

AValiação DO EFEITO DE OLEOS OZONIZADOS DE GIRASSOL E COCO NO CONTROLE *Propionibacterium acnes*

A. M. V. Rensi^{1*}, B. C. A. Navarro^{1*}, G. Andreani^{1*}, R. A. Zangaro^{2**} e D. I. Kozusny-Andreani^{2**}, J. C. Lima^{2**}

*Curso de Medicina-UNICASTELO, Fernandópolis-SP, Brasil

** Instituto de Engenharia Biomédica - Unicastelo, Parque Tecnológico de São José dos Campos, Estrada Doutor Altino Bondesan, 500, Distrito Eugênio de Melo, São José dos Campos, CEP: 12247- Associação Cidade da Ciência Tecnologia e Educação – CITÉ, Rua Machado Sidney, 160/601, Centro - Zip Code - CEP 12245-650, São José dos Campos, SP, Brasil.

e-mail: dorainesterra@terra.com.br

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência dos óleos ozonizados de girassol e coco no controle *in vitro* de *Propionibacterium acnes*. Foram utilizadas cepas de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 e ATCC 6919. Para ozonização foram empregados óleos de girassol e de coco. O ozônio produzido de forma constante pelo gerador foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor, gerando assim 2ppm. A eficácia antibacteriana foi baseada na diluição dos óleos em microtubos onde foi determinada a Concentração Inibitória Mínima. Verificou-se que os óleos ozonizados de girassol e coco apresentaram, *in vitro*, efeito bactericida sobre as cepas de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 e *P. acnes* ATCC6919, em concentrações de 19 a 24%, sendo promissores no tratamento da acne, no entanto estudos *in vivo* são necessários.

Palavras-chave: *Propionibacterium acnes*, ozônio, atividade antibacteriana

Abstract: The aim of this study was to evaluate the efficiency of ozonized sunflower and coconut oils *in vitro* control of *Propionibacterium acnes*. Strains of *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 and ATCC 11827 were used. For ozonization were employees of sunflower oils and coconut. The ozone produced by the generator was driven by a silicone tube to the diffuser, thus generating 2ppm. The antibacterial efficacy was based on the dilution of the oils in microcentrifuge tubes and the Minimal Inhibitory Concentration was determined. It was found that the ozonized sunflower oil and coconut showed *in vitro* bactericidal effect on strains of *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 ATCC 11827 in concentrations 19-24%, with promising in the treatment of acne, however studies *in vivo* are needed.

Keywords: *Propionibacterium acnes*, ozone, antibacterial activity

Introdução

A pele é habitualmente colonizada pela espécie *Propionibacterium acnes*. Esta bactéria se caracteriza pela produção de enzimas e fatores quimiotáticos para os neutrófilos, dando origem a infiltrados inflamatórios na parede folicular e na derme circundante. Esta espécie bacteriana é considerada um dos agentes da acne inflamatória [1].

No tratamento da acne inflamatória são prescritos agentes antibacterianos tópicos como a tetraciclina, clindamicina e eritromicina. Estes quimioterápicos reduzem a população de *P. acnes* no folículo sebáceo e possuem ação comedolítica indireta e escassa atividade anti-inflamatória [2]. A antibioticoterapia na acne tem levantado questões importantes de saúde pública, devido ao surgimento de bactérias resistentes decorrentes à prescrição prolongada de antibióticos (tópica/sistêmica) em doses baixas, abaixo das concentrações inibitórias mínimas [3].

O aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos muitas vezes impossibilita o tratamento da acne, desafiando a terapêutica desta doença. A ozonioterapia é um recurso para o tratamento de doenças, principalmente devido à sua atividade altamente oxidativa que o caracteriza como um agente potencialmente biocida. A ação primária do ozônio sobre os micro-organismos se dá sobre a parede celular, decorrente da oxidação de glicopeptídeos, glicoproteínas e aminoácidos, alterando assim a permeabilidade e causando sua rápida lise [4]. Ao penetrar no interior da célula, o ozônio recombina-se com elementos citoplasmáticos promovendo a oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, fato que acarreta em clivagem dos mesmos com consequente morte celular [5].

De acordo com Lapolli *et al.* [6] a oxidação e a inativação de bactérias pelo ozônio são muito rápidas, além de não específicas em relação aos constituintes celulares, podendo agir sobre as bases pirimídicas e púricas dos ácidos nucleicos. No entanto, a sensibilidade das bactérias ao ozônio é dependente de alguns fatores, como condições laboratoriais, estágio de crescimento e con-

centração celular, tipos de micro-organismos, meios de cultura, temperatura, tempo de exposição e concentração de ozônio, entre outros [7]. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência dos óleos ozonizados de girassol e coco no controle *in vitro* de *Propionibacterium acnes*.

Materiais e métodos

Cepas bacterianas e meios de cultura – Foram utilizadas cepas de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 e *P. acnes* ATCC 6919 (American Type Culture Collection). Os meios de cultura utilizados foram tryptic soy agar (TSA, Oxoid®) e Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid®).

Ozonização dos óleos de girassol e coco – Para ozonização foi empregado 1 litro de óleo de girassol da marca Liza® e óleo de coco da marca Katigua®. O ozônio foi produzido por meio de um gerador que tem como princípio o efeito corona (Ozon & Life) e o oxigênio puro foi suprido via cilindro de oxigênio. O ozônio produzido de forma constante pelo equipamento foi conduzido por um tubo de silicone para o difusor, gerando assim 2ppm. O óleo de girassol foi exposto ao ozônio de forma direta por meio de um difusor, por um período de 6 horas, enquanto que o óleo de coco foi ozonizado por 10 horas. Ambos os óleos foram ozonizados em temperatura controlada de 25°C. Todo o procedimento de ozonização foi conduzido em uma capela de exaustão da marca Quimis modelo 216.11, visando minimizar os riscos de inalação do gás ozônio, seguindo as normas internacionais de segurança.

Após ozonização, os óleos foram avaliados quanto a sua esterilidade, sendo retirados 0,1mL de cada óleo e inoculados em placas de Petri contendo TSA, incubados a 37°C por 24/48 horas, quando foi verificada a ausência de crescimento microbiano. Foi considerado estéril o óleo que não apresentou nenhuma colônia. Os óleos ozonizados foram mantidos sob-refrigeração (8°C).

Eficiência antibacteriana dos óleos ozonizados – As cepas bacterianas foram reativadas em TSA, incubadas a 37°C por 24 horas. Uma colônia de cada espécie foi inoculada em 1000 mL de BHI e incubada a 37°C por 24 horas. A densidade bacteriana inicial foi determinada pela absorbância a 550nm usando a escala de McFarland standard (BioMérieux, Marcy-l’Etoile, France) que corresponde a concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Foi utilizado o teste de sensibilidade bacteriana aos respectivos óleos ozonizados, baseado na diluição dos óleos em microtubos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), de acordo com a metodologia preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standard [8]. Após incubação por 24 horas a 37°C, de cada microtubo foi coletado 0,1mL de amostra e foram inoculadas em tryptic soy agar e incubados a 37°C por 24 – 48 horas quando as colônias foram contadas. Em seguida foi adicionado em cada amostra 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 trifênil formazan. Isto tornou possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor [9].

Análise dos dados – Os dados obtidos foram tabulados e analisados pelo teste F na análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Student 0,5 de probabilidade, utilizando o “software” SAS-Statistical Analyses System – SAS.

Resultados

O corante 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) permitiu determinar de forma qualitativa (células vivas / células mortas) a viabilidade celular após o tratamento com os óleos de girassol e coco ozonizados em um curto período de tempo. Em 10 minutos, após aplicação do TTC, foi possível obter resultados da eficácia do ozônio sobre as cepas de *Propionibacterium acnes* ATCC11827 e *P. acnes* ATCC 6919, determinados pela coloração vermelha que indicou presença de células viáveis, e a falta de cor representou que as células estavam mortas pelo efeito bactericida do óleo ozonizado (Figuras 1 e 2).



Figura 1: Concentração inibitória mínima do óleo de girassol ozonizado no controle de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827. (Setas indicam a CIM).

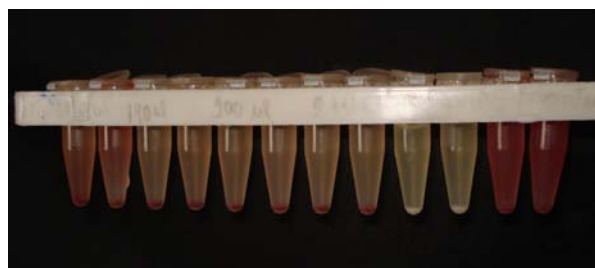


Figura 2: Concentração inibitória mínima do óleo de coco ozonizado no controle de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827. (Setas indicam a CIM).

Verificou-se que ambas as cepas de *P. acnes* foram suscetíveis à ação antibacteriana dos óleos ozonizados de girassol e coco (Tabela 1). O óleo de girassol ozonizado apresentou maior eficiência no controle da cepa de *P.acnes* ATCC 6919 quando comparada com *P.acnes* ATCC 11827 ($p>0,05$), sendo que a CIM foi de 200 µL e de 240 µL, respectivamente.

O óleo de coco ozonizado apresentou atividade antibacteriana nas duas cepas de *P. acnes*, sendo que a CIM foi de 190 μ L e de 220 μ L para ATCC 6919 e ATCC 11827, respectivamente.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos de girassol e coco ozonizados para o controle de *Propionibacterium acnes*.

Tratamentos	Óleo de Girassol	
	CIM	CBM
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919.	200 μ L (20%)	210 μ L(21%)
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC11827	240 μ L (24%)	240 μ L (24%)
Tratamentos	Óleo de coco	
	CIM	CBM
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919.	190 μ L(19%)	190 μ L(19%)
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC11827	220 μ L (22%)	230 μ L (23%)

Discussão

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo são agentes infecciosos envolvidos na acne inflamatória, que se caracteriza por ser uma doença de pele extremamente comum em adolescentes e jovens adultos. Sua patogênese é multifatorial, incluindo hiperqueratinização folicular, hiperplasia sebácea, hipercolonização bacteriana. A bactéria *Propionibacterium acnes* possui um papel relevante na resposta inflamatória da patogênese da acne [1,3]. Geralmente são empregados antibióticos na terapêutica desta doença. No entanto, as reações adversas causadas por esses fármacos tornam o tratamento desagradável, assim como o surgimento de resistência bacteriana. Por esse motivo, o uso de produtos naturais tem sido destaque na área de dermatologia [11].

O ozônio pode ser considerado como uma alternativa na terapêutica da acne. O ozônio é um potente agente biocida, capaz de inativar microorganismos, incluindo bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, células vegetativas e formas esporuladas, esporos fúngicos ou capsídeos virais, em baixas concentrações e em curto tempo de exposição [10]. No presente trabalho verificou-se que os óleos ozonizados de girassol e de coco inativaram as cepas de *P.acnes*, em concentrações que variaram entre 190 a 240 μ L (Tabela 1). A redução ou inativação da população microbiana depende da concentração de ozônio, do tempo de aplicação e dos micro-organismos envolvidos [4].

Conclusão

Os óleos ozonizados de girassol e coco apresentaram, *in vitro*, efeito bactericida sobre as cepas de *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 e *P. acnes* ATCC 6919, sendo promissores no tratamento da acne, no entanto estudos *in vivo* são necessários.

Referências

- [1] Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. Ed. Artmed, 2012.
- [2] Tan HH. Antibacterial therapy for acne: a guide to selection and use of systemic agents. American Journal of Clinical Dermatology. 2003; 4 (5): 307-14.
- [3] Figueiredo A, Massa A, Picoto A. Avaliação e tratamento do doente com acne – Parte II: Tratamento tópico, sistêmico e cirúrgico, tratamento da acne na grávida, algoritmo terapêutico. Revista Portuguesa de Clínica Geral. 2011; 27:66-76
- [4] Silva SB, Luvielmo MM, Geyer MC, Prá I. Potential use of ozone in the food processing. Semina: Ciências Agrárias. 2011; 32:659-682.
- [5] Velano HE, Nascimento LC, Barros LM, et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus*. Pesquisa Odontológica Brasileira. 2001; 15: 18-22.
- [6] Lapolli FR, Santos LF, Hassemer MEN, et al. 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, ed. Gonçalves R.F. pp.169-208. Vitória: PROSAB. 2003.
- [7] Thanomsab, B., Anupunppisit, V., Chanphetch, S., et al. Effects of ozone on cell growth and structural changes in bacteria. Journal of General Applied Microbiology. 2002; 48:93-199.
- [8] NCCLS-National Committee For Clinical Laboratory Standards. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically: Approved Standard M7.A6. 7.ed. Pennsylvania: Wayne. 2004.
- [9] Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. Methods in Molecular Biology. 2011; 716:157-168.
- [10] Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Ozonization of human HIV-infected plasmas for producing a global vaccine. Virulence. 2010; 1:215-217.
- [11] Barbosa, V, Scheiffer GFC, Cardozo AGL, Pietruchini E, Santos CZ, Silveira D, Bertocco, ARP. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e tintura de própolis frente à bactéria causadora da acne *Propionibacterium acnes*. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2014; 16(2): 169-173.