melhor condição experimental ocorreu para *C. albicans*, na distância de 30cm, direcionamento B (central), enquanto *A. fumigatus*, na distância de 2m e direcionamento A (placas próximas à parede), representou a condição menos favorável. Isto pode estar relacionado aos escoamentos ou fluxos dos gases. Em escoamentos laminares, as partículas movem-se de maneira ordenada, mantendo sempre a mesma posição relativa. Já no regime turbulento, essas partículas se movimentam aleatoriamente, de maneira irregular (Vasques et al., 2016), ou seja, o fluxo do gás ozônio ao atingir a parede, torna-o desordenado e com isso diminuindo assim a atividade antifúngica em relação as placas próximas à parede. E isso talvez até esteja interferindo em todo o fluxo do ozônio, justificando assim a variação do número de UFC em todas as distâncias e direcionamentos.

A melhor atividade antifúngica no processo de ozonização para os dois aparelhos quando o ar condicionado estava desligado, independente da espécie fúngica, pode ter sido observada, pois, o alvo (superfície) é mais atingido pelo gás ozônio, sem sofrer nenhuma interferência. Diferentemente, com o ar condicionado ligado, cuja função é de captar ar e filtrar antes de jogá-lo ao ambiente (Silva et al., 2013), o fluxo do gás ozônio está sofrendo variação ao atingir a superfície, diminuindo assim a sua atividade antifúngica.

De acordo com Kim et al. (1999), a variação da temperatura, da umidade relativa e o tempo de tratamento, conduz a um efeito antimicrobiano do ozônio modificado. No atual estudo, estes fatores foram considerados e mantidos igualmente em todas as condições experimentais, minimizando possíveis vieses. Conforme os valores aqui detectados, as culturas de *C. albicans* foram mais sensíveis do que *A. fumigatus*, evento que corrobora com estudo de Kim et al. (1999). De fato, *A. fumigatus* possui uma capacidade de crescer e sobreviver a ambientes de umidade e temperaturas extremos, com dispersão de conídios (Veerdonk et al., 2017). Segundo Santana et al., 2013, *C. albicans* está menos adaptada à diversidade de ambientes externos ao corpo humano do que *A. fumigatus*.

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o propósito de investigar a atividade antimicrobiana do gás ozônio contra fungos, sensíveis ou resistentes, com diversidade de tempo de exposição e concentração. Variáveis foram analisadas para inibição de leveduras, formação do tubo germinativo e biofilme, comprovando-se que o gás ozônio dentro de

protocolos bem estabelecidos para tempo de exposição, sempre apresenta excelente atividade antimicrobiana (Adyas et al., 1983; Komanapalli e Lau, 1998; Martins et al., 2015; Tormin et al., 2016; Zargarán et al., 2018). Assim, é evidente que a pesquisa atual corrobora com o expresso na literatura.

Zotti et al. (2008) observaram mudanças fenotípicas da colônia de *A. flavus* e *A. niger*, após exposição do gás ozônio, com diminuição drástica do crescimento de ambos, e mudança da pigmentação natural destas espécies fúngicas. Neste sentido, pode-se esperar que além da atividade antimicrobiana do gás ozônio, o mesmo possa atuar inibindo pigmentos e a síntese de proteína, com comprometimento futuro aos fatores de virulência de espécies fúngicas patogênicas.

A limpeza de superfícies é fundamental para o controle das Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Frota et al., 2017). Por este estudo, é garantido o potencial antifúngico do O<sub>3</sub>, produzido pelos dois equipamentos diferentes, aos critérios descritos. Trata-se de um procedimento satisfatório para as práticas de descontaminação de superfícies de bancadas, factível como rotina, valorizada a rapidez e a facilidade na execução. Este recurso abre mais uma perspectiva para a desinfecção de superfícies visando melhor controle da dispersão de micro-organismos. A incorporação deste procedimento aos protocolos de higienização e desinfecção hospitalares poderá diminuir as taxas de contaminação e, conseqüentemente, infecções fúngicas nos ambientes da área de saúde.

A ação do ozônio para o controle fúngico é de fundamental importância e, a realização de mais pesquisas, buscando otimizar a melhor performance deste gás contra este grupo de microrganismos, é relevante.

**Agradecimentos:** Ao professor Dr. Fernando Ferrari pela realização da análise estatística e a empresa Ozon pela disponibilização dos aparelhos geradores de ozônio.

**Informações de financiamento** Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

**Conformidade com os padrões éticos**

**Conflito de interesse** Os autores declaram que não têm conflito de interesse.

**Declaração ética** Este artigo, realizado por qualquer um dos autores, não contém participação de humanos ou animais nos estudos.

## Referências

Adyas A, Boughton BJ, Das BC (1983) Ozone killing action against bacterial and fungal species; microbiological testing of a domestic ozone generator *Journal of Clinical Pathology* 36(10):1102-1104.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC498483/pdf/jclinpath00515-0016.pdf>

Ferreira AM, Barcelos LS, Rigotti MA, Andrade D, Andreotti JT, Almeida MG (2013) Superfícies do ambiente hospitalar: um possível reservatório de micro-organismos subestimado? – revisão integrativa *Rev enferm UFPE on line* 7(esp):4171-4182.

<https://doi.org/10.5205/reuol.4134-32743-1-SM-1.0705esp201310>

Frota OP, Ferreira AM, Guerra OG, Rigotti MA, Andrade D, Borges NMA, Almeida MTG (2017) Eficiência da limpeza e desinfecção de superfícies: correlação entre métodos de avaliação *Rev Bras Enferm [Internet]* 70(6):1242-1249. <http://dx.doi.org/10.1590/0034-7167-2016-0608>

Hunt NK, Mariñas BJ (1999) Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics *Water Research* 33(11):2633-2641. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00115-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00115-3)

Kim JG, Yousef AE, Dave S (1999) Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review *J. Food Prot.* 62(9):1071-1087. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.9.1071>

Kwon-Chung KJ, Sugui JA (2013) *Aspergillus fumigatus*-what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLOS Pathogens* 9(12):1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743>

Komanapalli IR, Lau BHS (1998) Inactivation of bacteriophage  $\lambda$ , *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone *Appl Microbiol Biotechnol* 49(6):766-769. <https://doi.org/10.1007/s002530051244>

Martins CC, Kozusny-Andreani DI, Mendes ECB (2015) Ozônio no controle de micro-organismos em resíduos de serviços de saúde *Revista Baiana de Enfermagem* 29(4):318-327. <http://dx.doi.org/10.18471/rbe.v29i4.13678>

Mathé L, Dijck PV (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms Curr Genet 59:251-264. <http://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3>

Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms Virulence 4(2):119-128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>

Nakamura HM, Caldeira SM, Avila MAG (2013) Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva Rev. SOBECC 18(3):49-58. [http://sobecc.org.br/arquivos/artigos/2014/pdfs/revisao-deleitura/Ano18\\_n3\\_%20jul\\_set2013-2.pdf](http://sobecc.org.br/arquivos/artigos/2014/pdfs/revisao-deleitura/Ano18_n3_%20jul_set2013-2.pdf)

Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G (2014) Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat Molecules 19(1):1085-1119. <https://doi.org/10.3390/molecules19011085>

Sales VM, Oliveira E, Célia R, Gonçalves FR, Melo CC (2014) Análise microbiológica de superfícies inanimadas de uma Unidade de Terapia Intensiva e a segurança do paciente Revista de Enfermagem Referência 4(3):45-53. <http://dx.doi.org/10.12707/RIII1293>

Santana DP, Ribeiro EL, Menezes ACS, Naves PLF (2013) Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans* Rev. Ciênc. Méd. Biol. 12(2):229-233. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v12i2.6953>

Silva DP, Nazaré DL, Muniz JWC, Câmara CNS (2013) Infecções hospitalares associadas à qualidade do ar em ambientes climatizados Rev Epidemiol Control Infect. 3(4):153-157. <https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/viewFile/3798/3257>

Tormin SC, Navarini A, Almeida JOCF, Travassos LHR, Negri MVG, Silva RA (2016) Análise do efeito bactericida do ozônio sobre bactérias multirresistentes Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo 61:138-141. [http://www.fcmscsp.edu.br/images/Arquivos\\_medicos/2016/AO106.pdf](http://www.fcmscsp.edu.br/images/Arquivos_medicos/2016/AO106.pdf)

Vasques EJ, Menegasso P, Souza M (2016) Explorando a conexão entre a mecânica dos fluidos e a teoria cinética Revista Brasileira de Ensino de Física, 38(7):1307. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-11173812096>

Veerdonk FLV, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP (2017) *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions Nature Reviews Microbiology 15(11):661-674. <http://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.90> [http://doi: 10.29252/cmm.3.2.26](http://doi:10.29252/cmm.3.2.26)

Zargaran M, Fatahinia M, Zarei Mahmoudabadi A (2017) The efficacy of gaseous ozone against different forms of *Candida albicans* Curr Med Mycol. 3(2):26-32. [http://doi: 10.29252/cmm.3.2.26](http://doi:10.29252/cmm.3.2.26)

Zotti M, Porro R, Vizzini A, Mariotti MG (2008) Inactivation of *Aspergillus spp.* by ozone treatment Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association 30(6):423-430. <http://dx.doi.org/10.1080/01919510802487997>

**Capítulo 4**

---

## 4 CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos nestes estudos, pode-se concluir que:

- Os equipamentos geradores de gás ozônio apresentam atividade antimicrobiana contra micro-organismos presentes no ar e em superfícies, como chão, bancada e parede.
- As superfícies de chão e bancadas correspondem às áreas de maior inibição microbiana provocada pelo gás ozônio, independentemente do equipamento.
- O gás ozônio, nas concentrações de 2,0 e 2,1ppm, após uma hora de exposição, atua contra *C. albicans* e *A. fumigatus*, com destaque à espécie *Candida albicans*.
- O aparelho Mod.I, com maior vazão para produção de gás ozônio, representa o equipamento de maior eficiência de ação antifúngica.
- Em salas com ar condicionado desligado, o direcionamento e distância entre o aparelho e o alvo a ser desinfetado, interfere sobre a maior performance dos equipamentos geradores de ozônio quanto à atividade antifúngica.
- A criação de novos protocolos experimentais, com adequações sobre o tempo de exposição e concentração do ozônio poderão melhorar os padrões de desinfecção ou esterilização de ambientes, tornando factível a utilização em ambientes críticos para contaminação microbiana.

## REFERÊNCIAS

- AL-SAAD, H. et al. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus in vitro*: a potential irrigant for infected wounds. **International Wound Journal**, Chichester, Jan. 2015.
- ARANA, I. et al. Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 5, p. 883-888, May 1999.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE OZONIOTERAPIA. **A ozonioterapia**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.aboz.org.br/ozonioterapia/>>. Acesso em: 07 jul. 2017.
- AVANCINI, C. A. M.; BOTH, J. M. C. Efeito da atividade bactericida de três desinfetantes sobre *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 7, n. 2, p. 85-89, 2017.
- BABLON, G. et al. Practical applications of ozone: principles and case studies. In: LANGLAIS, G.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. (Ed.). **Ozone in water treatment: application and engineering**. Chelsea: Lewis, 1991. p. 133-316.
- BAYSAN, A.; WHILEY, R. A.; LYNCH, E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. **Caries Research**, v. 34, n. 6, p. 498-501, Nov.-Dec. 2000
- BIALOSZEWSKI, D. et al. Antimicrobial activity of ozonated water. **Medical Science Monitor**, v. 16, n. 9, p.71-75, Sept. 2010.
- BIALOSZEWSKI, D. et al. Activity of water and ozone against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Medical Science Monitor**, v. 17, n. 11, p. 339-344, Nov. 2011.
- CANADA, M. L. M. et al. Effectiveness of ozonated water in the reprocessing of blood dialyzers. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 30, n. 3, p. 215-219, 2014.
- CARDOSO, C. C. et al. Avaliação microbiológica de um processo de sanificação de galões de água com a utilização do ozônio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 59-61, Jan.-Abr. 2003.
- 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.
- CASE, P. D. et al. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 4, p. 523-26, Apr. 2012.

CAVALCANTE, D. A. et al. Uso De Ozônio Gasoso Na Sanitização De Câmaras Frigoríficas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 121, 2014.

CELIBERTI, P., PAZERA, P., LUSI, A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. **American Journal Dentistry**, v. 19, n. 1, p. 67-72, Feb. 2006.

CORREIA, L. M. et al. Vigilância de efeitos adversos de saneantes em trabalhadores hospitalares: um relato de experiência. **Revista brasileira em Promoção da Saúde**, v. 26, n. 3, p. 442-450, 2013.

DAVE, S. et al. Kinetics of inactivation of *Salmonella enteritidis* by ozone. **Institute of Food Technologists Annual Meeting. Book of Abstracts**, p. 15, 1998.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: Rima, 2005. v. 2, 784 p.

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(esp), p. 4171-4182, 2013.

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

FINCH, G. R.; SMITH, D. W.; STILES, M. E. Dose-response of *Escherichia coli* in ozone demand-free phosphate buffer. **Water Research**, v. 22, n. 2, p. 1563-1570, Dec. 1988.

FONTES, B. et al. Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 358, 2012.

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. **Journal of Hospital Infection**, v. 57, n. 1, p. 31-37, 2004.

GARCIA, C. A. et al. O gás ozônio na descontaminação de ambientes cirúrgicos. **Vet. Not.**, v. 14, n. 2, p. 37-40, jul./dez. 2008.

GRAHAM, D. M. Use of ozone for food processing. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 72-75, 1997.

GUZEL-SEYDİM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDİM, A. C. Use of ozone in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 453-460, 2004.

HAAS, C.N.; KAYMAK, B. Effect of initial microbial density on inactivation of *Giardia muris* by ozone. **Water Research**, v. 37, n. 12, p. 2980-2988, July 2003.

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.

HORVATH, M.; BILITZKY, L.; HUTTNER, J. Fields of utilization of ozone. In: R. J. H. Clark (Ed.). **Ozone**. New York: Elsevier Science, 1985. p. 257-316.

HUNT, N. K.; MARIÑAS, B. J. Inactivation of *Escherichia coli* with ozone: chemical and inactivation kinetics. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2633-2641, 1999.

HUNT, N. K.; MARIÑAS, B. J. Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone water. **Water Research**, v. 31, n. 6, p. 1355-1362, June 1997.

HUTH, K. C. et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 1, p. 3–13, Jan. 2009.

KATTI, S. S.; CHAVA, V. K. Effect of Ozonised water on Chronic Periodontitis: a Clinical Study. **Journal of International Oral Health**, v. 5, n. 5, p. 79-84, Oct. 2013.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 9, p. 1242–1252, 2001.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; CHRISM, G. W. Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. **Journal of Food Safety**, v. 19, n. 1, p. 17-34, Apr. 1999.

KOROL, S. et al. Desinfecção da água: ação comparativa do ozono e cloro sobre um amplo espectro bacteriano. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 27, n. 4, p. 175-83, Oct.- Dec. 1995.

KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus* – What makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1-4, 2013.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. Ozone in water treatment: application and engineering. **Chelsea: AWWARF and Lewis Publishers**, 1991. 568 p.

LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, agricultura e hidropônica**. Vitória: PROSAB, 2003. p.169-208.

LUDDEKE, F. et al. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. **Water Research**, v. 69, p. 243-251, Feb. 2015.

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 Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 4, p. 672-679, 2018.

MARTINS, C. C.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; MENDES, E. C. B. Ozônio no controle de micro-organismos em resíduos de serviços de saúde. **Revista Baiana de Enfermagem**, v. 29, n. 4, p. 318-327, 2015.

MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251-264, 2013.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE B. C. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

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

NAGAYOSHI, M. et al. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 11, p. 778-781, Nov. 2004a.

NAGAYOSHI, M. et al. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 19, n. 4, p. 240-246, Aug. 2004b.

NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49-58, 2013.

OLIVEIRA, A. F.; MENDES, H. J. Aplicações clínicas do ozônio na odontologia. **Revista Saúde.Com**, v. 5, n. 2, p. 128-140, 2009.

OMIDBAKHS, N.; SATTAR, S. A. Broad-spectrum microbicidal activity, toxicologic assessment, and materials compatibility of a new generation of accelerated hydrogen peroxide-based environmental surface disinfectant. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. 251-257, 2006.

OTURAN, M. A.; AARON, J. J. Advanced oxidation processes in water/wastewater treatment: principles and applications. A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 23, p. 2577-2641, 2014.

PARAMYTHIOTOU, E. et al. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085-1119, 2014.

PEREIRA, M. M. S. et al. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano: estudo experimental "in vitro". **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 32, n. 1, p. 2004-2006, 2005.

PINTO, A. T. et al. Uso de ozônio no controle de fungos em sala de maturação de queijos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 333-337, 2007.

PONCE, R. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de morango minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 113-118, 2010.

- RAMIREZ, G. A. et al. Potential efficacy of ozonation as a *Salmonella* decontamination method in broiler carcasses. **Poultry Science Abstracts**, v. 73, p. 21, 1994.
- 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.
- RENNER, J. D. P.; CARVALHO, E. D. Microrganismos isolados de superfícies da UTI adulta em um hospital do Vale do Rio Pardo – RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 2, p. 40–44, 2013.
- RICE, J. O. et al. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal American Water Works Association**, v. 73, n. 1, p. 44-57, Jan. 1981.
- RUSSEL, A. D.; HUGO, W. B.; AVLIFFE, G. A. J. **Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. 826p.
- 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.
- SADATULLAH, S.; MOHAMED, N. H.; RAZAK, F. A. Qualitative analyses of the antimicrobial effect of ozonated water on supragingival plaque and salivary microbes. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v. 4, n. 4, p. 526-531, July 2014.
- SAINI, R. Ozone therapy in dentistry: a strategic review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 2, n. 2, p. 151-153, 2011.
- 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.
- SANTANA, D. P. et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.
- SANTOS, R. R. et al. Ozone as fungicide in rice grains. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 230–235, 2016.
- SEIDLER, V. et al. Ozone and its usage in general medicine and dentistry. A review article. **Prague Medical Report**, v. 109, n. 1, p. 5-13, Feb.-June 2008.
- SILVA, D. P. et al. Infecções hospitalares associadas à qualidade do ar em ambientes climatizados. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 4, p. 153-157, 2013.
- SILVEIRA, I. C. T. **Cloro e ozônio aplicados a desinfecção de efluente hospitalar tratado em contadores biológicos rotatórios, com avaliação de efeitos tóxicos**

em **DAPHNIA SIMILIS**. 2004. Dissertação (Doutorado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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.

STÜBINGER, S.; SADER, R.; FILIPPI, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. **Quintessence International**, v. 37, n. 5, p. 353-359, May 2006.

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.

TORRES, E. A. F. S.; REGÊ FERREIRA, A. F.; RÍMOLI, C. D. Estudos das propriedades desinfetantes do ozônio em alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 42, p. 18-23, 1996.

UMAR, M. et al. Application of ozone for the removal of bisphenol A from water and wastewater. **Chemosphere**, v. 90, n. 8, p. 2197-2207, 2013.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual**. 1999. Disponível em: <[http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative\\_disinfectants\\_guidance.pdf](http://www.epa.gov/OGWDW/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf)>. Acesso em: 08 jul. 2017.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamics host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 661-674, 2017.

VELANO, C. E. E. et al. A avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 18-22, Jan.- Mar. 2001.

VICTORIN, K. Review of the genotoxicity of ozone. **Mutation Research**, v. 277, n. 3, p. 221- 238, Sept. 1992.

VIDAL, F. J. R. **Proceso de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización**. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2003. 253 p.

ZHANG, Y. Q. et al. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 4, p. 1006- 1015, Oct. 2011.

WALTER, R. H.; SHERMAN, R. M. Duration of ozone in water in the upper solubility range. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 5, p. 993-995, Sept. 1976.

WICKRAMANAYAKE, G. B. Disinfection and sterilization by ozone. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection and sterilization and preservation**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiyer, 1991. p. 182-190.

WU, D. et al. Ozonation as an advanced oxidant in treatment of bamboo industry wastewater. **Chemosphere**, v. 88, n. 9, p. 1108-1113, 2012.

YANG, P. P.; CHEN, T. C. Stability of ozone and its germicidal properties on poultry meat microorganisms in liquid phase. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 2, p. 501-504, Mar. 1979.

YESIL, M. et al. Efficacy of gaseous ozone application during vacuum cooling against *Escherichia coli* O157:H7 on spinach leaves as influenced by bacterium population size. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 7, p. 1066-1071, 2017.