

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**AÇÃO BACTERICIDA (*IN VITRO*) DE GERADOR DE ALTA
FREQUÊNCIA SOBRE CULTURAS BACTERIANAS
COMUMENTE ENCONTRADAS EM FERIDAS CRÔNICAS**

Gabriela Manosso Bampi

Gabriela Manosso Bampi

**AÇÃO BACTERICIDA (IN VITRO) DE GERADOR DE ALTA
FREQUÊNCIA SOBRE CULTURAS BACTERIANAS
COMUMENTE ENCONTRADAS EM FERIDAS CRÔNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre
em Biotecnologia.

Orientadora Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare
Co-orientador Prof Dr Sérgio Echeverrigaray

Caxias do Sul
2014

B211a Bampi, Gabriela Manosso

Ação bactericida (in vitro) de gerador de alta frequência sobre culturas bacterianas comumente encontradas em feridas crônicas / Gabriela Manosso Bampi. – 2015.

52 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientação: Ana Paula Longaray Delamare.

Coorientação: Sergio Echeverrigaray.

1. Gerador de alta frequência. 2. Inibição. 3. Antimicrobiano. I. Delamare, Ana Paula Longaray, orient. II. Echeverrigaray, Sergio, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gabriela Manosso Bampi

**AÇÃO BACTERICIDA (IN VITRO) DO GERADOR DE ALTA
FREQUÊNCIA SOBRE CULTURA BACTERIANA COMUMENTE
ENCONTRADA EM FERIDAS CRÔNICAS.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 DE JANEIRO DE 2015.

Profa. Dra. Ana Paula Longaray Delamare
Orientadora

Prof Dr Sergio Echeverrigaray
Co-orientador

Prof .Dr Jomar Pereira Laurino

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian.

Profa .Dra. Lessandra Michelim Rodriguez N. Vieira

AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado;

a todos colegas, professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul;

aos meus orientadores Ana e Sérgio, pela oportunidade e pela orientação na conclusão deste trabalho.

e a todas pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram de alguma maneira para este trabalho, que não foram citadas aqui os meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
TABELA	VI
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISAO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Ação bactericida de alta frequência dentro da eletroterapia	13
2.2. Ozônio: o produto do gerador de alta frequência	14
2.3. Casuísticas das feridas crônicas	16
2.4. Contaminação feridas crônicas	18
2.5. Tratamentos de feridas crônicas	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Amostra Bacteriana	21
3.2 Equipamento	21
3.3 Avaliação da frequência e do tempo do gerador de alta frequência sobre bactérias	22
3.4 Avaliação da temperatura	22
3.5 Teste de viabilidade para bactérias e leveduras	23
3.6 Captura de PI (propidium iodine) e citometria de fluxo	23
3.7 Avaliação do estresse oxidativo por citometria de fluxo	25
3.8 Análise Estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

Índice de Figuras

Figura 1 – Visualização do faiscamento durante aplicação do gerador de alta frequência.	14
Figura 2 – Esquema da produção de ozônio através de correntes eletromagnéticas	15
Figura 3 – Gerador de alta frequência	21
Figura 4 – Tamanho do halo de inibição: <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 5 - Tamanho do halo de inibição: <i>Acinetobacter baumannii</i>	28
Figura 6 - Tamanho do halo de inibição: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Figura 7 – Curva de viabilidade celular: <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 8 – Curva de viabilidade celular: <i>Acinetobacter baumannii</i>	32
Figura 9 – Aumento da temperatura no eletrodo de vidro após a aplicação do gerador de alta frequência	33
Figura 10 - Análise de viabilidade celular por microscopia: <i>Acinetobacter baumannii</i> (476 Hz e 833Hz)	35
Figura 11 - Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo: <i>Acinetobacter baumannii</i> (833 Hz)	36
Figura 12 - Redução de viabilidade de <i>Acinetobacter baumannii</i> em função do tempo de tratamento com pulsos de (833 Hz)	36
Figura 13 - Análise de viabilidade celular por microscopia: <i>Staphylococcus aureus</i> (476Hz e 833Hz)	37
Figura 14 - Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo: <i>Staphylococcus aureus</i> (833 Hz)	38
Figura 15 – Aumento linear da fluorescência de Rodamina 123	40
Tabela	
Tabela 1 - Média e viabilidade durante tratamento sobre sobre <i>Acinetobacter baumannii</i> na frequência de 833Hz.	40

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	grau(s) Celsius
Hz	Hertz
kV	quilovolt(s)
LB	Lúria Bertani
L	litros(S)
min	minuto(s)
mm	milímetro(s)
nm	nanômetro(s)
NaCl	cloreto de sódio
O ₂	oxigênio
O ₃	ozônio
PI	iodeto de propídio
s	segundos
UFC	unidade formadora de colônias
µg	micrograma
µL	microlitro

RESUMO

Na prática fisioterapêutica utilizam-se diversas técnicas de eletroterapia com finalidades antissépticas e bactericidas. Porém, poucos estudos são encontrados sobre a ação de gerador de alta frequência no tratamento de enfermidades causadoras de contaminação/infecção, como feridas crônicas. Contudo, geradores de alta frequência são conhecidos por seu efeito bactericida e antisséptico, graças à produção de ozônio na superfície onde é aplicado. Tendo em vista que o gerador de alta frequência apresenta baixo custo, fácil manuseio e ação potencializadora do processo cicatricial, por meio da sua ação bactericida, a presente dissertação teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de gerador de alta frequência sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Realizou-se testes de tamanho de halo de inibição; contagem de unidades formadoras de colônia, citometria de fluxo usando o kit Live/Dead® para verificar integridade da membrana e rodamina 123 para avaliar o estresse oxidativo e avaliação da temperatura. Concluiu-se que o gerador de alta frequência apresenta ação bactericida, sendo, que o tempo e a frequência comportam-se de forma dependente, sua ação é dose-dependente e age de forma mais expressiva em bactérias Gram-negativas. Sua utilização não causa aumento da temperatura local, apenas no eletrodo de vidro e a produção de radicais livres aumenta com o tempo de exposição ao gerador de alta frequência (833Hz), enquanto a viabilidade celular decresce.

PALAVRAS-CHAVE: Gerador de alta frequência, inibição, antimicrobiano.

ABSTRACT

In the physiotherapy practices, various electrotherapy techniques are used with antiseptic and antibacterial purposes; however, few studies are found about the action of high-frequency generator in the treatment of diseases causing contamination/infection, such as chronic wounds; nevertheless, the high-frequency generator is known for its antiseptic and bactericidal effect by producing ozone at the surface where it is applied. Considering that the high-frequency generator is inexpensive, easy handling and potentiating action of the healing process through their bactericidal action, this thesis aims to evaluate the antimicrobial effect of high-frequency generator on bacteria of the genus *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. To analyzed the action of high-frequency generator the following tests are realizes: inhibition zone size; counting colony forming units, flow cytometry using the kit Live / Dead® to verify membrane integrity and rhodamine 123 to assess oxidative stress and temperature evaluation. Concluding that the high-frequency generator has bactericidal action, time and frequency behave as dependents, revealing its action is dose-dependent and acts more significantly in Gram-negative bacteria. Its use does not cause local temperature increase, only the glass electrode and the free radical production increases with time of exposure to the high-frequency generator (833Hz), while cell viability decreased.

KEYWORDS: High-frequency generator. inhibiting, antimicrobial

1. INTRODUÇÃO

Na prática fisioterapêutica, utilizam-se diversas técnicas de eletroterapia com finalidades antissépticas e bactericidas. Porém, poucos estudos são encontrados sobre a ação de geradores de alta frequência no tratamento de enfermidades causadoras de contaminação/infecção, como feridas crônicas.

Gerador de alta frequência, é o nome comercial atribuído a dispositivos eletrônicos que produzem correntes de alta frequência a partir da corrente elétrica de uso doméstico. Um gerador de alta frequência apresenta normalmente um porta-eletródo e diversos eletrodos de vidro - que podem conter em seu interior um vácuo parcial ou um gás. A passagem da corrente provoca uma ionização das moléculas de gás, as quais, sobre o forte impacto energético, tornam-se fluorescentes. Uma de suas principais ações é a formação do agente bactericida ozônio sobre a superfície em que é aplicado.

Na literatura, é muito bem descrita a utilização de geradores de ozônio, que possuem a capacidade de transformar o gás oxigênio (O_2) em gás ozônio (O_3). Dessa forma, um cilindro de O_2 fornece o gás para o interior do gerador que, através do uso de eletricidade, converte-o para a forma de ozônio.

Já o gerador de alta frequência refere-se a um tubo de vidro selado com uma substância gasosa. Quando uma corrente elétrica de alta frequência passa através do tubo de vidro, ocorre o efeito corona; não existe assim uma fonte de oxigênio puro.

O método de produção de ozônio mais comumente usado em equipamentos comerciais é de descarga corona. Este método pode empregar o ar seco, o oxigênio, ou uma combinação dos dois. A descarga ocorre quando o gás se torna parcialmente ionizado, o que resulta em um brilho violeta característico, quando o ar é utilizado.

O efeito corona trata-se de um fenômeno decorrente da dispersão da corrente elétrica para o ar. Quando este efeito ocorre sobre o isolante de máquinas pode levar a uma falha prematura em decorrência da produção de ozônio sobre ele; mas, quando o efeito ocorre sobre o tubo de vidro que está sendo aplicado sobre um tecido biologicamente ativo, o oxigênio que permeia o tubo é transformado em ozônio, gerando imediatamente alterações em numerosas biomoléculas.

Do ponto de vista microbiológico, a função principal da pele normal intacta, que é um tecido biologicamente ativo, é controlar as populações microbianas que habitam a superfície e impedir que o tecido subjacente se torne colonizado e invadido por agentes patogênicos. Dessa forma, lesões de pele interrompem sua função protetora, existindo assim uma porta de entrada para microrganismos. Feridas crônicas são comumente contaminadas por bactérias de origem da própria pele, da matéria fecal ou da região oral.

Estas feridas são importantes fontes de colonização por bactérias epidemiologicamente relevantes, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Bacteroides* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e outros bacilos Gram-negativos, podendo evoluir para infecções ou funcionar como reservatório de microrganismos multirresistentes.

Visto que o crescimento bacteriano interfere na cicatrização, tornam-se úteis inúmeros métodos de controle de microrganismos em feridas, sendo, neste trabalho, apresentada a utilização de gerador de alta frequência.

Tendo em vista que o gerador de alta frequência apresenta baixo custo, fácil manuseio e ação potencializadora do processo cicatricial, devido a sua ação bactericida, a presente dissertação teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de gerador de alta frequência sobre bactérias dos gêneros *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.

Através dessa pesquisa, pretendeu-se demonstrar resultados que possam ser utilizados em protocolos fisioterapêuticos para profissionais que desenvolvam sua prática clínica em ambientes hospitalares, ambulatoriais e domésticos, no tratamento de úlceras de pressão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ação do gerador de alta frequência dentro da eletroterapia

Cresce, não somente na área da fisioterapia dermato-funcional, a necessidade de se conhecer, de pesquisar e de comprovar métodos de eletroterapia que ajudem a melhorar e a normalizar a cicatrização de lesões cutâneas. Os efeitos biológicos da eletroterapia variam de acordo com as características do aparelho e as condições utilizadas, podendo ir de analgesia até estímulo da síntese de colágeno (Wollina *et al.*, 2012).

O gerador de alta frequência é um aparelho utilizado na área dermatológica que pode trabalhar sob distintos parâmetros físicos entre eles a corrente alternada, de média e de alta frequência. Alguns parâmetros encontrados normalmente são: frequência variando entre 1000 e 200.000 Hz, com tensão que oscila entre 25.000 e 40.000 V, sempre com intensidade na ordem de 100 mA (Higa *et al.*, 2007).

De acordo com a ANVISA, o aparelho de alta frequência é classificado como um dispositivo de classe I, o que significa que ele é um dispositivo para tratamentos estéticos e representa um baixo risco para o paciente. Assim sendo, o fabricante não é obrigado a registrar esse dispositivo e a divulgar todas as especificações técnicas, a fim de padronizar suas aplicações - embora não possam existir riscos e contraindicações associadas com o seu uso (Machado, *et al.*, 2011).

O uso mais expressivo desse aparelho é feito por profissionais que atuam na área dermato-funcional com finalidades de higienização da pele facial (Machado, 2011). Sua ação sobre a pele deriva da passagem de ondas eletromagnéticas pelo ar (efeito corona – Figura 1) provocando a formação de ozônio (Sampaio & Rivitti, 2001).

No que se refere especificamente ao gerador de alta frequência, sua indicação tem por base a ação bactericida, podendo ser utilizado na desinfecção após extração de eflorescências acneicas, desinfecção do couro cabeludo, úlceras diabéticas, e úlceras por pressão infectadas, psoríase (fechamento das lesões), afecções ungueais, verrugas periungueais e onicomicose. A aplicação, utilizando os eletrodos da alta frequência, pode ser direta ou a distância. Na aplicação direta, o eletrodo é colocado sobre a área a tratar, deslizando-o sobre a pele, em forma de massagem suave. Na aplicação a distância ou faiscamento (Figura 1), o eletrodo se mantém a uma curta distância da pele (milímetros), sem tocá-la. Em decorrência da alta voltagem da corrente, saltam faíscas do eletrodo até a superfície da pele a ser tratada. Deve-se levar em conta a sensibilidade da pessoa a ser tratada com esse tipo de descargas elétricas (Caloy, 2011).

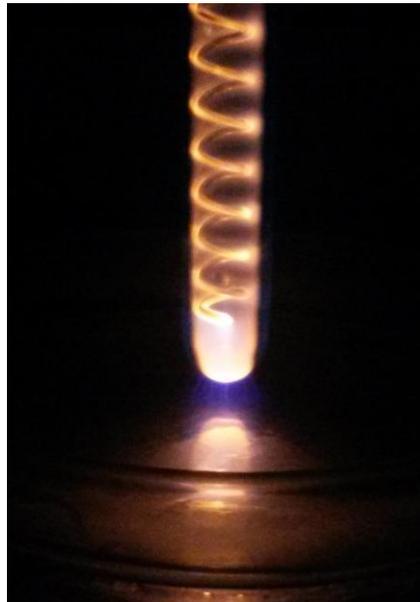


Figura 1. Visualização do faiscamento durante aplicação do gerador de alta frequência.

2.2 Ozônio: o produto do gerador de alta frequência

Conforme Higa *et al.* (2007), uma das principais ações do gerador de alta frequência é a formação de ozônio sobre a superfície em que é aplicado. Por este motivo, torna-se relevante o conhecimento desta molécula e sua interação com um tecido biologicamente ativo.

O gerador de ozônio que utiliza o efeito corona é constituído por dois eletrodos submetidos a elevada diferença de potencial (aproximadamente 1000 V). O ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre estes dois eletrodos. Quando os elétrons possuem energia suficiente começam a ocorrer colisões que causam a dissociação do oxigênio e a consequente formação do ozônio (Figura 2) (Guzel-Seydim *et al.*, 2004).

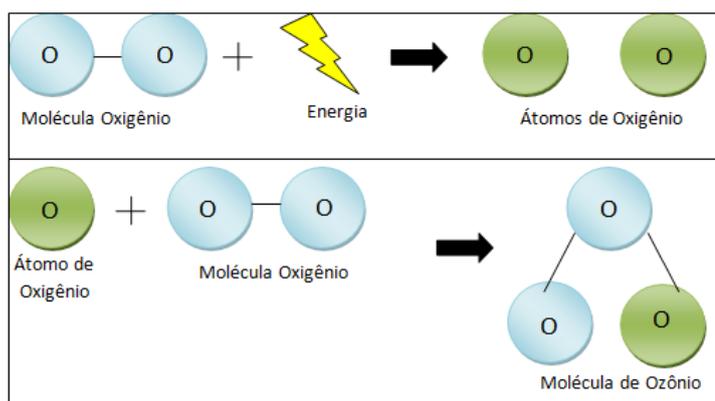


Figura 1 Esquema da produção de ozônio através de correntes eletromagnéticas
(no esquema representado em amarelo)

O ozônio (O₃) é eficaz no controle de bactérias, fungos, protozoários e vírus (Kim *et al.*, 2003). Em 1997, os US-FDA (United States Food and Drug Administration) concedeu o estatus do ozônio como seguro (GRAS- Generally Recognized As Safe) e, em 2001, recebeu total aprovação US-FDA como um agente de

higienização para alimentos. Desde então, o número de estudos que avaliaram a sua aplicação na indústria de alimentos tem aumentado rapidamente (Ong & Ali, 2015).

O ozônio demonstra ser eficaz contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, contra fungos e contra agentes virais; sendo que o nível de inativação microbiana por ozônio altera-se de acordo com a quantidade de matéria orgânica que rodeia as células (Restaino *et al.*, 1995).

Para Russell (2003), a ação bactericida do ozônio se baseia principalmente na oxidação das ligações bissulfeto que mantêm o dobramento das proteínas. Essa oxidação leva à destruição das proteínas estruturais dos microrganismos e à inativação das enzimas necessárias para sua sobrevivência.

O ozônio é uma variedade alotrópica do oxigênio e por isso possui alta instabilidade, voltando a se dissociar em curto espaço de tempo (Stübinger *et al.*, 2006). Para Bocci (2007), em ordem de preferência, o ozônio reage com ácidos gordurosos poliinsaturados, antioxidantes (como ácido ascórbico e úrico) e compostos tiol com grupo -SH (como cisteína, glutadiona e albumina). Todos esses reagentes funcionam como elétrons doadores e sofrem oxidação, e as reações que ocorrem formam simultaneamente moléculas de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produtos da oxidação lipídica. Essas moléculas são responsáveis pelas reações bioquímicas induzidas pelo ozônio (Bocci, 2007).

Uma vez que o ozônio é conhecido por matar microrganismos por romper as paredes celulares e membranas citoplasmáticas, ele torna-se um agente nos tratamentos que objetivam a morte bacteriana (Nagayoshi *et al.*, 2004).

Dúvidas sobre a ação do ozônio sobre células animais são fortemente discutidas, porém inúmeros autores relatam que em níveis baixos, próximos de 500ug/m³, é inofensivo, porém deve-se considerar que qualquer inalação do ar implica

em doses de ozônio que imediatamente reagem nas células das vias aéreas, gerando espécies reativas de oxigênio (Guerra *et al.*, 1997) e produtos da oxidação lipídica (POL) (Bastacky *et al.*, 1995)

2.3 Casuísticas das feridas crônicas

Com a presença de uma ferida na pele, todas as funções são alteradas. De uma forma genérica, a ferida representa a quebra da continuidade das estruturas do corpo, exibindo uma ruptura das estruturas, e das funções normais dos tecidos. Na pele, a ferida é definida como a perda da cobertura cutânea, que pode atingir não apenas a pele, mas também os tecidos subcutâneos, músculos e ossos (Ferreira *et al.*, 2006).

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico que inclui vários níveis de organização temporal e funcional, envolvendo a interação entre células e sistemas mensageiros. Compreende três etapas sobrepostas: inflamatória, proliferativa e remodelação. A primeira é caracterizada pela hemostasia, resultante da formação do coágulo de fibrina, e migração de leucócitos fagocitários, os quais removerão as substâncias estranhas e micro-organismos. A segunda envolve, principalmente, a migração e proliferação de três classes celulares: fibroblastos, endotélio e queratinócitos, além da deposição de fibronectina sobre o arcabouço de fibrina, formando o fibronexus; da secreção de colágeno III, em sua maioria, sobre este último e da síntese de outros elementos matriciais, sendo o fibroblasto o maior responsável por estas mudanças estruturais. Na terceira e última fase ocorre mudança no padrão de organização do colágeno e de seu tipo principal, ocorrendo substituição de colágeno III por I, aumento no número de ligações cruzadas entre os monômeros dessa substância e orientação prevalente nas linhas de stress da pele, fenômenos que aumentam a

resistência da ferida. Todo o processo de cicatrização é controlado por polipeptídeos chamados fatores de crescimento, que modificarão a fisiologia de suas células-alvo (Isaac, 2012).

A perda tecidual, se não for resolvida através destas etapas, evolui para uma ferida crônica, que leva mais de três semanas para fechar. Um exemplo de ferida crônica é a úlcera de pressão (também conhecida como úlcera de decúbito ou escara). Estas úlceras são áreas que sofrem pressões prolongadas e que excedem a pressão capilar ocasionando um colapamento do capilar, culminando em necrose celular e em destruição vascular. Uma pressão de 70 mmHg aplicada por mais de duas horas, sem nenhum momento de alívio, pode provocar destruição dos tecidos, ocasionando o início de uma ferida (Nettina, 2007).

A úlcera de pressão acomete principalmente indivíduos confinados ao leito, semicomatosos ou inconscientes, além de idosos institucionalizados, pois acabam permanecendo por longos períodos no mesmo posicionamento. A pressão intensa é o fator etiológico mais comum, mas a fricção e cortes também podem contribuir para seu desenvolvimento (Nixon *et al.*, 2005).

Muitos outros fatores podem afetar a cicatrização, como os locais que incluem a presença de corpos estranhos, maceração dos tecidos, isquemia ou fatores diversos, como a idade avançada, desnutrição, diabetes e doença renal. Além dos fatores locais e sistêmicos que prejudicam a cura, a redução dos fatores de crescimento de tecidos, o desequilíbrio entre as enzimas proteolíticas e os seus inibidores, e a presença de células senescentes parecem ser particularmente importantes na cura de feridas crônicas (Harding *et al.*, 2002).

2.4 Contaminação de feridas crônicas

Diferentes estudos concordam que há presença universal de *S. aureus* em feridas crônicas (Gjødsbøl *et al.*, 2006; Colsky *et al.*, 1998; Valencia *et al.*, 2004). A bactéria *S. aureus* apresenta habilidade de desenvolver resistência rapidamente aos antibióticos, o que contribui para causar infecções aos pacientes em ambientes hospitalares (Tortora *et al.*, 2003).

No que se refere ao *A. baumannii*, o microrganismo tem sido encontrado em feridas de pele, bem como também nas secreções de vias aéreas (Sebeny, *et al.*, 2008). Nos últimos anos, tem sido designado como um patógeno humano de "alerta vermelho", gerando atenção entre a comunidade médica, por causa de sua excepcional capacidade de desenvolver resistência a todos os antibióticos atualmente disponíveis (Cerqueira & Peleg, 2011). *A. baumannii* tem uma alta incidência entre indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles que experimentaram uma prolongada (> 90 dias) internação hospitalar (Montefour *et al.*, 2008). Este organismo é um desafio particular em unidades de terapia intensiva, onde é responsável por uma grande variedade de infecções, incluindo pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções de feridas, infecções do trato urinário e bacteremia (Doyle *et al.*, 2011; Hanberger *et al.*, 2004). Os dados também apoiam a visão de que as infecções causadas por *Acinetobacter* são mais comuns em pacientes criticamente doentes que recebam cuidados no ambiente da UTI (Karlowsky *et al.*, 2003).

2.5 Tratamentos de feridas crônicas

Diante da importância em controlar e prevenir feridas crônicas infectadas, terapias de descolonização são estudadas com frequência. No que diz respeito às opções de terapias de descolonização, elas podem ocorrer por tratamento sistêmico (mediante o uso de antibióticos via oral) ou tópico (mediante o uso de medicamentos locais);

entretanto, não há evidências suficientes que indiquem qual tratamento é mais eficaz, o sistêmico ou tópico (Loeb *et al.*, 2003).

Os métodos atuais usados para tratar feridas crônicas contaminadas incluem desbridamento, uso de antibióticos ou eletroterapia (Mandelbaum *et al.*, 2003); porém independentemente do tratamento, uma ferida crônica pode não conseguir a cura através do processo natural, causando um impacto significativo na saúde e na economia (Evangelista *et al.*, 2012).

Como o gerador de alta frequência oferece um baixo custo e fácil manuseio, torna-se importante o entendimento do seu uso para fins terapêuticos em âmbito hospitalar e ambulatorial. O uso mais expressivo deste aparelho é feito por profissionais que atuam na área dermatofuncional com finalidades de higienização da pele facial - o uso do gerador de alta frequência é uma realidade em clínicas estéticas; o uso em feridas crônicas foi evidenciado apenas em camundongos (Sá, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as cepas das seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Pseudomonas aeruginosa* (POA01) e *Acinetobacter baumannii* (isolado hospitalar).

3.2 Equipamento

O equipamento utilizado foi fabricado e fornecido pela empresa *Tone Derm*, de Caxias do Sul/RS-Brasil. O equipamento *Versatile AF7* atinge a potência máxima na frequência de 1,624 Hz, com tensão de saída de 12kV (Figura 3).



Figura 3. Gerador de alta frequência (à esquerda, aparelho, à direita, suporte de fixação com caneta e eletrodo de vidro).

3.3 Avaliação da frequência e do tempo do gerador de alta frequência sobre bactérias

As bactérias foram crescidas em caldo *Luria Bertani* por 24 horas a 37°C. Após este período, as culturas foram diluídas em salina até obtenção de 0,5 de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A amostra bacteriana foi inoculada **com swab** em placas de Petri, contendo meio ágar Luria Bertani (LB) sólido. Após sua inoculação, foi aplicado o gerador de alta frequência, com o auxílio de um suporte de fixação. O eletrodo de vidro ficou a 1cm do meio plaqueado. As frequências testadas foram de 342, 476, 617 e 833Hz. Estas frequências foram testadas em tempos distintos de 0 (zero), 10 (dez), 30 (trinta), 60 (sessenta) e 180 (cento e oitenta) segundos em triplicata.

3.4 Avaliação da temperatura

Para avaliar se o efeito inibitório do crescimento bacteriano ocasionado pelo gerador estava relacionado com o aumento de temperatura, foram feitos três testes individuais: primeiramente, papel térmico foi exposto à maior potência e ao maior tempo, e visualizada a modificação da tonalidade do papel. Após, foi aplicado o gerador de alta frequência sobre placa contendo meio LB, e a temperatura foi aferida com termômetro digital (Termômetro *Spectra IR ST-600*). Por último, fotos com câmera infravermelha *i60 (FLIR)* foram feitas durante a aplicação.

3.5 Teste de viabilidade bacteriana

Para avaliar o efeito de gerador de alta frequência sobre a viabilidade celular, foram utilizadas as frequências de 476 e 833 Hz, em seguida contagem das unidades formadoras de colônia.

As duas bactérias (*S. aureus* e *A. baumannii*) foram crescidas por 24 horas em meio líquido Luria-Bertani (LB) a 37°C. Na sequência, as amostras foram diluídas com solução salina 0,9% (m/v) ajustando a absorção para 0,362 (1 na escala de McFarland). Feita a diluição, os microrganismos foram mantidos por 30 minutos, em repouso. Após este período, 1 mL da suspensão bacteriana ajustada foi submetida ao gerador de alta frequência (476 e 833 Hz). As amostras foram tratadas nos tempo 0 (zero), 30 (trinta), 60 (sessenta) e 180 (cento e oitenta) segundos, imediatamente diluídas e plaqueadas pelo método “drop plate” em meio ágar LB. As placas foram levadas à estufa bacteriológica a 37°C, por 24 horas. Passado o período, foram feitas contagens de unidades formadoras de colônia, e os resultados foram expressos em redução do log₁₀ de UFC.

3.6 Avaliação de integridade de membrana bacteriana

O kit Live/Dead® BacLight™ (Molecular Probes) foi utilizado para avaliação da integridade de membrana por exclusão seletiva tanto para a avaliação microscópica quanto para a citometria de fluxo. A coloração através do Kit Live/Dead consiste na combinação de dois compostos, nomeadamente, Syto9 e iodeto de propídio (PI). Estes compostos variam entre si, na capacidade de penetrar nas membranas de bactérias e também nas características de espectro, sendo que Syto 9 penetra na células independentemente da integridade de membrana, já PI somente entra em células que apresentam alteração na integridade da membrana.

Inicialmente as culturas bacterianas foram crescidas até atingirem a fase estacionária (24h), após este período, 25 mL de cultura foram centrifugadas a 10000×g por 10 min. Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 2 mL de 0,85% NaCl. O volume de 2 mL foi distribuído em 2 tubos de 50 mL. Em um dos tubos foram adicionados 20 mL de 0,85% NaCl, e no, outro tubo, adicionados 20 mL de isopropanol 70%. Em seguida, ambos os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 1 h, agitando-os levemente a cada 15min. Depois deste período, foram centrifugados a 10000×g por 10min. Os *pellets* foram ressuspensos em 20 mL de 0,85% NaCl e, novamente, centrifugados. Depois, os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de 0,85% NaCl e, a partir de então, realizaram-se os testes pertinentes, utilizando as células vivas, ou seja, não aquelas que foram tratadas com isopropanol (controle negativo). Já as células vivas foram tratadas com 476 e 833 Hz, no tempo de 180 (cento e oitenta) segundos.

Para a coloração, combinaram-se volumes iguais de Syto9 e de iodeto de propídio, em um tubo de microcentrifuga. Após, foi adicionado 1,5 µL da mistura de corantes para cada 500 µL de suspensão bacteriana. Homogeneizou-se a suspensão, que foi mantida abrigada da luz, sob temperatura ambiente, por 15 minutos.

Para avaliação microscópica, 5µL da solução, foram colocados sobre a lâmina e recobertos com uma lamínula para visualização da fluorescência, sendo visualizados no microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX43F) com aumento de 100×. Para citometria, as células foram então lavadas e ressuspensas com solução salina tamponada com fosfato (ph?), e transferidas para tubos de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência foi medida com um FACSCalibur (Becton Dickinson), e o valor do canal de fluorescência média de 20.000 células foi determinado mediante a análise da população de células vivas ou mortas, que foi definido por dispersão frontal e lateral,

utilizando BD software CellQuest Pro (BD Biosciences). Os dados foram analisados em Forward Scatter (FSC) e Side Scatter (SSC) para seleção do conjunto de células, e FL-1 (excitação 488nm e emissão 533/30nm) e FL-3 (excitação 488nm e emissão 670nm), para determinação de células coradas com Syto9 (viáveis) e PI (mortas), respectivamente. Os resultados foram representados em gráficos de dispersão.

3.7 Avaliação de estresse oxidativo por citometria de fluxo

As células foram cultivadas até a fase estacionária a 37°C. Em seguida, as células foram tratadas nos tempos de 0 (zero), 60 (sessenta), e 180 (cento e oitenta) segundos, usando exclusivamente a frequência de 833Hz.

As células tratadas foram lavadas em solução salina. Para o ensaio de viabilidade, as células foram coradas com o kit Live/Dead® BacLight™ (já descrito), em conformidade com as instruções do fabricante.

Para o ensaio de estresse oxidativo, o corante rodamina123 (Sigma) foi utilizado. Após tratamento, as amostras foram incubadas por 1 hora, e, em seguida, as células foram lavadas em solução salina; depois, foram ressuspensas em 1 ml de salina e adicionada rodamina 123 (na concentração final de 5 µg/mL). Em seguida, foram incubadas durante 1 h. As células foram então lavadas, ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato e transferidas para tubos de citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência foi medida com um FACSCalibur (Becton Dickinson), e o valor do canal de fluorescência média de 20.000 células foi determinado mediante a análise da população de células vivas ou mortas, definido por dispersão frontal e lateral, utilizando BD software CellQuest Pro (BD Biosciences). Os dados foram analisados em Forward Scatter (FSC) e Side Scatter (SSC) para seleção do conjunto de células e FL-1 (excitação 488nm e emissão 533/30nm) para determinação de rodamina 123.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram submetidos a análises de variância com testes de comparação de médias (Tukey – $P < 0,05$), utilizando o programa computacional SPSS versão 17.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foi realizada a avaliação da inibição de crescimento bacteriano pela formação de halos (diâmetro) em tratamentos envolvendo distintas frequências de onda (342 a 833Hz) e tempo de exposição. Nesses ensaios, foram utilizadas três bactérias, comumente encontradas em feridas: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Conforme pode ser observado, nas Figuras 4 a 6, a aplicação de pulsos de alta frequência levou a formação de halos de inibição nas três espécies avaliadas, sob as quatro frequências utilizadas.

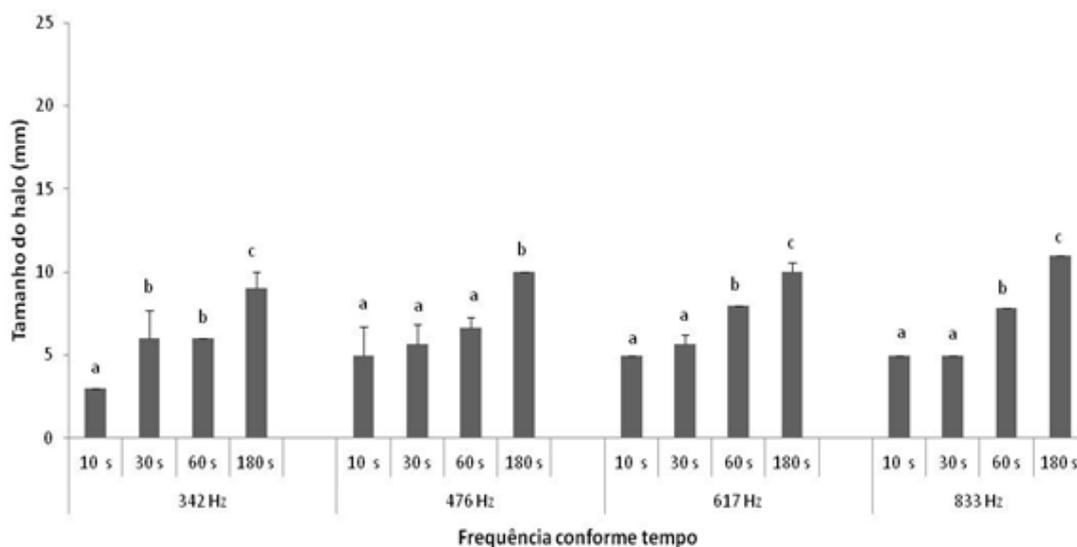


Figura 4 – Tamanho do halo de inibição após aplicação do gerador de alta frequência sobre *Staphylococcus aureus*. Legenda: ^{a,b,c} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância

Por outro lado, a análise estatística dos dados mostrou interação tripla altamente significativa - bactéria x tempo x frequência - no tamanho dos halos

observados, indicando que distintas bactérias apresentam comportamentos diferentes, dependendo do tempo e da frequência aplicada.

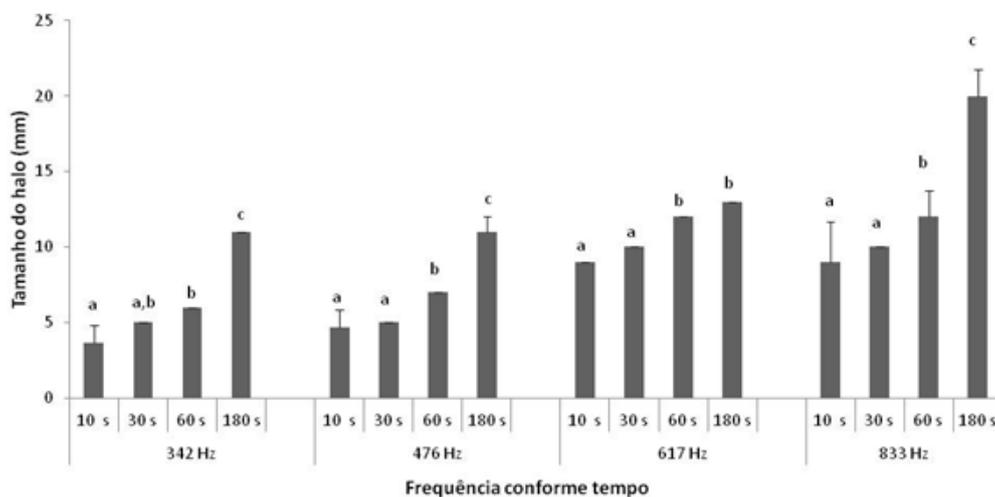


Figura 5 – Tamanho do halo de inibição após aplicação do gerador de alta frequência sobre *Acinetobacter baumannii*. Legenda: ^{a,b,c,d} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância

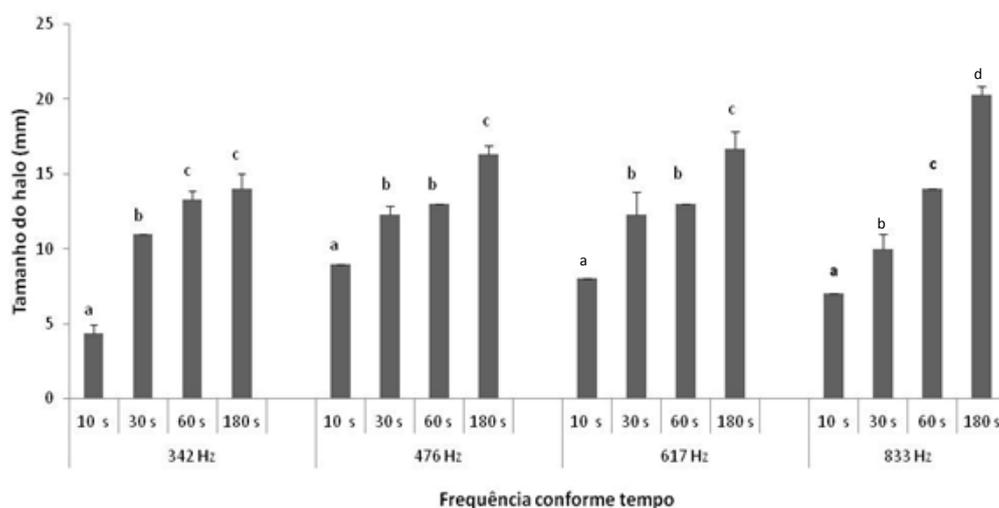


Figura 6 – Tamanho do halo de inibição após aplicação do gerador de alta frequência sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Legenda: ^{a,b,c,d} Letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância

Na Figura 4, pode ser observado que *Staphylococcus aureus* apresentou halos

de inibição em todas as frequências e em todos os tempos avaliados; com comportamento semelhante (tamanho de halo) em todas as frequências e aumento do tamanho de halo em tempos de exposição maiores, especialmente em 180 segundos. Por outro lado, os ensaios com *A. baumannii* (Figura 5) revelaram halos de inibição maiores quanto maior a frequência, especialmente 617 e 833Hz, e aumento linear do diâmetro de halo em relação ao tempo com $R= 0,9918$, com máxima na frequência de 833Hz.

Comportamento semelhante foi observado em ensaios com *P. aeruginosa* (Figura 6), porém com halos de inibição semelhantes nas distintas frequências avaliadas. Assim como *A. baumannii*, *P. aeruginosa* mostrou aumento do diâmetro do halo proporcional ao tempo de tratamento, com $R= 0,9567$ na frequência de 833Hz.

A comparação entre as bactérias avaliadas quanto ao diâmetro do halo de inibição utilizando frequência de 833Hz mostrou que *S. aureus* apresentou halos menores do que *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Esta diferença pode ser atribuída à maior resistência desta espécie ou à presença de arranjos (cachos) típicos de *Staphylococcus* formados por 10 a 20 células, e que garantem o desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), mesmo quando a viabilidade é reduzida. Efeito microcida de pulsos de alta frequência em aplicações sucessivas de 10 e 15 minutos sobre *S. aureus* e *Candida tropicalis* foi constatado por Martins *et al.* (2012) e Higa *et al.* (2007), respectivamente.

Tordiglione *et al.* (2014), já descreveu a especificidade do ozônio no que se refere a composição da membrana. Afirmando que o ozônio poderia ter um efeito mais significativo em microrganismos Gram-negativos (especialmente *E. coli*), pois o seu alvo é o grupo sulfidril na membrana bacteriana. Assim, confirmando a correlação entre a atividade bactericida do ozônio e a permeabilidade da membrana, que é um questão específica de cada microrganismo.

De uma forma mais ampla Thanomsub *et al.* (2002) descreve que a explicação para esta especificidade é a diferença na estrutura da parede celular entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As paredes celulares de bactérias Gram-positivas são constituídas por muitas camadas de peptidoglicanos formando uma estrutura rígida enquanto que as paredes celulares de bactérias Gram-negativas consistem de uma membrana externa, que contém lipoproteína, lipopolissacarídeos e algumas camadas de peptidoglicanos abaixo. Estudo realizado por Komanapalli e Lau (1998) sugere que o ozônio reage mais imediatamente com proteínas do que com lipídios.

Num segundo conjunto de experimentos, *S. aureus* e *A. baumannii* foram crescidas em meio LB líquido até fase estacionária: as células foram lavadas e ressuspendidas em salina, colocadas em placa de Petri e tratadas por distintos intervalos de tempo (0 a 180s) com frequências de 476 e 833 Hz. Após cada intervalo, foram realizadas diluições seriadas e plaqueadas em meio LB para avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Conforme pode ser observado na Figura 7, *S. aureus* apresentou uma redução linear da viabilidade em relação ao tempo de exposição, em frequência de 476 Hz, atingindo 40% de redução do UFC, com 180 segundos de tratamento.

Já, utilizando a frequência de 833Hz, observou-se uma rápida redução de viabilidade, nos primeiros 10 segundos de tratamento, e um comportamento linear em tempos maiores, atingindo redução de 85% no número de UFC, com 180 segundos. Estes dados confirmam a maior eficiência da frequência de 833Hz em relação à frequência de 476Hz, previamente observada nos ensaios de formação de halo.

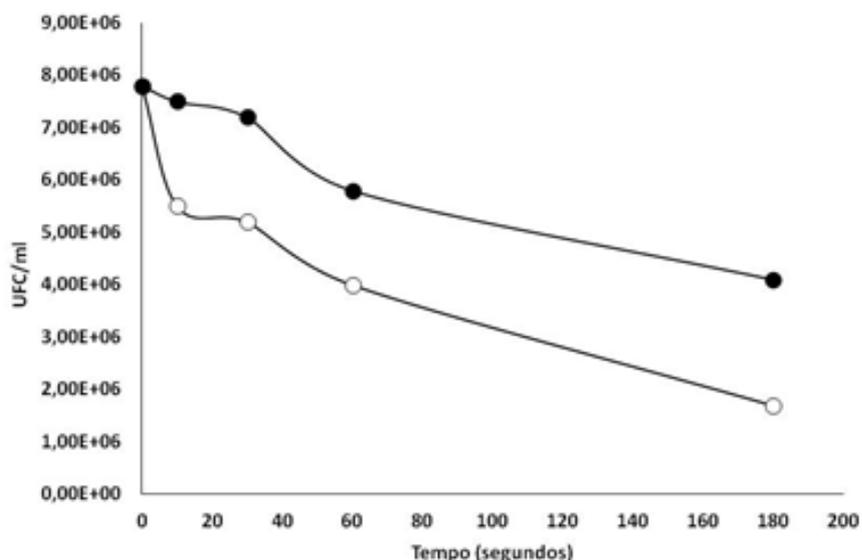


Figura 7 – Curva de viabilidade das bactérias após tratamento com frequência de 833Hz (círculo aberto) e 476Hz (círculo fechado) sobre *Staphylococcus aureus*. Os dados mostrados são a média de três repetições.

Já, nos ensaios realizados com *A. baumannii* (Figura 8), observou-se abrupta redução do número de UFC, após 30s (32,5%) em suspensão de células tratada com frequência de 476Hz, com pequena redução da viabilidade em tempos maiores, atingindo apenas 40% de redução do número de UFC, após 180s de tratamento. Por outro lado, tratamentos realizados com 833Hz mostraram redução importante após apenas 10s (40%) atingindo 85% de redução no número de UFC com 180s, dado muito próximo aquele observado com *Staphylococcus aureus*.

Relação entre intensidade de pulsos e tempo de exposição sobre a viabilidade bacteriana foi observada por Gao *et al.* (2014) utilizando ultrassom. Esta relação, de acordo com os autores, está associada à produção de ozônio e os radicais livres gerados pela corrente de alta frequência.

Ohkawa & Akitsu (2014), indicam que há ação bactericida do ozônio sobre bactérias formadoras de esporos: *Geobacillus stearothermophilus* e *Bacillus*

atrophaeus, e espécies selecionadas de agentes patogênicos oportunistas, tais como *Aspergillus niger*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, e *Candida albicans*, sendo que existe influência do tempo de exposição, sendo assim tempo-dependente.

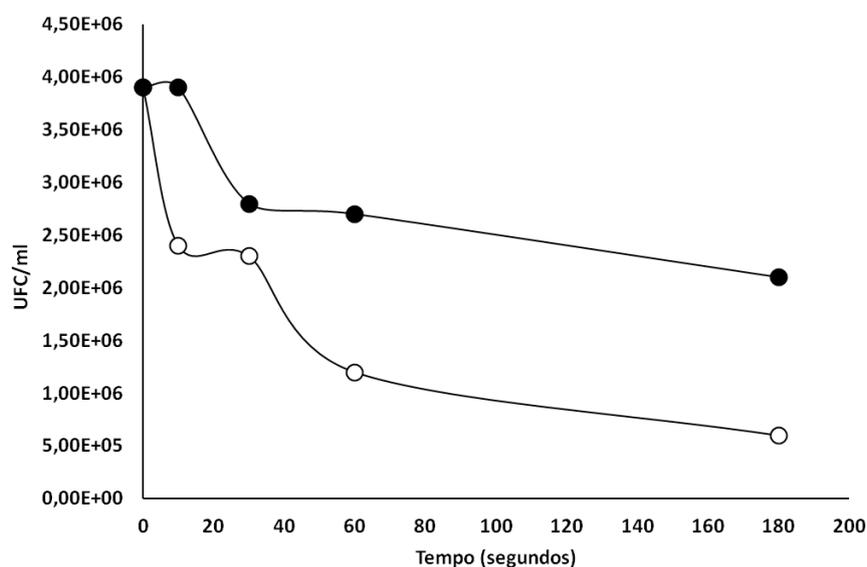


Figura 8 – Curva de viabilidade de *Acinetobacter baumannii* após tratamento com frequência de 833Hz (círculos abertos) e 476Hz (círculos fechados) em função do tempo. Dados médios de três repetições independentes.

Considerando que o gerador de alta frequência descarrega corrente elétrica sobre a superfície do meio, atingindo a população bacteriana, pensou-se inicialmente na possibilidade de aumento de temperatura local como responsável pela formação de halos e redução no número de UFC. Para comprovar esta hipótese, a temperatura local, antes e após descarga, foi avaliada por três metodologias: (1) utilização de papel térmico, (2) medição da temperatura com termômetro digital e (3) análise com câmera infravermelha *i60*.

A aplicação de 833 Hz por 180s não levou a alterações no papel térmico, nem a aumento de temperatura quando utilizado o termômetro digital. Conforme pode ser observado nas imagens da Figura 9, há um importante aumento da temperatura na

extremidade do eletrodo, mas não na superfície do meio, independentemente da frequência ou tempo (até 180s).

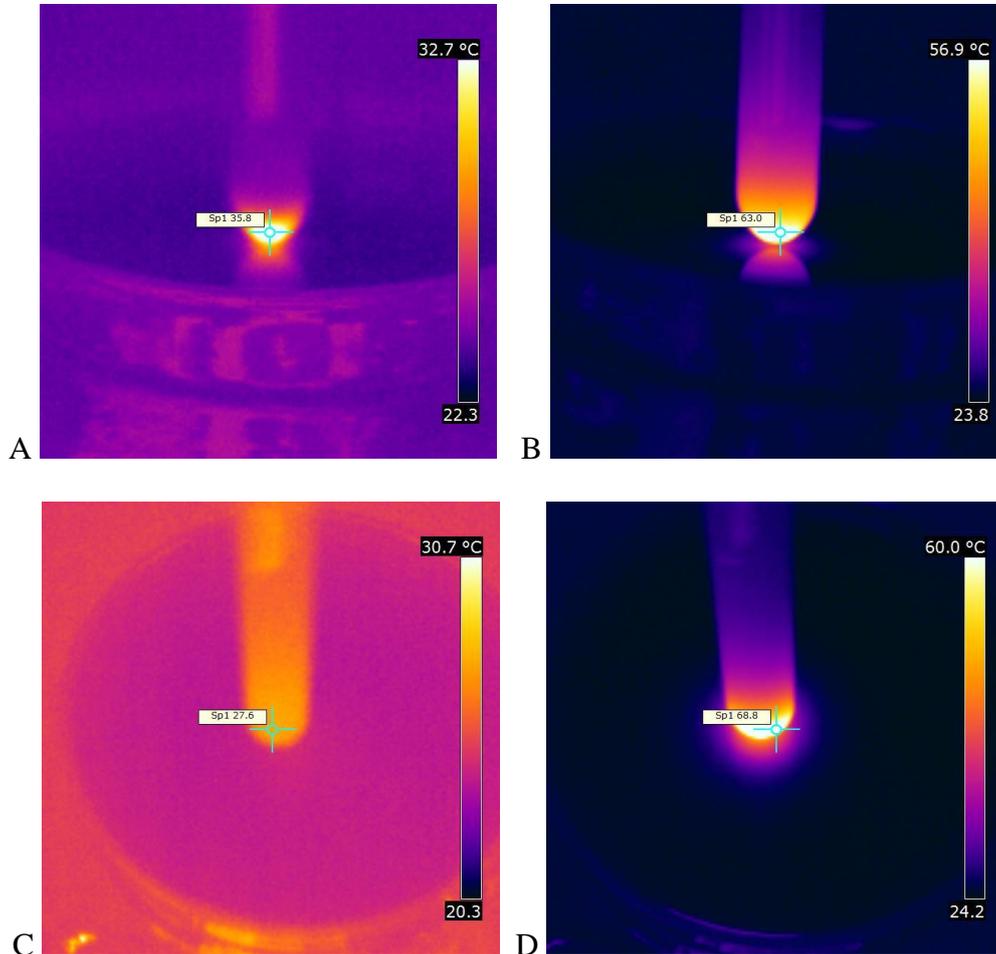


Figura 9. Aplicação do gerador de alta frequência sobre placa de Petri contendo meio LB ágar: A: 476Hz 10s. B: 476Hz 180s. C: 833Hz 10s D: 833Hz 180s.

Assim sendo, pode-se afirmar que o uso do gerador de alta frequência não gera aumento de temperatura no local de aplicação e consequentemente a redução da população bacteriana não é decorrente de inativação térmica. Kazi *et al.* (1996), ao registrarem a patente de um gerador, afirmaram que o calor produzido pelo processo de ozonização é dissipado através da superfície do eletrodo, de tal forma que não haveria aumento significativo da temperatura no local.

Estudo que utilizou um gerador de ozônio (*Pacific Ozone, Egret Court Benicia, CA*) sobre legumes, mostrou que, durante o processamento, a temperatura foi mantida sob temperatura ambiente (20°C) e não houve aumento significativo no final do processo, o que confirma que o aumento de temperatura não é o responsável pela formação de halos de inibição ou pela redução da população bacteriana (Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2013).

O impacto do gerador de alta frequência sobre a morfologia celular e a integridade celular foi verificada por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. As células após tratamento foram coradas com o *Kit LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability*. Este *kit* contém dois compostos fluorescentes: Syto9 e o iodeto de propídio (PI) que se ligam aos ácidos nucleicos. O Syto9 penetra nas bactérias e cora todas as células com membrana intacta ou danificada, gerando fluorescência de cor verde com excitação em 483nm e emissão em 503nm, enquanto o iodeto de propídio penetra apenas em células que apresentam a membrana com permeabilidade alterada, condição que geralmente é associada com morte celular, gerando fluorescência de cor vermelha alaranjada com excitação em 535nm e emissão em 617nm (Boulos *et al*, 1999).

Ensaio realizado com *A. baumannii* mostraram que, quando as bactérias são submetidas a 833Hz por 180s, grande parte das células apresentam coloração com iodeto de propídio, indicando perda de integridade da membrana celular e consequente morte bacteriana. Morte celular (coloração com PI) não foi observada no controle e no tratamento com 476Hz por 180s (Figura 10). Visando à quantificação, as amostras coradas com SYTO9 e PI foram avaliadas por citometria de fluxo, permitindo-se contagem de bactérias totais coradas com SYTO9 e contagem de bactérias mortas coradas com PI.

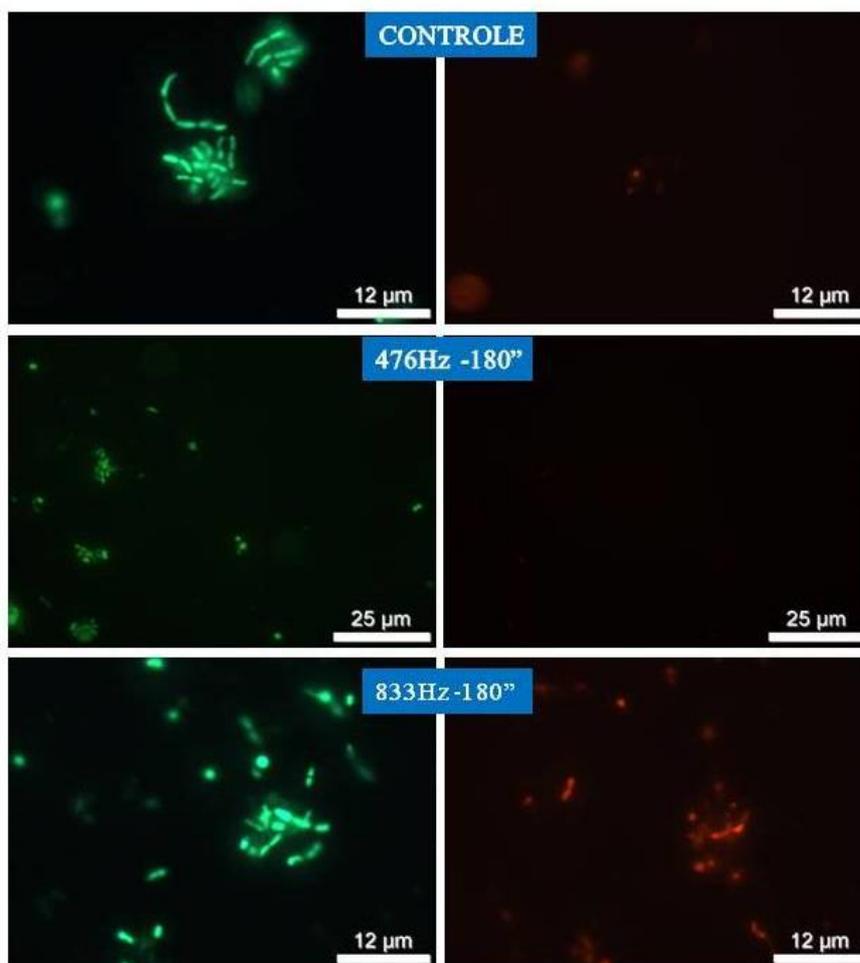


Figura 10 - Análise de viabilidade celular por microscopia utilizando Syto9/PI em tratamentos de *Acinetobacter baumannii* com gerador de alta frequência (476 Hz e 833Hz).

Os resultados da análise por citometria de fluxo de *A. baumannii* tratada com 833 Hz por 0 (zero), 30 (trinta), 60 (sessenta) e 180 (cento e oitenta) segundos permitiram observar aumento progressivo do número de bactérias mortas (PI), confirmando a atividade bactericida do tratamento com pulsos de alta frequência.

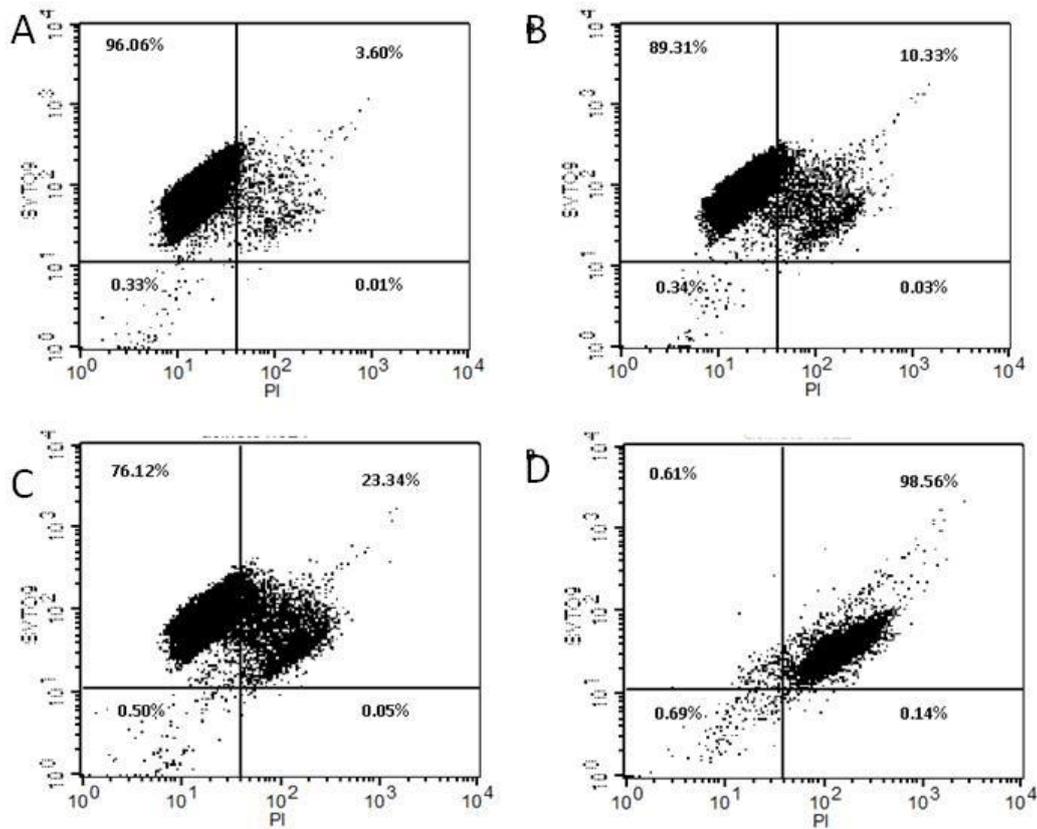


Figura 11 - Análise de viabilidade celular Syto9/PI por citometria de fluxo (20.000 eventos por amostra) em tratamentos de *Acinetobacter baumannii* com gerador de alta frequência (833 Hz). A- Controle, B- 30 segundos, C- 60 segundos e D- 180 segundos.

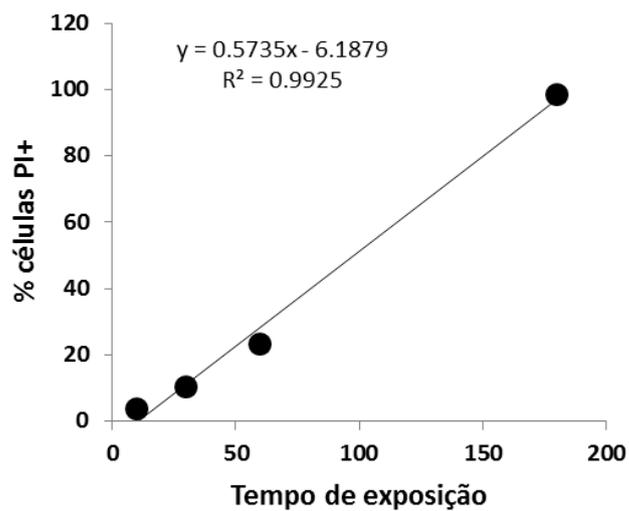


Figura 12- Redução de viabilidade de *Acinetobacter baumannii* em função do tempo de tratamento com pulsos de 833 Hz.

Conforme pode ser observado na Figura 11, o controle apresentou apenas 3,60% das células com permeabilidade de membrana alterada, aumentando para 10,33%, após 30s de tratamento, para 23,34% após 60s, atingindo 98,56% com 180s de exposição. Estes resultados mostram uma relação direta entre o tempo de exposição e a morte bacteriana, com $R= 0,9962$ (Figura 12).

Experimentos realizados com *S. aureus* mostraram aumento do número de células coradas com PI quando elas são tratadas com pulsos de alta frequência (Figura 13).

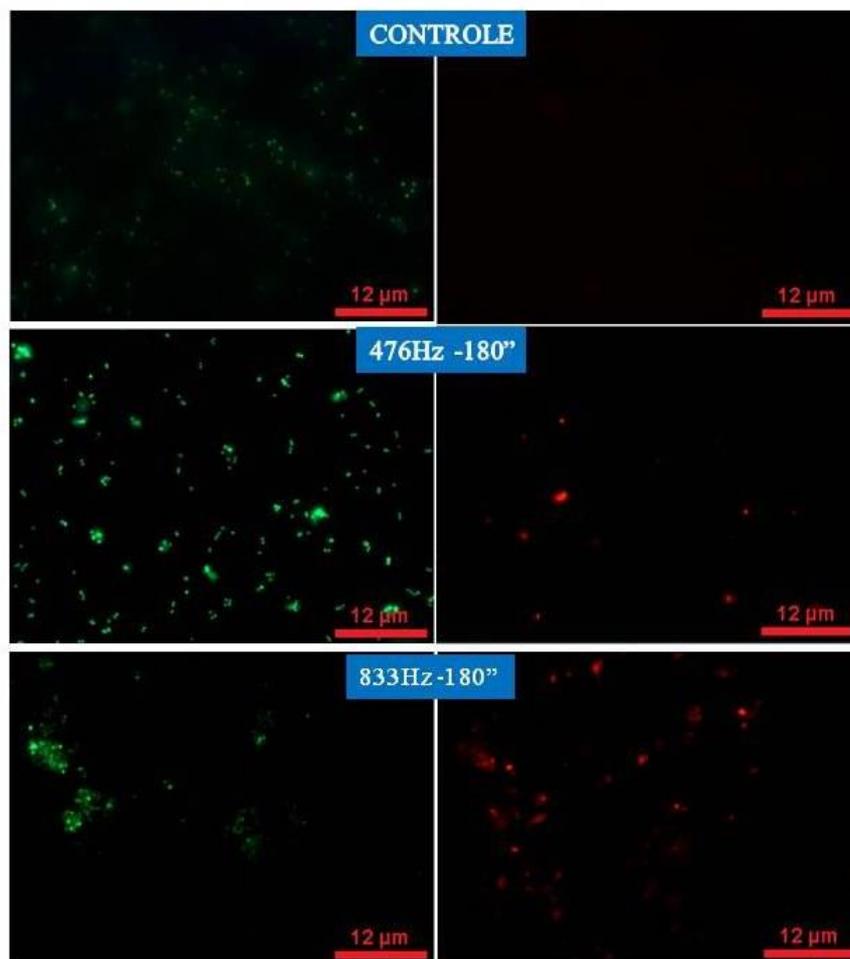


Figura 13- Análise de viabilidade celular por microscopia utilizando Syto9/PI em tratamentos de *Staphylococcus aureus* com gerador de alta frequência (476 Hz e 833Hz).

O número de células mortas ou com permeabilidade alterada de membrana (PI) foi maior em tratamentos com 833 Hz do que 476Hz, repetindo os resultados anteriores que indicaram halos maiores e maior redução no número de UFC quanto maior a frequência empregada.

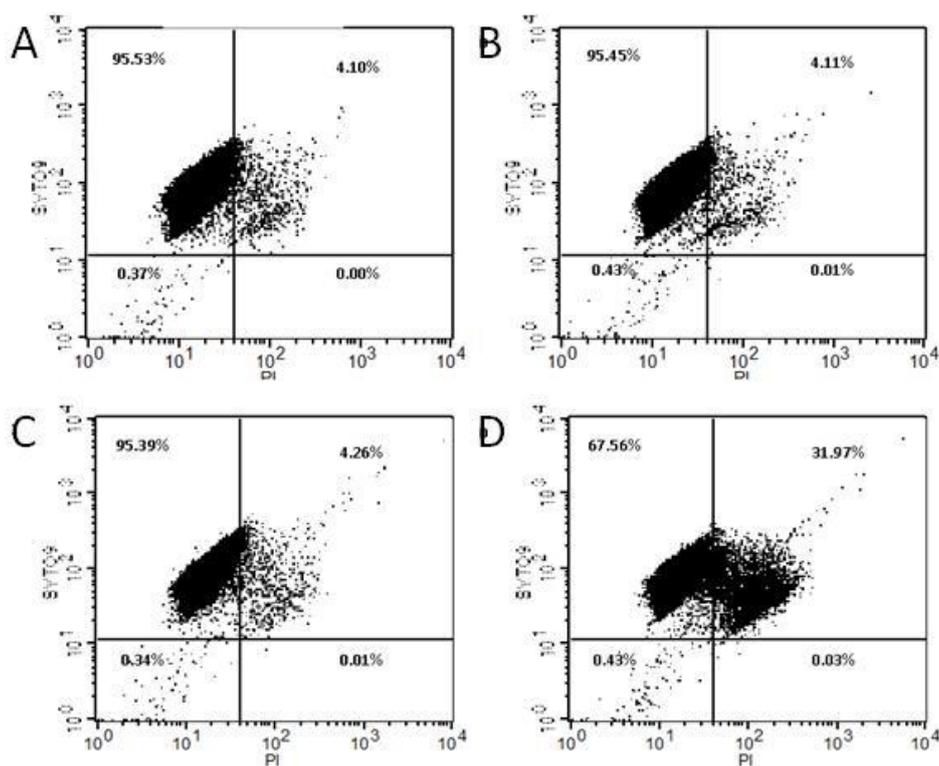


Figura 14- Análise de viabilidade celular Syto9/PI por citometria de fluxo (20000 eventos por amostra) em tratamentos de *Staphylococcus aureus* com gerador de alta frequência (833 Hz). A- Controle, B- 30 segundos, C- 60 segundos e D- 180 segundos.

A análise quantitativa por citometria de fluxo mostrou baixa redução da viabilidade de *S. aureus* em tratamentos realizados por 30 e 60 s e aumento expressivo (31,97%) de mortalidade com 180s (Figura 14). Porém, estes resultados não confirmam aqueles encontrados nos experimentos com avaliação de UFC, nos quais em 180s, atingiram redução de 85%. Além disso, os resultados não exibem linearidade entre

tempo e redução de viabilidade, conforme observado em experimentos com *A. baumannii*.

Thanomsub *et al.* (2002) utilizaram a análise por microscopia eletrônica após a aplicação do ozônio (Brightzone modelo OZ100) sobre *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureus* e *Bacillus subtilis* por até 120 min e mostraram que alterações na membrana foram dependentes do tempo de exposição.

Para avaliar a produção de radicais livres, *A. baumannii* foi exposto a 833Hz por 0 (zero), 60 (sessenta), 120 (cento e vinte) e 180 (cento e oitenta) segundos. Em seguida, foi utilizado o corante Diidroxirrodamina 123 (DHR123). Trata-se de uma molécula não fluorescente que, por oxidação, gera rodamina 123, molécula catiônica fluorescente (excitação 505nm e emissão 529nm) e lipofílica que, segundo Buxser *et al.* (1999), é capaz de detectar radicais livres (OH⁻, ONOO⁻, NO₂), sendo utilizada em diversos experimentos com bactérias (Gomes *et al.*, 2010).

Na Tabela 1 e na Figura 15 pode ser observado que os radicais livres aumentam com o tempo de exposição ao pulso de alta frequência (833Hz), enquanto a viabilidade celular decresceu. Conforme pode ser observado na Figura 15, o aumento da produção de rodamina é diretamente proporcional ao tempo de exposição (R=0.9479) e, por sua vez, altamente correlacionado com a redução de viabilidade celular (R=9817), indicando que a geração de radicais livres é possivelmente o mecanismo primário de ação do pulso de alta frequência sobre as células bacterianas.

Tabela 1 – Média da fluorescência (Rodamina 123) e viabilidade durante tratamento de *Acinetobacter baumannii* na frequência de 833Hz.

Tempo (segundos)	Fluorescência (U.A.)	Viabilidade (%)
	Média Geométrica	
0	1.74 ± 0.08 ^B	96.12 ± 3.4 ^A
60	2.13 ± 0.03 ^B	89.3 ± 2.6 ^B
120	2.37 ± 0.08 ^{AB}	75.5 ± 3.5 ^C
180	3.43 ± 0.19 ^A	0.7 ± 0.4 ^D

^{A,B,C,D} Médias seguidas por letras distintas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P≤0,05).

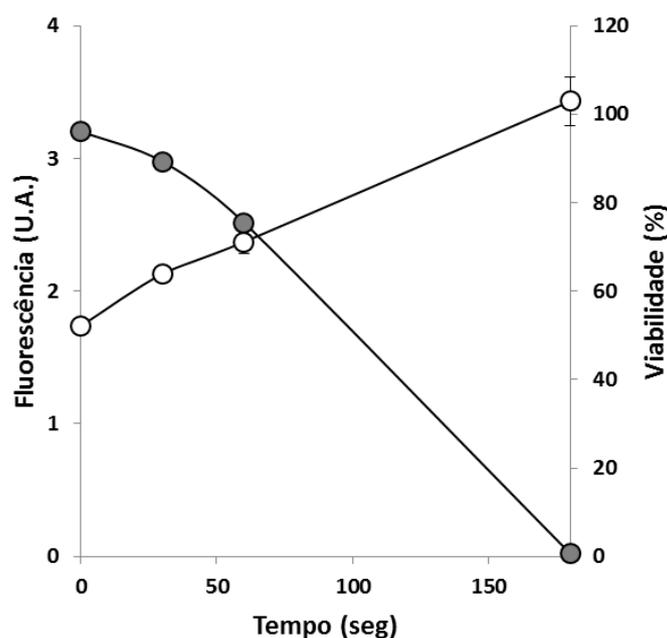


Figura 15- Evolução da relação de concentração de rodamina 123 (círculos brancos) e viabilidade celular em *Acinetobacter baumannii* submetida a pulso de 833Hz (círculos cinzas), em função do tempo de exposição.

Segundo Sarron *et al.* (2013), o primeiro mecanismo para a oxidação consiste na clivagem de enzimas e proteínas ou em peptídios mais curtos; depois, à oxidação de grupos sulfidrilo e aminoácidos. O segundo mecanismo envolve a ruptura da célula e vazamento do conteúdo celular, seguido da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, e a oxidação dos componentes celulares vitais, entre eles o DNA. Em bactérias Gram-negativas, a camadas de lipoproteína e de lipopolissacarídeos são os primeiros lugares a serem afetados, resultando em aumento da permeabilidade da célula e, eventualmente, levando-a à lise.

Estes resultados corroboram os de Coral *et al.* (2013) que aplicou ozônio sobre cianobactérias e afirmou que o ozônio apresentou ação dose dependente. Em estudo apenas com bactérias Gram-negativas, autores também afirmam a redução da população bacteriana proporcionalmente com o aumento do tempo de exposição ao ozônio (Dosti *et al.*, 2005). Para Ölmez & Akbas (2009), os efeitos do ozônio em relação à concentração (0,5-4,5 ppm) e tempo de exposição (0,5-3,5 min) sobre *Listeria monocytogenes* também são proporcionais para a redução microbiana.

A inativação por ozônio é um processo complexo que ataca a membrana celular e os componentes da parede e os componentes no interior da célula (por exemplo, enzimas e ácidos nucleicos). Tanto o ozônio molecular como os radicais livres produzidos pela sua repartição desempenham um papel nesse mecanismo de inativação, mas não há consenso sobre qual deles é mais decisivo. O microrganismo é morto por rompimento ou desintegração do envelope celular levando à fuga do conteúdo da célula. Por isso, a interrupção ou a lise é um mecanismo de desativação mais rápido do que a de outros desinfetantes que requerem que o agente desinfetante primeiro permeie a membrana celular, a fim de ser eficaz (Pascual *et al.*, 2007).

Ong & Ali (2015) analisaram o efeito do ozônio sobre a mitocôndria do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e observou a degradação das mitocôndrias após 24 horas de tratamento com ozônio (3,5 e 5,0 mL/L), utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Ong (2015) notou que, quanto maior a quantidade de ozônio aplicado, maior o dano mitocondrial, atingindo inativação praticamente completa em tratamentos com 5 ml/L de ozônio.

Assim, conclui-se que quanto maior a frequência e o tempo de aplicação, maior o efeito de ação bactericida. Recomenda-se a utilização de gerador de alta frequência como uma possível alternativa para o tratamento de feridas crônicas, devido à sua ação bactericida. No entanto, torna-se necessária a realização de um trabalho *in vivo* para verificar a resposta em um tecido biologicamente ativo, verificando a possibilidade de tratamento com o gerador de alta frequência.

5. Conclusão

Após a análise dos resultados conclui-se:

- O tempo e a frequência comportam-se de forma dependente, revelando que o gerador de alta frequência tem ação bactericida dose-dependente e tempo-dependente.
- A maior frequência testada (833Hz) com três minutos de aplicação, foi a que indicou maior ação bactericida.
- Os resultados diferem entre microrganismo Gram positivos, e Gram-negativos. Sendo que em Gram-negativos há uma maior ação bactericida.
- Sua utilização não causa aumento da temperatura local apenas no eletrodo de vidro.
- A utilização do gerador de alta frequência produz radicais livres. O aumento da produção de radicais livres está proporcionalmente associado ao aumento da exposição ao gerador de alta frequência e inversamente correlacionado com a redução de viabilidade.

6. Referências Bibliográficas

Bastacky, J., Lee, C. Y., Goerke, J., Koushafar, H., Yager, D., Kenaga L., Speed, T. P., Clements, J. A. (1995). Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. **Journal of Applied Physiology**, 79(5): 1615-1628.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2013). Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. **Food Control**, 29(1): 82-90.

Bocci, V. (2007). The case for oxygen-ozonotherapy. **British Journal of Biomedical Science**, 64(1): 44-49.

Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J., & Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD BacLightE: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **Journal of Microbiological Methods**. 37: 77-86.

Buxser, S. E., Sawada, G., & Raub, T. J. (1999). Analytical and numerical techniques for evaluation of free radical damage in cultured cells using imaging cytometry and fluorescent indicators. **Methods in Enzymology**. 300: 256-275.

Caloy, L. (2011). Necessidades da atuação da fisioterapia dermatofuncional em uma instituição de longa permanência de idosos. **Dissertação de mestrado**. Programa de

Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Cerqueira, G. M., & Peleg, A. Y. (2011). Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. **IUBMB life**. 63(12): 1055-1060.

Colsky, A. S., Kirsner, R. S., & Kerdel, F. A. (1998). Microbiologic evaluation of cutaneous wounds in hospitalized dermatology patients. **Ostomy Wound Management**. 44(3): 40-42.

Coral, L. A., Zamyadi, A., Barbeau, B., Bassetti, F. J., Lapolli, F. R., & Prévost, M. (2013). Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* by ozone: impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. **Water Research**. 47(9): 2983-2994.

Demling, R. H., & Waterhouse, B. (2007). The increasing problem of wound bacterial burden and infection in acute and chronic soft-tissue wounds caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Burns and Wounds**. 7(8): 86-98

Dosti, B., GUZEL-SEYDIM, Z. E. Y. N. E. P., & Greene, A. K. (2005). Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms. **International Journal of Dairy Technology**. 58(1): 19-24.

Doyle, J. S., Buising, K. L., Thursky, K. A., Worth, L. J., & Richards, M. J. (2011, April). Epidemiology of infections acquired in intensive care units. **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers. pp. 115-138.

Evangelista, D. G., Magalhães, E. R. M., Moretão, D. I. C., Stival, M. M., & Lima, L. R. (2012). Impacto das feridas crônicas na qualidade de vida de usuários da estratégia de saúde da família. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**. 2(2): 254-263.

Ferreira, M. C., Tuma Júnior, P., Carvalho, V. F., & Kamamoto, F. (2006). Complex wounds. **Revista do Hospital de Clinicas (USP)**. 61(6), 571-578.

Gao, S., Hemar, Y., Ashokkumar, M., Paturel, S., & Lewis, G. D. (2014). Inactivation of bacteria and yeast using high-frequency ultrasound treatment. **Water research**, 60: 93-104.

Gjødsbøl, K., Christensen, J. J., Karlsmark, T., Jørgensen, B., Klein, B. M., & Kroghfelt, K. A. (2006). Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. **International Wound Journal**. 3(3): 225-231.

Goldstein, E. J., Citron, D. M., & Nesbit, C. A. (1996). Diabetic foot infections: bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. **Diabetes Care**. 19(6): 638-641.

Gomes, F. S. L., Bastos, M. A. R., Matozinhos, F. P., Temponi, H. R., & Velásquez-Meléndez, G. (2010). Fatores associados à úlcera por pressão em pacientes internados nos Centros de Terapia Intensiva de Adultos. **Revista da Escola de Enfermagem (USP)**. 44(4): 1070-1076.

Guerra, O. L. G. A, Cruz; Cepero, Silvia Menéndez; Jordán, Maria E. Martínez; Vázquez, Teresita Clavera. (1997). Aplicación de la ozonoterapia en el tratamiento de la alveolitis. **Revista Cubana de Estomatología**. 34 (1): 21-24.

Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K., & Seydim, A. C. (2004). Use of ozone in the food industry. **LWT-Food Science and Technology**. 37(4): 453-460.

Hanberger, H., Erlandsson, M., Burman, L. G., Cars, O., Gill, H., Lindgren S., Nilsson, E. L., Iilsson-liljequis, B., Walther, S. (2004). High antibiotic susceptibility among bacterial pathogens in Swedish ICUs. Report from a nation-wide surveillance program using TA90 as a novel index of susceptibility. **Scandinavian journal of infectious diseases**. 36(1): 24-30.

Harding, K. G., Morris, H. L., & Patel, G. K. (2002). Healing chronic wounds. **British Medical Journal (BMJ)**. 324(7330): 160-163.

Higa, D. R., Cese, P. C., Falcão, R. M. M., Cese, A. C., Chang, M. R., Borges, F. S., & Madeira-Oliveira, J. T. (2007). Efeito do gerador de alta frequência sobre cultura de *Candida tropicalis*. **Revista de Especialização em Fisioterapia**. 1(1): 1-8.

Isaac, C., de Ladeira, P. R. S., do Rêgo, F. M. P., Aldunate, J. C. B., & Ferreira, M. C. (2012). Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**. 89(3/4): 125-131.

Karlowsky, J. A., Draghi, D. C., Jones, M. E., Thornsberry, C., Friedland, I. R., & Sahm, D. F. (2003). Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 47(5): 1681-1688.

Kazi, A., Hays, R., Buckley, J. (1996). Electrodes for corona chambers and electroconductive strms, cooling oxygen for forming ozone. **United States Patent**. US 5578280 A.

Kim, Jin-Gab., Yousef, Ahmed E., Khadre, Mohammed A. (2003). Ozone and its current and future application in the food industry. **Advances in food and nutrition research**. 45: 167-218.

Komanapalli, I. R., & Lau, B. H. S. (1998). Inactivation of bacteriophage k, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. **Applied microbiology and biotechnology**. 49(6): 766-769.

Loeb, M., Main, C., Walker-Dilks, C., & Eady, A. (2003). Antimicrobial drugs for treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. **Cochrane Database Systematic Review**. 4: 1-33

Machado, A. F. P., Hochman, B., Tacani, P. M., Liebano, R. E., & Ferreira, L. M. (2011). Medical devices registration by ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Revista do Hospital de Clinicas (USP)**. 66(6): 1095-1096.

Martins, A., da Silva, J. T., Graciola, L., Fréz, A. R., Ruaro, J. A., & Marquetti, M. D. G. K. (2012). Efeito bactericida do gerador de alta frequência na cultura de *Staphylococcus aureus*. **Fisioterapia e Pesquisa**. 19(2): 153-157.

Mandelbaum, S. H., Di Santis, É. P., & Mandelbaum, M. H. S. A. (2003). Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. **An Bras Dermatol**. 78(4): 393-410.

Montefour, K., Frieden, J., Hurst, S., Helmich, C., Headley, D., Martin, M., & Boyle, D. A. (2008). *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant pathogen in critical care. **Critical Care Nurse**. 28(1): 15-25.

Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T., & Terashita, M. (2004). Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. **Journal of Endodontics**. 30(11): 778-781.

Nettina, S. M. (2007). **Manual de prática de enfermagem**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Nixon, J., Cranny, G., & Bond, S. (2005). Pathology, diagnosis, and classification of pressure ulcers: comparing clinical and imaging techniques. **Wound Repair and Regeneration**. 13(4): 365-372.

Ohkawa, H., & Akitsu, T. (2014). Material Conformity and Bactericidal Characteristics of High-Density Ozone Disinfection in Vinyl Polysiloxane Impression and PMMA Dentistry Fillings. **Engineering**. 6: 319-328.

Ölmez, H., & Akbas, M. Y. (2009). Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce. **Journal of Food Engineering**. 90(4): 487-494.

Ong, M. K., & Ali, A. (2015). Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**. 100: 113-119.

Pascual, A., Llorca, I., & Canut, A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. **Trends in Food Science & Technology**. 18: S29-S35.

Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B., & Palnikar, P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 61(9): 3471-3475.

Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 52(5): 750-763.

Sá, H. P., et al., (2010) Estudo comparativo da ação do laser GaAlInP e do gerador de alta frequência no tratamento de feridas cutâneas em ratos: estudo experimental. **ConScientiae Saúde**, 9(3), 360-366.

Sampaio, S. A., & Rivitti, E. A. (2001). **Dermatologia**. Artes Médicas. 2ª edição. São Paulo.

Sarron, E., Cochet, N., & Gadonna-Widehem, P. (2013). Effects of aqueous ozone on *Pseudomonas syringae* viability and ice nucleating activity. **Process Biochemistry**. 48(7): 1004-1009.

Sebeny, P. J., Riddle, M. S., & Petersen, K. (2008). *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. **Clinical Infectious Diseases**. 47(4): 444-449.

Stübinger, S., Sader, R., & Filippi, A. (2006). The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. **Quintessence International**. 37(5): 353-359.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2012). **Microbiologia**. Artmed. 6ª edição. Porto Alegre.

Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R., & Srisukonth, C. (2002). Effects of ozone treatment on cell growth and

ultrastructural changes in bacteria. **The Journal of General and Applied Microbiology**. 48(4): 193-199.

Tordiglione, P., Morselli, F. A., Scarpa, I., Puggioni, G., Mancini, C., Rosa, G., & Giordano, A. (2014). In Vitro Evaluation of Ozone Activity on Recent Clinically Isolated Bacterial Strains. **Advances in Microbiology**. 4 (2): 106-115.

Valencia, I. C., Kirsner, R. S., & Kerdel, F. A. (2004). Microbiologic evaluation of skin wounds: alarming trend toward antibiotic resistance in an inpatient dermatology service during a 10-year period. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 50(6): 845-849.

Wollina, U., Heinig, B., & Kloth, L. (2012). **Measurements in Wound Healing: The Use of Biophysical Technologies in Chronic Wound Management**. 1ed. Springer London. Capítulo 16: 313-354.