

## EFICIÊNCIA BIOCIDA DO OZÔNIO

VANESSA KOHN dos SANTOS MACHADO<sup>1</sup> e MAURICIO de ALMEIDA SCHMITT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Luterana do Brasil campus Canoas, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup>Universidade Luterana do Brasil campus Canoas, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: [vanessakohn1@gmail.com](mailto:vanessakohn1@gmail.com); [mauricio.schmitt@ulbra.br](mailto:mauricio.schmitt@ulbra.br)

**Palavras-Chave:** Ozonização, Coluna de absorção, Microrganismos.

### Introdução

O uso do ozônio como um antimicrobiano seguro tornou-se notório nas últimas décadas, principalmente devido à sua atividade altamente oxidativa, que o caracteriza como um agente potencialmente biocida que atua sobre bactérias, fungos, vírus e helmintos (MARTINS *et al.*, 2015). A ação antimicrobiana do ozônio ocorre através do dano às membranas celulares e oxidação das proteínas intracelulares, o que desencadeia a perda do funcionamento da organela (SILVA *et al.*, 2021). Ele inativa diversas bactérias, incluindo gram-negativas e gram-positivas, células vegetativas e formas esporuladas, além de componentes do envoltório celular, esporos fúngicos ou capsídeos virais, em concentrações relativamente baixas e em reduzido tempo de contato (SILVA *et al.*, 2011).

O ozônio possui um elevado poder de oxidação, ao que é atribuída sua ação biocida, já que seu potencial de oxidação (+2,07) é superado apenas pelo flúor (+2,87) e pelo radical hidroxila (+2,80), mas se sobressai em relação ao peróxido de hidrogênio (+1,77) e o cloro(+1,36) (SILVA, 2018). Sua atuação na eliminação de microrganismos vem sendo explorada em diversos campos como alimentação, tratamento de água e esgoto, tratamento de feridas, desinfecção de superfícies e até mesmo nos tratamentos odontológicos. Portanto, com tantas vertentes sendo estudadas, torna-se inegável seu poder como agente biocida.

O ozônio é uma forma alotrópica do oxigênio, constituído por 3 átomos (O<sub>3</sub>), que possui características como: gás instável, diamagnético (ZANZARINI, 2017) e é produzido naturalmente na estratosfera pela ação fotoquímica dos raios ultravioleta sobre as moléculas de oxigênio e pode ser sintetizado através de aparelhos de ozonização (LIMA *et al.*, 2021).

Recentemente tem havido uma busca por novos métodos de desinfecção que avaliam o efeito descontaminante do Ozônio (O<sub>3</sub>) em água e ar contaminados por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas auriginosa*, *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis*, encontrando resultados promissores na redução do potencial contaminante dos microrganismos, tanto no ambiente em forma de aerossóis, quanto na água (TAMINATO, 2023).

O ozônio vem sendo utilizado como desinfetante de água há muitos anos nos países europeus, onde é citado por Souza (2006) em sua tese de doutorado, como um potente oxidante e desinfetante de elevada efetividade na inativação de microrganismos patogênicos de difícil inativação, como oocistos de *Cryptosporidium*, no tratamento da água.

Seu efeito bactericida pode ser comprovado, também, pelo projeto desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, Campus Fernandópolis, onde após dois minutos de fumigação de ozônio, as bactérias usadas neste trabalho não resistiram à sua ação, onde previamente as placas de Petri utilizadas haviam sido contaminadas com cepas padrão de *S. aureus* e *K. pneumoniae* (PEREIRA *et al.*, 2018).

Esse mesmo efeito do ozônio sobre os microrganismos, é citado por Borges, *et al.*

(2017) no seu artigo sobre a cicatrização de feridas utilizando ozônio, onde afirma que, essa prática se justifica pelo efeito de morte oxidativa que o ozônio exerce sobre microrganismos como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* que são microrganismos que, frequentemente, estão relacionadas às infecções de feridas, reduzindo assim o tempo de cicatrização, após reduzir a contaminação.

Na prática odontológica, o ozônio, devido à sua potente ação antimicrobiana, tem sido proposto como uma alternativa antisséptica. As novas estratégias terapêuticas para tratamento da infecção e inflamação consideram não apenas o poder antimicrobiano das substâncias utilizadas, como também a influência exercida sobre a resposta imune do paciente (ANEXO RESOLUÇÃO CFO-166/2015).

Diversos processos da indústria de alimentos são propícios à utilização do ozônio, como a ozonização de produtos agrícolas durante sua armazenagem/transporte e a sanitização da água utilizada para lavar os alimentos, equipamentos e materiais das embalagens (GRAHAM, 1997).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi evidenciar a eficácia do uso desse agente na eliminação de microrganismos, a partir de evidências práticas através de um método desenvolvido para tal, sendo ele, uma coluna com borbulhamento de ozônio em uma solução básica e outra neutra.

O método utilizado foi desenvolvido baseando-se em uma coluna de absorção, que, geralmente, possui a forma de um cilindro fechado, onde são colocadas em contato as fases líquida e gasosa, para que haja a transferência de massa, devido à força motriz ali existente (Pereira *et al.* 2008).

## Material e Métodos

Para execução do projeto apresentado, foram realizadas algumas etapas desde a determinação do método qualitativo de análise, a confecção de uma coluna de absorção, em escala laboratorial, adaptada para a finalidade de inativação de microrganismos em parceria com o laboratório de microbiologia da Ulbra, preparo das culturas do *Geobacillus stearothermophilus* (endósporo utilizado nos testes), preparo das peças que foram submetidas à ozonização, análises pré processos de ozonização, análises de resultados após a utilização da coluna de absorção com borbulhamento de ozônio em solução alcalina e em solução neutra, comparação dos resultados obtidos em ambos os processos, conclusões após comparativo.

O método qualitativo de análise de cultura bacteriana utilizado para avaliação da eficácia da ozonização, foi adaptado da norma técnica CETESB (P2.112 1ª Edição Novembro 2016) e ANVISA (2013), e baseado na verificação qualitativa da dissertação de Sousa (2012) em seu mestrado tratando de microbiologia aplicada.

Para a contaminação do material metálico escolhido (tesouras Mayo), que foi submetido as ozonizações, foi preparado um meio de cultura líquido com caldo nutriente BHI (*Brain Heart Infusion Broth ou Caldo Cérebro Coração*) para o crescimento do *Geobacillus stearothermophilus* (endósporo muito resistente, escolhido para testar a eficácia do ozônio) e após, o microrganismo foi inoculado nesse meio. A contaminação foi realizada com 1 mL do caldo de cultura puro sobre toda a superfície do material (tesoura Mayo) e então, colocada em estufa a 30° C por 40 min para aderência microbiana ao material. O processo foi realizado em triplicata, sendo, após, identificados e embalados em pacotes de tecido SMS.

Preparou-se também o meio de cultura sólido (Ágar Triptona e Soja--TSA) utilizado para analisar qualitativamente o crescimento do *Geobacillus stearothermophilus*. Distribuiu-

se em placas de Petri estéreis, aguardando sua solidificação para semeadura das coletas.

A coleta foi feita com *swab* estéril, imerso em 1 mL de solução de água peptonada 0,1% estéril e friccionado sobre toda a superfície da tesoura; após, foi colocado no tubo contendo a solução e realizado agitação para homogeneização. Em seguida foi realizada a semeadura sobre o ágar nas placas de Petri e levado para incubação em estufa a 37° por 24h. Após a coleta, o material foi submetido à ozonização.

Para os ensaios com a utilização de ozônio, foi confeccionada uma coluna de absorção a partir de um cilindro de PVC de 10cm de diâmetro e 50cm de altura com tampa fixa na base e tampa móvel no topo ( com um orifício no centro por onde pudesse passar o fio de nylon que serviu para manter o material a ser esterilizado suspenso) bem como, um orifício no topo da coluna para entrada da mangueira de silicone ligada ao ozonizador na extremidade externa e uma pedra porosa (para melhor difusão do gás) na extremidade interna, conforme visto na Figura 1:

Figura 1- Coluna de absorção conectada ao ozonizador



Fonte: a autora, 2023

No primeiro ensaio, a coluna teve 4/5 de seu volume preenchido com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 mol/L (2,5L) e o borbulhamento de ozônio ocorreu de forma ascendente. O ozônio utilizado no borbulhamento foi produzido pelo ozonizador da marca CQJD Changjiu, com uma saída de ozônio de 2000mg/h (informação do fabricante), do tipo Fotoirradiação por luz UV (140 a 190 nm).

Para proceder-se a esterilização com ozônio, utilizou-se luvas e máscara, abriu-se o pacote com a tesoura Mayo previamente contaminada e suspendeu-se a mesma pela extremidade do fio de nylon (necessário para manter o material suspenso durante a ozonização e para poder ser manuseado sem ocorrer contaminação); foi mergulhada na solução dentro da coluna de absorção e o fio preso na garra universal ; fechou-se a tampa da coluna, ligou-se o ozonizador e foi acionado o cronômetro para que o borbulhamento ocorresse durante 15 minutos. Decorrido o tempo de ozonização, foram realizadas lavagens com água deionizada estéril para retirar a basicidade dos materiais já que o processo da ozonização (ozônio + hidróxido de sódio) ocorreu em pH básico, em torno de 12, sendo, assim, chamado de Processo Oxidativo Avançado (POA). Após as lavagens, a tesoura foi depositada dentro de embalagem previamente esterilizada, fechada e levada novamente para secagem em estufa a 30° C por 40 min.

Após o material (tesoura Mayo) passar pela ozonização e secagem, foi realizada a coleta, seguindo os mesmos passos da coleta inicial.

No segundo ensaio realizado, o processo de ozonização do material foi feito em uma solução de pH 7, com água deionizada esterilizada e ozônio, seguindo os mesmos procedimentos do borbulhamento com hidróxido de sódio. Dessa forma, não se caracterizando mais como um POA, e podendo avaliar unicamente a ação do ozônio.

A concentração de ozônio produzida pelo equipamento foi medida através do método iodométrico, descrito na literatura (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 2005, Método 2350E). Esse método consiste no borbulhamento de ozônio durante 5 min dentro de um kitassato com capacidade para 2L, contendo 1,2L de solução de iodeto de potássio 2%. Esse frasco lavador de gás é conectado a outros dois frascos kitassatos de 500 mL cada, contendo 200 mL de solução de iodeto de potássio 2% cada um. A conexão entre eles ocorre em sequência, sendo o último, aberto para o ambiente. Após o tempo de borbulhamento do ozônio na solução de iodeto de potássio 2%, é retirada uma alíquota de 100 mL da solução e transferido para um Erlenmeyer de 250 mL, acidificada com 5 mL de ácido sulfúrico 10% e realizada a titulação com tiosulfato de sódio 0,1N padronizado. A titulação é realizada até o clareamento da solução amarela; na sequência é adicionado 1 mL de amido 1%, surgindo, assim uma cor azul escura, então prossegue-se com a titulação até a cor azul desaparecer e o líquido ficar transparente; anota-se o volume de tiosulfato necessário e utiliza-se esses valores nas equações descritas no método, essas nuances de cor podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2--Nuances de cor durante a titulação



Fonte: a autora, 2023

Em posse da informação fornecida pelo fabricante sobre a vazão, também foi realizado um teste de vazão para confirmação de tal dado, utilizando-se um fluxômetro de ar com capacidade de até 15L/min, acoplado à saída de ar do aparelho de ozonização.

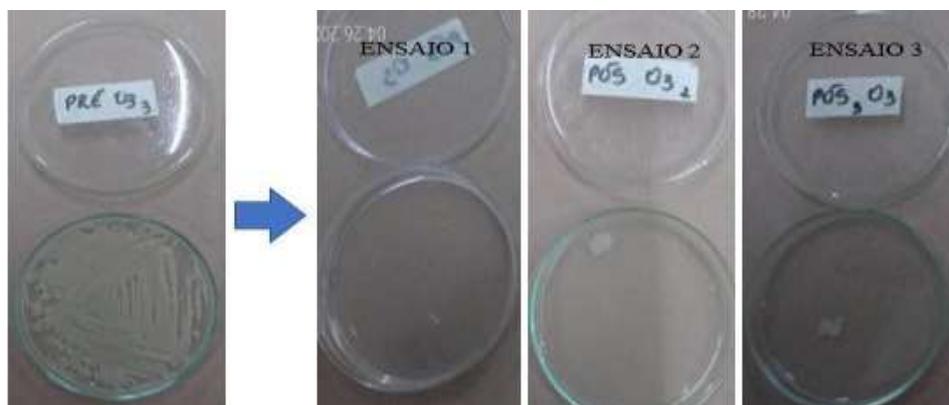
## Resultados e Discussão

Ao finalizar os processos propostos, os resultados foram descritos.

### **Análises pré e pós ozonização em coluna de absorção com hidróxido de sódio**

Após 24h de incubação das Placas de Petri, contendo as coletas do processo de ozonização em meio alcalino, em estufa a 37° (+2°), observou-se o resultado obtido na Figura 3.

Figura 3- Resultado da amostra pré e pós borbulhamento de ozônio em solução de NaOH



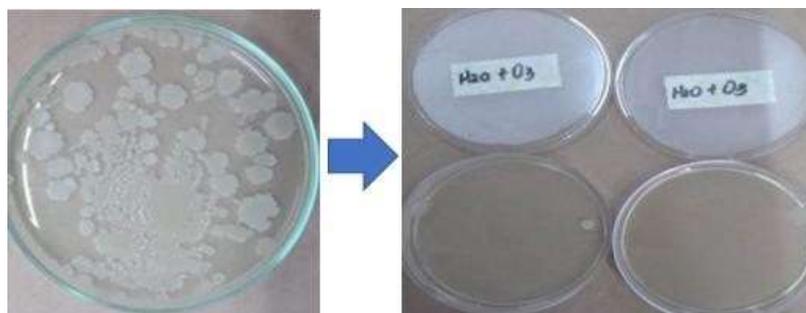
Fonte: a autora, 2023

Como observado, na cultura realizada após a coleta da superfície do material contaminado e antes de ser realizada a ozonização, ocorreu crescimento do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* em toda a superfície da placa, comprovando que o material estava contaminado. Já na cultura pós ozonização houve certo crescimento microbiano, porém com redução significativa no número de colônias do microrganismo.

#### Análises pré e pós ozonização em coluna de absorção com água deionizada

Após 24h de incubação das Placas de Petri, contendo as coletas do processo de ozonização em meio de pH neutro, em estufa a 37° (+2°), o resultado pode ser visto na figura 4:

Figura 4- Resultado da amostra pré e pós borbulhamento de ozônio em água deionizada



Fonte: a autora, 2023

Como pôde ser observado, a placa com a coleta de material prévia a ozonização ficou repleta de colônias do microrganismo, portanto, ao analisar as placas após a ozonização, percebemos que ocorreu uma eliminação significativa dos microrganismos do material contaminado, tendo um resultado muito semelhante ao observado no borbulhamento de ozônio em solução de NaOH 0,1M (POA).

### Resultado da quantificação do ozônio produzido pelo equipamento

Em posse dos valores obtidos durante os ensaios e nas titulações e utilizando-se as equações descritas no método iodométrico, foi possível calcular a produção total e a dosagem de ozônio **pelo ozonizador da marca CQJD CHANGJIU** (trabalhando com a vazão total do equipamento). Os resultados podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1- Produção Total e Dosagem de Ozônio

	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Vb (mL)	Vki (mL)	Vol. Amostra (mL)	Ntio	T (min)	Produção (gO <sub>3</sub> /h)	Dosagem (mg/L)
	Vf (mL)	Vf (mL)	Vf (mL)	Vf (mL)							
Reator 2L (1)	0,3	0,3	0,3	0,3	0	1,2	100	0,1	5	0,10368	7,2
Kitassato 0,5L (2)	0	0	0	0	0	0,2	100	0,1	5	0	0
Kitassato 0,5 L (3)	0	0	0	0	0	0,2	100	0,1	5	0	0
										Produção Total (gO <sub>3</sub> /h)	Dosagem Total (mg/L)
										0,10368	7,2

Fonte: a autora, 2023

Como pode observado, obteve-se uma produção total de **0,10368 gO<sub>3</sub>/h** e uma dosagem total (medida da concentração) de **7,2 mg/L**. Portanto, detectou-se uma produção consideravelmente abaixo do valor informado pelo fabricante, que seria de 2 gO<sub>3</sub>/h (entrega de **5,18%** do total que o aparelho deveria produzir).

Já no teste de vazão de ozônio, obteve-se 5,5L/min, sendo que o valor deveria ser de 8L/min, conforme o fabricante, (**68,75%** do que o aparelho deveria entregar), ou seja, um valor abaixo do esperado.

### Comparativo entre os dois métodos de ozonização realizados

Após as análises pré e pós ozonização tanto em solução básica como em solução neutra realizou-se um comparativo entre os resultados obtidos, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2- Comparativo entre as esterilizações realizadas

	Eliminação de colônias microbianas	
	Ozonização pH 12	Ozonização pH 7
Ensaio 1-Pós Ozonização pH 12	sim	sim
Ensaio 2- Pós Ozonização pH 12	sim	sim
Ensaio 3- Pós Ozonização pH 12	sim	sim
Ensaio 1- Pós Ozonização pH 7	sim	sim
Ensaio 2- Pós Ozonização pH 7	sim	sim

Fonte: a autora, 2024

Ao observar-se o quadro comparativo das duas ozonizações realizadas concluiu-se que o ozônio teve o poder de eliminar a grande maioria das colônias do *Geobacillus stearothermophilus*, independente do pH do meio em que ele foi borbulhado.

## Conclusões

Após a compilação e análise de todos os resultados obtidos, verificou-se que o desenvolvimento de uma coluna de absorção com borbulhamento de ozônio para verificar a eficácia da eliminação de microrganismos pelo ozônio, trouxe resultados positivos na redução e/ou eliminação de microrganismos, na forma como o método foi procedido: pH básico com 15 minutos de borbulhamento de ozônio e pH neutro com 15 minutos de borbulhamento de ozônio.

Foi possível concluir que a oxidação dos microrganismos ocorreu pela ação do próprio ozônio e não pelos radicais hidroxila liberados no meio através da elevação do pH, já que os resultados em ambos os processos foram muito similares. Como nos trabalhos supracitados, que citaram e comprovaram com testes os efeitos biocidas do ozônio, comprovou-se, também, através deste método criado, que o ozônio possui real ação biocida, mesmo em concentrações baixas, como a utilizada nos borbulhamentos, quando verificou-se através de uma análise qualitativa (crescimento de cultura em placa de Petri), que houve uma redução significativa das colônias do *Geobacillus stearothermophilus*.

A baixa concentração de ozônio no processo foi verificada pelos testes de iodometria e posteriormente, também pelos cálculos realizados, que mostraram que o aparelho estava entregando apenas algo em torno de 5,18% da sua capacidade de produção, informada pelo fabricante.

## Agradecimentos

ULBRA

CRQ-V

ABQRS

ABQ

## Referências

BORGES, Gabriel Álvares; ELIAS, Sílvia Taveiro; MAZUTTI, Sandra Márcia; et al. **Avaliação in vitro da cicatrização de feridas e potencial antimicrobiano da terapia com ozônio**. Revista de Cirurgia Cranio-Maxilofacial. São Paulo, 2017. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1010518217300057> Acesso em 08 de setembro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC no 15, de 15 de março de 2012**. Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União Nº 54, de 19 de março de 2012 - Seção 1 - pag. 43, 44, 45 e 46.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 4 : Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final**/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

CETESB, NORMA TÉCNICA P2.112 1ª Edição Novembro 2016 18 páginas **Sistemas de tratamento térmico sem combustão de resíduos de serviços de saúde contaminados biologicamente: teste de inativação microbiana utilizando esporos de Bacillus atrophaeus e Geobacillus stearothermophilus como**



**bioindicadores.** Disponível em <https://cetesh.sp.gov.br/wp-content/uploads/2013/11/P2-112-1-edicao.pdf> Acesso em 13 de abril de 2023

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA, **Regulamento sobre o exercício pelo cirurgião-dentista da prática de ozonioterapia**, Anexo Resolução CFO-166/2015

EATON, Andrew D.; CLESCERI, Leonore S.; RICE, Eugene W.; GREENBERG, Arnold. E. (Ed.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington: American Public Health Association; American Water Works Association; Water Pollution Control Federation, 2005.

FERREIRA, Wallas Felipe de Souza. **Eficácia da água ozonizada no controle de microrganismos em morango (fragaria x ananassa duch.) e efeito na qualidade físico- química durante o armazenamento**. Brasília/DF, fevereiro/2017 Dissertação de mestrado em agronomia. Disponível em [https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23159/1/2017\\_WallasFelippedeSouzaFerreira.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23159/1/2017_WallasFelippedeSouzaFerreira.pdf) Acesso em 05 de outubro de 2022

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

LIMA, Manoel J. A., FELIX, Erika P., CARDOSO, Arnaldo A. **Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde**. 2021. Paraná. Revisão. Quim. Nova 44 (09). <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170759> Disponível em <https://www.scielo.br/j/qn/a/C8CDZCz4tnLqVr6Hr8LsYsd/#> Acesso em 19 de novembro de 2022.

MARTINS, Carmem Costa; KOZUSNY-ANDREANI, Dora Inés; MENDES, Elena Carla Batista, **Ozônio no controle de micro-organismos em resíduos de serviços de saúde**, DOI: <http://dx.doi.org/10.18471/rbe.v29i4.13678> Revista Baiana de Enfermagem, Salvador, v. 29, n. 4, p. 318-327, out./dez. 2015

PEREIRA, Nehemias Curvelo; LENZI, Marcelo Kaminski. **Desenvolvimento de software didático para projeto de torres de absorção**. Acta Scientiarum. Tecnologia, v. 20, p. 445- 453, 13 de maio de 2008. DOI: 10.4025/actascitechnol.v20i0.3114 Acesso em 05 de outubro de 2022

PEREIRA, Renan Marco; NAKAMURA, Laura Arcangelo; et al. **Controle de klebsiella pneumoniae e staphylococcus aureus pelo gás ozônio**. Universidade Brasil, São Paulo, SP, 2018. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867018308407?via%3Dihub> Acesso em 08 de setembro de 2022.

PRIMICERI, Rodrigo da Silva. **Aplicação da ozonioterapia no processo de reparação tecidual de queimaduras cutâneas: avaliação histométrica**. São José dos Campos: Instituto de Ciência e Tecnologia - UNESP; 2024.

SILVA, Douglas Bambirra da, **Ozonioterapia na desinfecção de águas pluviais**, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG Instituto de Ciências Biológicas – ICB Departamento de Microbiologia, Belo horizonte, 2018.

SILVA, H. M. da; OLIVEIRA, E. C. M.; LIRA, L. M. S. S. de; ROCHA, L. M. B. M.; GAINES, A. P. L.; MARINHO, R. R. B. et al. **Aplicação da ozonioterapia na odontologia: revisão integrativa**. Revista 38 Eletrônica Acervo Saúde. 2021, Aug 25; Available from: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/8648>, acesso em 19 de agosto de 2024.

SILVA, Suse Botelho da; LUVIELMO, Márcia de Mello; GEYER, Mariana Curtinovi; PRÁ, Ivana. **Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos Seminário: Ciências Agrárias**, vol. 32, núm. 2, abril-junho, 2011, pp. 659-682 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil, Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744101026> Acesso em 19 de agosto de 2024.

SOUZA, Jeanette Beber de. **Avaliação de métodos para desinfecção de água empregando cloro, ácido peracético, ozônio e o processo de desinfecção combinado ozônio/cloro**. São Carlos, SP, 2006. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1010518217300057> Acesso em 08 de setembro de 2022.

TAMINATO, Monica, Editor Associado (**Avaliação pelos pares**) (<https://orcid.org/0000-0003-4075-2496>) Escola Paulista de Enfermagem, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil, 08 maio 2023

ZANZARINI, Taise Jordão. **Efeito do gás ozônio na descontaminação de canetas de bisturi elétrico**. Orientadora: Dra. Dora Inés Kozusny-Andreani. Fernandópolis, SP 2017. Disponível em



63º Congresso Brasileiro de Química  
**05 a 08 de novembro de 2024**  
**Salvador - BA**

[https://www.universidadebrasil.edu.br/portal/\\_biblioteca/uploads/20200316142901](https://www.universidadebrasil.edu.br/portal/_biblioteca/uploads/20200316142901). Acesso em 08 de setembro de 2022.