



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

# IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 11, Issue, 03, pp. 45330-45335, March, 2021

<https://doi.org/10.37118/ijdr.21331.03.2021>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS VEGETAIS *IN NATURA* E OZONIZADOS NO CONTROLE DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

<sup>1</sup>Wagner Rafael da Silva and <sup>\*2</sup>Dora Inés Kozusny-Andreani

<sup>1</sup>Doutorando do curso de pós-graduação em Engenharia Biomédica. Universidade Brasil, Fernandópolis-SP

<sup>2</sup>Professora Titular dos cursos de pós-graduação em Engenharia Biomédica e em Ciências Ambientais da Universidade Brasil, Fernandópolis - SP

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 18<sup>th</sup> December, 2020

Received in revised form

27<sup>th</sup> January, 2021

Accepted 29<sup>th</sup> February, 2021

Published online 17<sup>th</sup> March, 2021

#### Key Words:

Bactérias Gram-negativas, Óleos vegetais, ozônio, Atividade antibacteriana.

#### \*Corresponding author:

Dora Inés Kozusny-Andreani,

### ABSTRACT

*Acinetobacter baumannii* é um dos mais importantes microrganismos Gram negativos que levam a infecções oportunistas adquiridas em hospitais em todo o mundo. Emergiu como um patógeno problemático devido à presença cada vez maior de resistência a antibióticos, evidenciando a necessidade de novas opções terapêuticas antimicrobianas. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar a eficácia dos óleos de girassol, oliva, pequi, canola, coco e dendê *in natura* e ozonizados no controle *in vitro* de *Acinetobacter baumannii*. Para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos foi utilizada a linhagem padrão de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. Os óleos foram ozonizados por meio de um gerador corona. Para a avaliação da concentração inibitória mínima, diluições seriadas dos óleos foram preparadas em placas de microdiluição com 96 poços. A seguir, acrescentados 0,05L da suspensão padronizada ( $10^6$  células viáveis mL<sup>-1</sup>) da linhagem de *A. baumannii*. Avaliação foi realizada após incubação a 37°C por 24h. Verificou-se que todos os óleos apresentaram atividade antibacteriana. Os óleos *in natura* apresentaram concentrações inibitórias mínimas e bactericidas superiores aos óleos ozonizados, exceto o óleo de girassol que exibiram concentrações semelhantes para ambos os tratamentos (*in natura* e ozonizado). O tratamento com ozônio aumentou o efeito antimicrobiano do óleo vegetal, uma vez que é necessária uma menor concentração para que o efeito bactericida seja visualizado de forma efetiva.

Copyright © 2021, Wagner Rafael da Silva and Dora Inés Kozusny-Andreani. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Wagner Rafael da Silva and Dora Inés Kozusny-Andreani, 2021. "Atividade antimicrobiana de óleos vegetais in natura e ozonizados no controle de acinetobacterbaumannii," International Journal of Development Research, 11, (03), 45330-45335.

## INTRODUCTION

O gênero *Acinetobacter* spp. têm atraído atenção científica médica pela complexidade do gênero, incluindo espécies potencialmente patogênicas para pacientes com fatores de risco. A tendência de algumas espécies, como *Acinetobacter baumannii* e *A. calcoaceticus* se espalharem no ambiente hospitalar, adquirirem e disseminarem fatores de resistência aos antibióticos, mesmo aos antibióticos mais recentes e ativos, tornou-se um problema ecológico mundial (Bergogne-Bérézin, 2014). O transporte digestivo de *Acinetobacter* não é predominante, as contaminações resultam do transporte pelas mãos, material e pacientes (Zhao *et al.*, 2016). *Acinetobacter baumannii* é um dos mais importantes microrganismos Gram negativos que levam a infecções oportunistas adquiridas em hospitais em todo o mundo. Emergiu como um patógeno problemático sério devido à presença cada vez maior de resistência a antibióticos, demonstrando a necessidade de novas opções terapêuticas antimicrobianas de amplo espectro (Peleg *et al.*, 2008; Neonakis *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2014; Mattappalil e Mergenhagen, 2014; Kassamali *et al.*, 2015).

A resistência desenvolvida pelos microrganismos contra os agentes microbianos que ocorrem junto com o uso intensivo de antibióticos e vários fatores que se associam é um problema importante. Este problema está aumentando substancialmente nos últimos anos (Fournier e Richet, 2005; Lagacé e Rubinstein, 2012; Kim *et al.*, 2015; Gonzalez-Villoria e Valverde-Garduno, 2016). Apesar de muitas abordagens para encontrar opções de tratamento disponíveis, a baixa permeabilidade da membrana externa de *A. baumannii*, sua capacidade de adquirir elementos genéticos de forma eficiente e sua capacidade de estabelecer biofilmes tornaram as opções de tratamento limitadas (Lee *et al.*, 2008; Penesyan *et al.*, 2015; Khodadadi *et al.*, 2020). O problema da resistência aos antibióticos, que vem aumentando substancialmente, tem levado à necessidade de busca de novos agentes de tratamento. Os produtos naturais parecem privilegiados no que diz respeito a esse assunto e o interesse pelos medicamentos fitoterápicos volta a despertar. As atividades potenciais dos extratos e óleos de plantas e alguns de seus constituintes no controle de bactérias resistentes são amplamente pesquisadas (Dias *et al.*, 2012; Yap *et al.*, 2014; Sakkas *et al.*, 2016; Aggarwal *et al.*, 2020). Os óleos essenciais e vegetais atingem um

amplo espectro antimicrobiano e agem tanto contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. e *Bacillus* spp.), como Gram-negativas (*Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophyla*, *Shigella* spp., *Salmonella enterica* Typhimurium e *Enteritidis*, e *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter baumannii*), fungos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, Dermatofitos) e leveduras (*Saccharomyce scervisiae*) (Valacchi et al., 2012; Amorim et al., 2013; Carvalho et al., 2020; Guimarães et al., 2020; Kume et al., 2021). Na busca por um amplo espectro de agentes antimicrobianos capazes de evitar a resistência enquanto mantêm efeitos colaterais razoáveis, levou a que os óleos ozonizados experimentassem um aumento no interesse científico e nas aplicações clínicas. O tratamento de óleos vegetais com ozônio leva à criação de um reservatório de ozônio que é liberado lentamente na pele, graças ao fato de que o ozônio pode ser mantido como ozônio de ácidos graxos insaturados (Ugazio et al., 2020). No entanto, fatores há que interferem na sensibilidade das bactérias ao ozônio, tais como estirpe, idade da cultura, densidade da população e estágio de crescimento, concentração celular, tipos de micro-organismos, meios de cultura, temperatura, a concentração de ozônio, tempo de exposição e o método de sua aplicação (Lapolliet al., 2003; Amorim et al., 2013; Kozusny-Andreaniet al., 2018; Carvalho et al., 2020). A administração terapêutica do ozônio, conhecida como terapia de ozônio, surge como um possível tratamento para a reparação de tecidos, pois promove a cicatrização de feridas. Tem propriedades bactericidas, antivirais e antifúngicas e tem sido utilizado como recurso terapêutico no tratamento da inflamação. Os efeitos benéficos são decorrentes da cicatrização de feridas, pela redução da infecção microbiana, efeito de desbridamento, modulação da fase inflamatória, estímulo à angiogênese bem como reações biológicas e enzimáticas que favorecem o metabolismo do oxigênio, melhorando a cicatrização da ferida (Anzolin et al., 2020; Viotto et al., 2020). Neste contexto objetivou-se na presente pesquisa avaliar a atividade antimicrobiana óleos vegetais de girassol, oliva, pequi, canola, coco e dendê *in natura* e ozonizados e *in vitro* frente à *Acinetobacter baumannii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Linhagem bacteriana e meios de cultivo:** Foi utilizada a linhagem de *Acinetobacterbaumannii* ATCC 17978 (American Type Culture Collection, Figura 1), mantida na coleção de micro-organismos do laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, *campus* de Fernandópolis. Foram empregados o meio ágar sangue (Oxoid®) e incubação a 37°C por 24 horas) para a reativação da linhagem.



Fonte – Autoria própria (2021)

**Figura 1.** Linhagem de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, cultivada em meio ágar sangue

Posteriormente, três a quatro colônias da linhagem de *Acinetobacter baumannii* cultivadas anteriormente em ágar sangue foram inoculadas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid®) e incubadas em

condições de aerobiose por 24 horas a 37°C, quando se procedeu à centrifugação (4000 rpm) por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o material precipitado ressuspendido em DMSO (dimetilsulfoxido, Synth®) e, novamente, submetido à centrifugação. Esse procedimento foi repetido cinco vezes visando retirar os componentes existentes no meio de cultura (Ramos et al., 2016) que poderiam interferir na avaliação da concentração inibitória mínima (CIM). Após esse procedimento, a suspensão bacteriana foi diluída em DMSO até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland standard (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), equivalente à concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente foram realizadas diluições seriadas para atingir a concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Essa suspensão bacteriana constituiu o inóculo para avaliação antibacteriana dos óleos pela técnica de microdiluição em placas (CLSI, 2014, 2017), para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) da concentração bactericida mínima (CBM) e a cinética bactericida dos óleos vegetais *in natura* e ozonizados.

**Óleos vegetais:** Foram utilizados óleos vegetais de *Brassica napus* L. (canola, Liza®), *Cocos nucifera* L. (coco, Katigua®), *Elaeis guineensis*. Jacq. (dendê, Hemmer®), *Olea europaea* L. (oliva, Paganini®), *Caryocar brasiliense* Cambess (pequi, Cepera®) e *Helianthus annuus* L. (girassol, Liza®).

**Ozonização dos óleos vegetais:** Para a ozonização, foi empregado 1 litro de cada óleo vegetal. O ozônio foi produzido por meio de um gerador que tem como princípio o efeito corona (Ozon& Life®, 1,5 RM, registro ANVISA 81509100001) e o oxigênio puro foi fornecido por cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi levado para o difusor por um tubo de silicone, gerando, assim,  $15 \mu\text{g minuto}^{-1}$  de ozônio. Os óleos vegetais foram expostos ao ozônio de forma direta por meio de um difusor durante um período de 4 horas, enquanto o óleo de coco foi ozonizado por 6 horas. Todo o procedimento foi conduzido em temperatura controlada de 25°C em uma capela de exaustão (Quimis®, modelo 216.11), visando minimizar os riscos de inalação do gás ozônio, obedecendo às normas internacionais de segurança. Após ozonização, os óleos foram avaliados quanto à sua esterilidade, sendo retirado 0,1mL de cada óleo e inoculado em placas de Petri contendo meio ágar triptecaseína de soja (TSA, Oxoid®), incubado a 37 °C por 24/48 horas, quando foi verificada a ausência de crescimento bacteriano. Foi considerado estéril o óleo que não apresentou nenhuma colônia. Os óleos ozonizados foram mantidos sob refrigeração (8°C).

**Atividade antibacteriana dos óleos in natura e ozonizados:** Na suspensão de linhagem de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978, na concentração de  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, foi utilizado o teste de sensibilidade bacteriana aos respectivos óleos ozonizados e *in natura*, baseado na diluição dos óleos em placas de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), de acordo com a metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (CLSI, 2017, 2020). Inicialmente, realizou-se a diluição dos óleos. Para tal fim, foram distribuídos 50  $\mu\text{L}$  de caldo BHI nas cavidades das microplacas. Nos primeiros poços foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  dos óleos, obtendo-se uma diluição de 50% (1/2). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas nos 6 poços subsequentes, retirando-se 50  $\mu\text{L}$  do poço de maior concentração (100%) para o seguinte, até a obtenção da concentração 0,78% (1/128). Assim, a série de diluições obtidas corresponderam a 50% (1/2), 25% (1/4), 12,5% (1/8), 6,25% (1/16), 3,12% (1/32), 1,56% (1/64) e 0,78% (1/128). Em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana (turbidez a 0,5 da escala de Mac-Farland) em cada cavidade com as diluições dos óleos (em triplicata). O experimento foi controlado por séries de diluições de DMSO com suspensões bacterianas e de óleos isentos de suspensões bacterianas (controles positivos); no controle negativo, foi verificada a viabilidade da linhagem com inoculação da suspensão bacteriana em caldo BHI; os experimentos realizados em triplicata. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em condições de aerobiose. Ao término desse período, determinou-se a CIM, que foi definida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para se determinar a CIM, foi adicionado, em cada poço, o corante 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), no volume de 50µL, que reflete a atividade das enzimas desidrogenases envolvidas no processo de respiração. Pela hidrogenação do TTC, é produzida nas células vivas uma substância vermelha, estável e não difusível – o trifenilformazan. Isto tornou possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor (Sylvester, 2011). Para se determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), uma alíquota (100µL) da CIM e de duas concentrações anteriores e de duas posteriores a esta, além do controle positivo, foram inoculadas em meio ágar sangue, sem antimicrobianos; o experimento foi realizado em triplicata. Após incubação a 37°C por 24 horas, em aerobiose, foi avaliado o crescimento bacteriano, sendo considerada a CBM a menor concentração do óleo que apresentou cultivo negativo ou média de 0,1 UFC (Aiemsraad ePunareewattana, 2017).

**Cinética bactericida dos óleos vegetais *in naturae* ozonizados :** Foi empregada a metodologia descrita por Allahghadriet *al.* (2010). Os óleos foram adicionados em tubos 40 mL de cada óleo na diluição determinada por CBM a cada 5mL de caldo de BHI, contendo suspensão bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, sendo, em seguida, incubados a 37°C. Amostras (0,1 mL) foram retiradas a cada 10 minutos por um período de 480 min. As amostras foram imediatamente lavadas com tampão de fosfato estéril, pH 7,0, centrifugadas a 10.000 rpm, ressuspendidas em tampão e, depois, foram espalhadas em cultura ágar BHI e incubadas durante 24h a 37°C. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata. As colônias microbianas foram contadas após o período de incubação. Após contagem das colônias, foi avaliada a variação da carga microbiana a fim de observar qual óleo apresentou a maior variação negativa (redução) na contagem microbiana. Segundo esta análise, quanto maior a variação negativa, maior a eficácia do óleo essencial. Nesse contexto, a variação percentual da contagem microbiana consistiu na relação

$$\text{Contagem microbiana}_{\text{óleo essencial}}(\%) = \frac{(\text{Contagem}_{0,39\%} - \text{Contagem}_{0,0\%})}{\text{Contagem}_{0,0\%}} \times 100$$

Esta relação foi empregada para todos os óleos avaliados e para todas as concentrações empregadas. Conforme essa relação, variações negativas mostram diminuição na contagem microbiana e variações positivas mostram aumento da contagem microbiana à medida que a concentração do respectivo óleo vegetal aumenta.

#### Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e avaliados seguindo os seguintes critérios:

1. Análise descritiva das concentrações mínima inibitórias e bactericida de cada um dos óleos essenciais de acordo com os tratamentos (*in natura* e ozonizado);
2. Teste de Mann-Whitney para comparar a contagem microbiana e a variação da contagem microbiana referente aos óleos avaliados de acordo com o tipo de tratamento (*in natura* x ozonizado);
3. Teste de Kruskal-Wallis para comparar a contagem microbiana e a variação da contagem microbiana de acordo com o tipo de óleo essencial;
4. Gráficos de linha para análise da contagem microbiana e da variação da contagem microbiana de acordo com o tratamento (*in natura* e ozonizado) e de acordo com o tipo de óleo essencial;
5. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de significância de 5% (P<0,05);
6. Software utilizado: Minitab 17 (Minitab Inc.).

## RESULTADOS

A Tabela 1 evidencia as concentrações inibitórias mínimas e as concentrações bactericidas mínimas para cada um dos óleos vegetais avaliados *in natura* e ozonizados.

**Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para cada um dos óleos vegetais avaliados no estudo frente a *Acinetobacter baumannii*.**

Óleos vegetais	Tratamento	CIM <sup>1</sup>	CBM <sup>1</sup>
Girassol	<i>In natura</i>	12,5%	25%
	Ozonizado	12,5%	25%
Canola	<i>In natura</i>	50%	50%
	Ozonizado	25%	25%
Coco	<i>In natura</i>	25%	50%
	Ozonizado	12,5%	25%
Dendê	<i>In natura</i>	25%	50%
	Ozonizado	6,25%	12,5%
Oliva	<i>In natura</i>	50%	100%
	Ozonizado	12,5%	25%
Pequi	<i>In natura</i>	25%	50%
	Ozonizado	6,25%	12,5%

<sup>1</sup> CIM: concentração inibitória mínima e CBM: concentração bactericida mínima.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1 verificou-se que em todos os casos, os óleos *in natura* apresentaram concentrações mínimas inibitórias e bactericidas superiores aos óleos ozonizados, exceto no caso do óleo de girassol que exibiram concentrações semelhantes para ambos os tratamentos *in natura* e ozonizado). Esse resultado evidencia que o tratamento com ozônio aumenta o efeito antimicrobiano do óleo vegetal, uma vez que é necessária uma menor concentração desse óleo para que o efeito bactericida e de inibição do crescimento microbiano seja visualizado de forma efetiva. Dentre os óleos avaliados, destacam-se os de dendê e de pequi que, por sua vez, apresentaram as menores concentrações mínimas inibitórias quando comparados com os demais óleos avaliados no estudo. Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para a contagem microbiana do *Acinetobacter baumannii* submetido aos óleos vegetais *in natura* e ozonizados nas suas respectivas concentrações mínimas bactericidas.

**Tabela 2. Média±desvio padrão (Mediana) de *Acinetobacter baumannii* submetido aos óleos vegetais *in natura* e ozonizados**

Óleos vegetais (CBM <i>in natura</i> /CBM ozonizado)	<i>In natura</i>	Ozonizado	Valor p <sup>1</sup>
Girassol (25%/25%)	8,7.10 <sup>4</sup> ±3,0.10 <sup>5</sup> (2,8.10 <sup>2</sup> )	1,6.10 <sup>5</sup> ±3,4.10 <sup>5</sup> (2,3.10 <sup>2</sup> )	0,349
Canola (50%/25%)	1,3.10 <sup>3</sup> ±3,6.10 <sup>5</sup> (9,4.10 <sup>2</sup> )	1,7.10 <sup>3</sup> ±2,9.10 <sup>3</sup> (2,6.10 <sup>2</sup> )	0,460
Coco (50%/25%)	1,1.10 <sup>5</sup> ±2,8.10 <sup>5</sup> (5,7.10 <sup>2</sup> )	2,1.10 <sup>5</sup> ±5,3.10 <sup>5</sup> (5,3.10 <sup>2</sup> )	0,963
Dendê (50%/12,5%)	1,5.10 <sup>5</sup> ±3,9.10 <sup>5</sup> (2,2.10 <sup>2</sup> )	2,0.10 <sup>5</sup> ±4,6.10 <sup>5</sup> (2,8.10 <sup>2</sup> )	0,115
Oliva (100%/25%)	1,6.10 <sup>7</sup> ±3,7.10 <sup>5</sup> (7,8.10 <sup>2</sup> )	1,2.10 <sup>5</sup> ±3,5.10 <sup>5</sup> (4,5.10 <sup>2</sup> )	0,478
Pequi (50%/12,5%)	8,0.10 <sup>4</sup> ±2,3.10 <sup>5</sup> (3,0.10 <sup>2</sup> )	1,1.10 <sup>5</sup> ±3,7.10 <sup>5</sup> (2,3.10 <sup>2</sup> )	0,804

<sup>1</sup> Valor p referente ao teste de Mann-Whitney a p<0,05.

Os resultados da Tabela 2 evidenciam que não houveram diferenças significativas entre a contagem microbiana para todos os óleos essenciais avaliados quando o óleo *in natura* foi comparado com o óleo ozonizado, porquanto todos os valores p do teste comparativo resultaram superiores ao nível de significância adotado. Na Figura 2 são apresentados os intervalos de confiança para cada um dos óleos analisados de acordo com os tratamentos. A contagem microbiana apresentou valores nulos em tempos inferiores quando submetida ao tratamento com óleo ozonizado; exceto para o óleo de dendê que apresentou valores nulos de contagem microbiana no mesmo tempo para ambos os tratamentos (60 minutos de exposição ao óleo *in natura* e ao óleo ozonizado).

Mesmo que a comparação entre os óleos *in natura* e ozonizado não tenha resultado em diferenças estatisticamente significativas é possível pressupor que a eficácia dos óleos ozonizados é superior em relação aos óleos *in natura*, já que o tempo necessário para anular a contagem microbiana utilizando os óleos essenciais ozonizados é

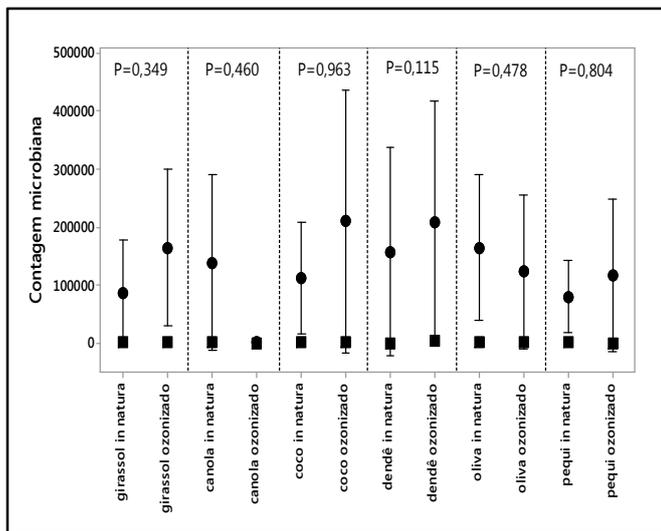


Figura 2. Intervalos de confiança (95%) para cada um dos óleos vegetais *in natura* e ozonizados avaliados. Círculos e quadrados pretos indicam as médias e as medianas da contagem microbiana, respectivamente.

inferior ao tempo utilizado para anular a contagem microbiana utilizando os óleos *in natura*. A comparação da variação da contagem microbiana entre os tratamentos resultou em dois casos de existência de diferenças significativas: óleo de girassol ( $p=0,017$ ) e o óleo de coco ( $p=0,012$ ). Em ambos os casos, a queda da contagem microbiana foi significativamente superior no tratamento com óleo ozonizado. Para os demais óleos, o tratamento *in natura* e ozonizado não surtiu efeito significativo na redução da contagem microbiana porque os valores P resultaram superiores a 0,05 (Tabela 3).

Tabela 3. Média±desvio padrão (Mediana) da variação percentual (%) da contagem microbiana em relação aos óleos vegetais avaliados

Óleos vegetais (CBM in natura/CBM ozonizado)	Tratamentos		Valor p <sup>1</sup>
	In natura	Ozonizado	
Girassol (25%/25%)	-18,9±130,5 (-66,7)cd	-79,9±13,3 (-79,5)bc	0,017
Canola (50%/25%)	-85,5±16,2 (-93,5) a	-95,1±5,2 (-96,2) a	0,244
Coco (50%/25%)	-27,4±163,0 (-71,6)bc	-69,9±66,7 (-93,8)ab	0,012
Dendê (50%/12,5%)	-74,7±30,8 (-85,9)ab	-90,4±6,1 (-91,0)ab	0,193
Oliva (100%/25%)	-51,2±67,5 (-69,4)bc	-43,8±127,3 (-83,3) b	0,326
Pequi (50%/12,5%)	-6,3±147,5 (-59,5) d	-52,8±41,3 (-61,9) c	0,495
Valor P	<0,001	<0,001	

<sup>1</sup> Valor p referente ao teste de Mann-Whitney a  $P<0,05$ . <sup>2</sup> Valor p referente ao teste de Kruskal-Wallis a  $p<0,05$ . Letras diferentes na mesma coluna diferenciam-se entre si pelo teste de comparação múltipla de Dunn a  $P<0,05$ .

Na comparação dos óleos vegetais, restringindo o tratamento, verificou-se que o óleo de canola se destacou como sendo o mais eficaz na redução da contagem microbiana tanto *in natura* como ozonizado. Em ambos os casos, esse óleo essencial apresentou uma redução da carga microbiana acima de 90 %. Para o uso *in natura*, destacou-se também o óleo de dendê com 85,9 % de redução da carga microbiana. Para o tratamento ozonizado, os óleos de coco e dendê se destacaram com redução de 93,8 e 91,0 %, respectivamente.

Em ambos os tratamentos avaliados, o óleo de pequi foi o que apresentou a menor eficácia, ou seja, esse óleo vegetal foi responsável por apresentar a menor redução da carga microbiana. As Figuras 3 e 4 evidenciam o comportamento das variações percentuais da contagem microbiana de cada um dos óleos vegetais avaliados para o tratamento *in natura* e ozonizado, respectivamente.

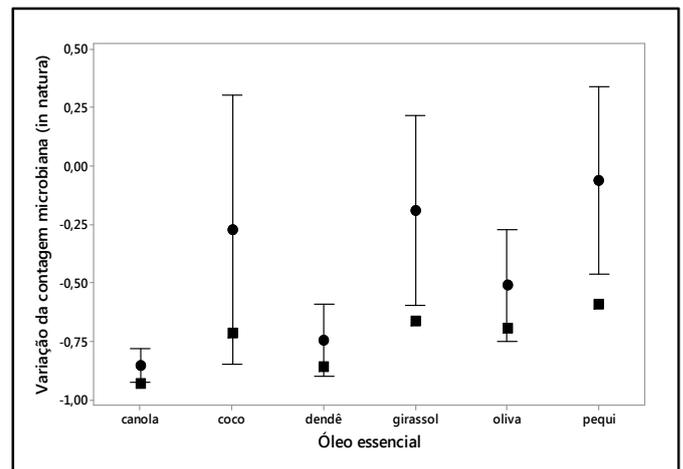


Figura 3. Variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais *in natura*. Círculos e quadrados pretos indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente

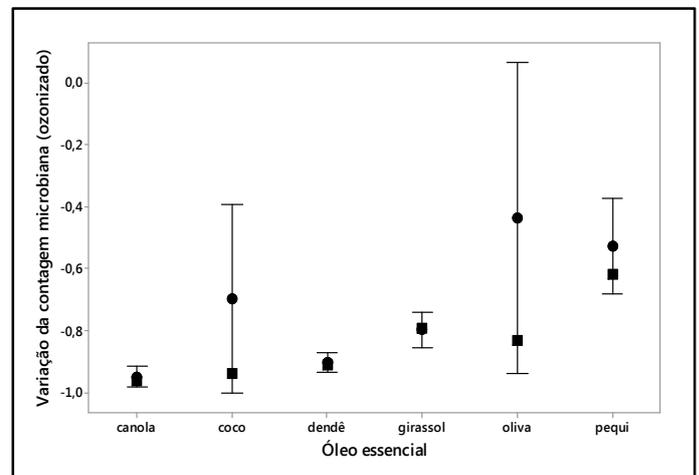


Figura 4. Variação percentual da contagem microbiana dos óleos vegetais ozonizados. Círculos e quadrados pretos indicam as médias e as medianas da variação da contagem microbiana, respectivamente

## DISCUSSÃO

*Acinetobacter baumannii* dispõe de múltiplos mecanismos de virulência relacionados à capacidade de aderir, colonizar e invadir células epiteliais humanas; possui excelente capacidade de produção de biofilme e resistência (inerente e adquirida) a vários antimicrobianos, que facilitam sua sobrevivência em condições ambientais variadas. *A. baumannii* tem causado, com frequência, surtos de infecção hospitalar pela sua longa persistência em superfícies (Howard *et al.*, 2012). O aumento de resistência de *A. baumannii*, capaz de contrapor-se, com eficiência à ação de antibióticos, acompanha o impacto clínico desta bactéria, agravado pelo uso desmedido de antimicrobianos em hospitais. Este fato causa grande preocupação, particularmente porque essas bactérias propendem à transmissão cruzada, possivelmente devido à sua resistência a múltiplos medicamentos e à sua capacidade de sobreviver por períodos prolongados em ambiente hospitalar (Fournier e Richet., 2005; Visca *et al.*, 2011). *A. baumannii* é persistente e hábil em adquirir resistência a antibióticos, exerce pressão seletiva sobre as drogas, especialmente em ambiente hospitalar, tornando-se mais complexo evitar a criação de resistência em múltiplos medicamentos (Raro *et al.*, 2017). Neste contexto, a medicina ortodoxa, por décadas, tem fornecido uma variedade de agentes antimicrobianos, no entanto alguns deles tornaram-se pouco eficazes pelo aparecimento de patógenos resistentes a antibióticos e quimioterápicos (Travagiet *et al.*, 2011). Esta situação levou a busca por métodos antimicrobianos

capazes de inviabilizar e neutralizar os agentes patogênicos nesses locais tornou-se imprescindível a fim de se atingirem as metas propostas pelo plano global. Entre essas tecnologias salientam-se as de alta pressão hidrostática, irradiação, radiação UV, campo elétrico pulsado, luz pulsada, ultrassom, homogeneização e ozônio, destacando-se este último por suas propriedades antimicrobianas e por ser totalmente degradável em oxigênio sem deixar resíduos ou produtos tóxicos (Tiwari et al., 2014). O ozônio é conhecido por ser um excelente desinfetante que, no entanto, teve de ser usado por muito tempo com cautela devido a suas propriedades oxidantes. Apenas nas últimas décadas, foi possível dosar sua concentração exata e incorporar, permanentemente, o gás em compostos como os óleos vegetais e essenciais, nos quais o ozônio gasoso reage quimicamente com substratos insaturados levando à formação de derivados ozonizados terapêuticamente ativos (Travaglini et al., 2010; Valacchi et al., 2012; Carvalho et al., 2020). A atividade farmacológica dos óleos ozonizados depende do nível de ozonização e da composição do óleo (Bocchetti et al., 2009; Diaz et al., 2012). Os óleos vegetais *in natura* e ozonizados representam uma interessante abordagem do ponto de vista farmacêutico para o manejo de uma variedade de patologias em humanos e animais (Peña-Jiménez et al., 2017; Song et al., 2018; Viotto et al., 2020). Em alguns países, os óleos *in natura* e ozonizados são oferecidos como uso alternativo dos recursos disponíveis, caracterizados por serem fontes naturais e renováveis, obtidos por meio de tecnologia simples, de baixo custo e com ampla atividade biológica com efeitos colaterais reduzidos (Almeida et al., 2012; Diaz et al., 2012).

O ozônio forneceu muitas evidências convincentes para seu uso na administração tópica e tem um perfil de segurança apropriado, especialmente quando administrado como óleo ozonizado. Os óleos ozonizados têm demonstrado atividade e podem ser propostos para uso na prevenção e tratamento de infecções crônicas locais, em formulações adequadas e em casos controlados, como alternativa aos antimicrobianos tópicos. Isso pode ser útil como uma alternativa para contrastar o uso generalizado e indiscriminado de agentes antimicrobianos, que levou ao surgimento de resistência bacteriana (Williamson et al., 2017). Pesquisas evidenciam alguns fatores que interferem na sensibilidade das bactérias ao ozônio, tais como estirpe, idade da cultura, densidade da população e estágio de crescimento, concentração celular, tipos de micro-organismos, meios de cultura, temperatura, a concentração de ozônio, tempo de exposição e o método de sua aplicação (Amorim et al., 2013; Cajamarca, 2015; Kozusny-Andreani et al., 2018; Kume et al., 2021). O ozônio tem propriedades bactericidas, antivirais e antifúngicas e tem sido utilizado como recurso terapêutico no tratamento da inflamação. Os efeitos benéficos são decorrentes da cicatrização de feridas, pela redução da infecção microbiana, efeito de desbridamento, modulação da fase inflamatória, estímulo à angiogênese bem como reações biológicas e enzimáticas que favorecem o metabolismo do oxigênio, melhorando a cicatrização da ferida (Anzolin et al., 2020; Viotto et al., 2020). De acordo com Ugazio et al. (2020), no futuro, seria desejável desenvolver formulações que sejam caracterizadas por permeabilidade cutânea otimizada, segurança em feridas abertas e maior ligação a membranas de microrganismos, a fim de promover a atividade desinfetante e reduzir o tempo de exposição.

## CONCLUSÃO

Todos os óleos apresentaram atividade antibacteriana contra *Acinetobacter baumannii*. Os óleos *in natura* apresentaram concentrações mínimas inibitórias e bactericidas superiores aos óleos ozonizados, exceto no caso do óleo de girassol que exibiram concentrações semelhantes para ambos os tratamentos *in natura* e ozonizado). O tratamento com ozônio aumentou o efeito antimicrobiano do óleo vegetal, uma vez que é necessária uma menor concentração para que o efeito bactericida e de inibição do crescimento microbiano seja visualizado de forma efetiva. Dentre os óleos avaliados, destacam-se os de dendê e de pequi que apresentaram as menores concentrações inibitórias mínimas quando comparados com os demais óleos.

## REFERÊNCIAS

- Aggarwal KK, Khanuja SPS, Ahmad A, Kumar TRS, Gupta VK, Kumar S. (2020). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Menthaspicata* and *Anethumsowa*. *Flav Frag J*. 17: 59-63.
- Aiemsaad J, Punareewattana K. (2017). Antifungal activities of essential oils of *Syzygium aromaticum*, *Piper betle*, and *Ocimum sanctum* against clinical isolates of canine Dermatophytes. *Sci Asia*. 43(5):223-228.
- Allahghadri T, Rasooli L, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, Astaneh SD A. (2010). Antimicrobial property, antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil from cumin produced in Iran. *J. Food Sci.* 75(2):H54-H61.
- Almeida NR, Beatriz A, Micheletti AM, Arruda EJ. (2012). Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a review. *Orbital Elec. J. Chem.* 4(4): 313-326.
- Amorim EOC, Tribst AAL, Augusto PED, Cristianini M. (2013). Inactivation of *E. coli* and *B. subtilis* spores in ozonized cassava starch. *Food Sci. Technol.* 33(2):289-294.
- Andrade GR, Kozusny-Andreani DI, Andreani Junior R, Gatto IRH, Ramos RR. (2020). Efficacy of essential oils in *in vitro* control of *Acinetobacter baumannii*. *J AdvBiotBioeng*. 8:11-22.
- Antunes LCS, Visca P, Towner KJ. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathogens Dis.* 71: 292-301.
- Anzolin AP, Silveira-Kaross NL, Bertol CD. (2020). Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? *Med Gas Res*. 10(1):54-59.
- Bergogne-Bérézin E. Bacteria: *Acinetobacter*. (2014). Editor(s): Yasmine Motarjemi. *Encyclopedia of Food Safety*, Academic Press. p.337-341.
- Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. (2009) The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 29:646-682.
- Carvalho MML, Kozusny-Andreani DI, Batigália F, Rodero AB, BoerNCP, Zângaro RA, Ramos RR. (2020) Comparative analysis of *in vitro* antibacterial effectiveness of ozonized and non-ozonized vegetable oils on *Neisseria gonorrhoeae*. *J Mod Med Chem.* 8:41-48.
- CLSI.— Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth informational supplement. Document No. M100-S24, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., USA.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30<sup>th</sup> ed. Supplement M100 (Replaces M100, 29<sup>th</sup>ed.). Wayne, PA: USA.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27<sup>th</sup> ed. CLSI. S1 supplement M100. Wayne, PA, USA.
- Diaz MF, Sanchez Y, Gomez M, Hernandez F, Veloso MCC, Pereira PAP, Mangrich AS, Andrade JB. (2012). Physicochemical characteristics of ozonated sunflower oils obtained by different procedures. *Grasas Aceites.* 63:466-474.
- Fournier PE, Richet H. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin. Infect. Dis.* 42:692-699;
- Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno V. (2016). Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen. *J Pathog.* 2016: 1-10.
- Guimarães NM, Oliveira IF, Kozusny-Andreani DI. (2020). Eficácia de óleos vegetais *in natura* e ozonizados no controle de *Sporothrix schenckii*. *Int. J. Dev. Res.* 10(11):41970-41974.
- Howard A, O'donoghue M, Feeney A, Sleator RD. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 3(3):243-250, 2012
- Kassamali Z, Jain R, Danziger LH. (2015). An update on the arsenal for multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: polymyxin antibiotics. *Int J Infect Dis.* 30:125-32.

- Khodadadi E, Zeinalzadeh E, Taghizadeh S, Mehrmouz B, Kamounah FS, Khodadadi E, Ganbarov K, Yousefi B, Bastami M, Kafil HS. (2020). Proteomic applications in antimicrobial resistance and clinical microbiology studies. *Infect. Drug Resist.* 13:1785–1806
- Kozusny-Andreani DI, Andreani G, Prado LFA, Spaziani AO, Kairala RCOM, Silva F S, Zangaro RA (2018). *In vitro* inactivation of pathogenic bacteria by the use of ozone in different exposure times. *Rev Cub Med Trop.* 70(1):1-8
- Kume JEP, Andreani Junior R, Di Tanno MFP, Kozusny-Andreani DI (2021). Uso de óleos essenciais *in natura* e ozonizados no controle *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes*. *Res Soc Dev.* 10(1):e4710111233.
- Lagacé WP, Rubinstein E. (2012). Adverse reactions to -lactam antimicrobials. *Expert Opin. Drug Saf.* 11:381–399.
- Lapoli FR, Santos LF, Hassemer MEN, Aisse MM, Piveli RP. (2003) Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patogênicos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica. Vitória: PROSAB. p. 169- 208.
- Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. (2008). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* 14: 49-54
- Mattappalil A, Mergenhagen KA. (2014). Neurotoxicity with antimicrobials in the elderly: A review. *Clin. Ther.* 36:1489–1511.
- Neonakis IK, Spandidos DA, Petinaki E. (2011). Confronting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: a review. *Int. J. Antimicrob. Agents* 37:102–109.
- Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:538–582.
- Peña-Jiménez F, Zamora-Rodríguez Z, Hernández-Aco R, Fleitas-González E, Hernández-González A, Hernández-Rosado. (2017). Use of ozonized oils for the treatment of wounds in fattening bovine. *Aban Vet.* 7(2):60-67
- Penesyan A, Gillings M, Paulsen IP. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20: 5286-5298.
- Ramos RR, Kozusny-Andreani DI, Fernandes AU, Baptista MS. (2016). Ação fotodinâmica de derivados da protoporfirina IX sobre *Trichophyton rubrum*. *An Bras Dermatol.* 91(2):135-40.
- Raro OHF, Gallo SW, Ferreira CAS, Oliveira SD. (2017). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit. *Rev Soc Bras Med Trop.* 50(2):167-172.
- Sakkas H, Gousia P, Economou V, Sakkas V, Petsios S, Papadopoulou C. (2016). *In vitro* antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. *J Intercult Ethnopharmacol.* 5: 212-218.
- Song M, Zeng Q, Xiang Y, Gao L, Huang J, Huang J, Wu K, Lu J. (2018). The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep.* 17(2):2449-2455.
- Sylvester P. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Meth Mol Biol.* 716:157-168.
- Tiwari V, Tiwari M. (2014). Quantitative proteomics to study carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 5:512.
- Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. (2010). Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Med Inflamm.* 2010:ID 610418.
- Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapietra S, Dosio F. (2020). Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules.* 25(2):334.
- Valacchi G, Sticozzi C, Pecorelli A, Cervellati F, Cervellati C, Maioli E. (2012). Cutaneous responses to environmental stressors. *Ann NY Acad Sci.* 1271(1):75-81.2
- Vijayarathna, S.; Zakaria, Z.; Chen, Y.; Latha, L. Y.; Kanwar, J. R.; Sasidharan, S. (2012). The antimicrobial efficacy of *Elaeis guineensis*: characterization, in vitro and in vivo studies. *Molecules.* 17(5):4860-4877.
- Viotto CMBW, Viotto LH, Zângaro R A, Kozusny-Andreani DI, Ramos RR. (2020). Treatment of diabetic lower limb wounds with ozonized sunflower oil and collagenase. *J. Endocrin Diabetes Mellitus.* 8:11-23; 2020.
- Visca P, Seifert H, Towner K.J. (2011). *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. *IUBMB Life.* 63(12):1048–1054.
- Williamson DA, Carter G., Howden BP. (2017). Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns. *Clin. Microbiol. Rev.* 30:827–860.
- Yap PS, Yiap BC, Ping HC, Lim SH. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *Open Microbiol J.* 8:6-14.
- Zhao D, Lu F, Qiu M, Ding Y, Zhou X. (2016). Dynamics and Diversity of Microbial Community Succession of Surimi During Fermentation with Next-Generation Sequencing. *J. Food Safety.* 6:315-320.

\*\*\*\*\*