



**INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS - IFSC  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP**

**Relatório técnico**

**TESTES MICROBIOLÓGICOS REALIZADOS EM CÂMARA DE OZÔNIO  
ASSOCIADO A TEMPERATURA PARA AVALIAR AÇÃO ANTIMICROBIANA EM  
COLCHÕES HOSPITALARES**

**Sumário**

1. Introdução
2. Considerações gerais do ozônio
3. Descrição dos ensaios microbiológicos
4. Resultados
5. Considerações gerais
6. Conclusão

**Julho/2024**

## 1. Introdução

Este relatório técnico tem como função descrever os ensaios microbiológicos realizados com a câmara de ozônio associado à temperatura, bem como apresentar os resultados e algumas considerações sobre os resultados. Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia, que faz parte do Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC/USP).

## 2. Considerações gerais do ozônio

O ozônio, molécula reativa de oxigênio ( $O_3$ ), é conhecido como um dos mais rápidos e eficazes agentes microbicidas tanto para bactérias, fungos, quanto para vírus. Sua ação oxidativa destrói principalmente lipídios, proteínas, aminoácidos, sendo também bastante agressivo para o material genético. Nos vírus, o ozônio age oxidando a camada proteica (envelope do vírus), modificando sua estrutura e destruindo completamente sua funcionalidade. Bactérias e fungos também não resistem ao ozônio.

Um grande problema relacionado ao ozônio é sua manipulação, pois ele também é capaz de oxidar os brônquios se respirarmos ozônio em alta concentração. O seu uso adequado é feito quando está confinado no interior de uma câmara, e a grande vantagem é que o ozônio, depois de 30 minutos, vira oxigênio, e, portanto, é também amigável ao meio ambiente.

Nesta etapa do projeto, foram realizados testes microbiológicos com a câmara de ozônio desenvolvida pela empresa Ecostove em parceria com o Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC/USP). Esta câmara possui sistema de exaustão de ar e ozônio, é hermeticamente fechada dando adequada proteção de uso. Também possui sistema de aquecimento que permite a temperatura interna da câmara chegar a 150 °C. Seu sistema é totalmente automatizado, facilitando o seu uso. Nesta configuração, com ozônio e temperatura, foram realizados os ensaios microbiológicos no colchão hospitalar.



### 3. Descrição dos ensaios microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados com o objetivo de verificar a ação da câmara de ozônio com temperatura na desinfecção de colchão hospitalar previamente contaminado com a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os ensaios foram conduzidos em colchão hospitalar adulto com densidade D23 – 23 kg/cm<sup>3</sup> e medidas de 188 x 78 x 10 cm, composto de poliuretano, coberto com capa em napa hospitalar.

Para os ensaios, o inóculo bacteriano foi preparado a partir da bactéria *S. aureus* recuperada em placas de Petri contendo meio Brain Heart Infusion (BHI) Agar. No preparo, 7 a 8 colônias da bactéria foram transferidas para 10 mL de meio líquido BHI com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada e descartável. O inóculo permaneceu por 18 horas em estufa de crescimento a 37 °C. Após o período de crescimento, o inóculo foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos e o meio de cultura foi descartado.

O pellet contendo a bactéria foi resuspendido em 10 mL de solução salina tamponada Phosphate Buffered Saline (PBS). Ao final, foram preparados inóculos bacterianos nas concentrações de 10<sup>8</sup> e 10<sup>4</sup> unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), dependendo do teste realizado.

Inicialmente, foram realizados testes com o objetivo de avaliar se a descontaminação por temperatura (sem ozônio) ocorria de forma homogênea em três pontos distintos da câmara. Para isso, placas de Petri contendo meio BHI Agar foram contaminadas com 100 µL do inóculo bacteriano a 10<sup>8</sup> células/mL e, então, foram inseridas em três alturas distintas no interior da câmara: inferior, médio e superior.

Para realização do grupo controle, no qual as amostras não foram tratadas, placas de petri contaminadas foram posicionadas nestas três alturas e permaneceram no interior da câmara por 60 min, com os sistemas de temperatura e ozônio desligados. Ao término, as placas foram retiradas da câmara e, então, três novas placas contaminadas foram posicionadas nos mesmos locais. Em seguida, as amostras permaneceram por 60 min a 70 °C. Ao final do processo, as placas de Petri de todos os grupos foram incubadas a 37 °C e, após 24 horas, a contagem das UFC/mL foi realizada, figura 1.



Figura 1. Testes realizados em diferentes alturas dentro da câmara.

Em seguida, foram realizados testes para verificar a efetividade da câmara na descontaminação do colchão em si, tanto da capa de napa quanto da espuma, utilizando diferentes temperaturas e tempos de tratamento. Para contaminação da capa de napa, swabs esterilizados foram umedecidos no inóculo bacteriano a  $10^8$  células/mL e passados por cinco regiões delimitadas distintas na superfície do colchão. Para a coleta do grupo controle, no qual o colchão não passou por tratamento, após 60 minutos de espera, swabs esterilizados foram passados nestas regiões contaminadas. Após esse procedimento, cinco novas regiões na superfície da capa foram contaminadas com o inóculo bacteriano utilizando swabs esterilizados. Em seguida, foi realizado o tratamento com ozônio e temperatura (70 °C) por 60 min, figura 2.



Figura 2. Testes realizados na superfície da capa e na superfície da espuma





Para os testes realizados na espuma do colchão as amostras foram contaminadas com o inóculo bacteriano na concentração de  $10^4$  células/mL. Vale ressaltar que os testes na espuma foram realizados de duas formas: contaminação da superfície e de um volume da espuma. Para contaminação da superfície da espuma, um swab esterilizado foi umedecido no inóculo bacteriano a  $10^4$  células/mL e passado na superfície da espuma. Para a contaminação de um volume de espuma, uma amostra de 5 x 3 x 3 cm de espuma foi umedecida no inóculo bacteriano a  $10^4$  células/mL. Após a contaminação da superfície e da amostra de espuma, a capa de napa foi reposicionada e, então, foi realizado o tratamento com ozônio e temperatura em diferentes tempos e temperaturas, dependendo do grupo avaliado, sendo observado, na figura 3, esse procedimento.

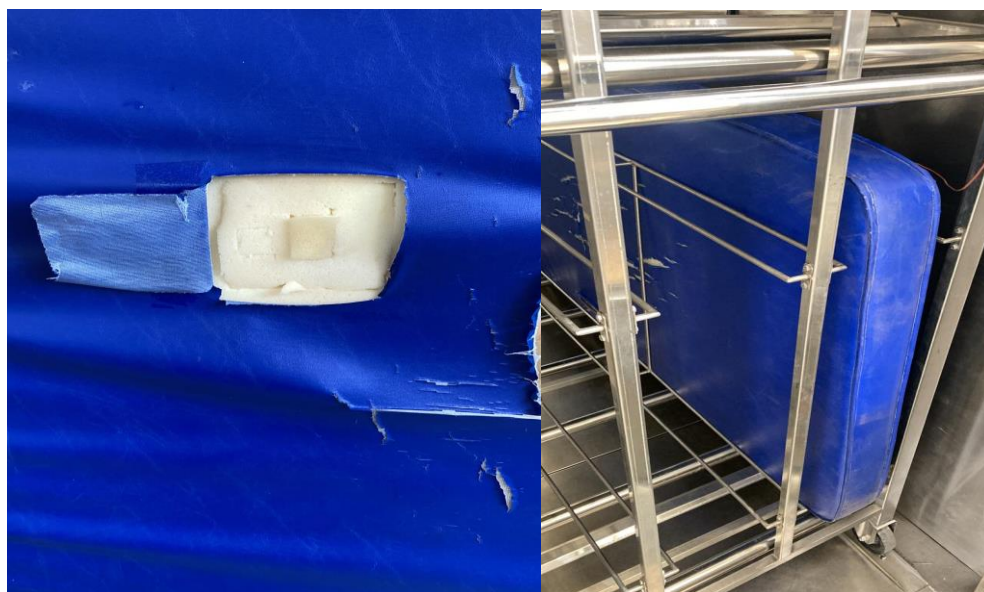


Figura 3. Teste realizado em amostra.

Grupos avaliados:

<b>Espuma</b>	<b>Capa (napa)</b>
Controle Superfície	
Tratamento Superfície (90 °C + O <sub>3</sub> por 90 minutos)	
Controle volume	Controle
Tratamento volume (70 °C + O <sub>3</sub> por 60 minutos)	Tratamento a 70 °C por 60 minutos
Tratamento volume (90 °C + O <sub>3</sub> por 90 minutos)	



Ao finalizar o processo no interior da câmara de ozônio com temperatura, o colchão foi retirado da câmara para realização das coletas dos grupos tratados. Assim, com novos swabs esterilizados, amostras foram colhidas de cada região delimitada, tanto da capa quanto da superfície da espuma do colchão. Cada swab de amostra coletada foi transferido para um eppendorf contendo 1 mL de PBS. Essas amostras foram homogeneizadas em agitador automático durante 60 segundos e, logo após, 100 µL de cada amostra foram semeados na superfície de placas de Petri contendo meio de cultura BHI Agar e o método utilizado para o espalhamento foi o spread-plate, que consiste em espalhar a suspensão bacteriana com o auxílio de uma alça de Drigalski para obtenção de colônias isoladas após as diluições. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C e, após 24 horas, a contagem das UFC/mL foi realizada.

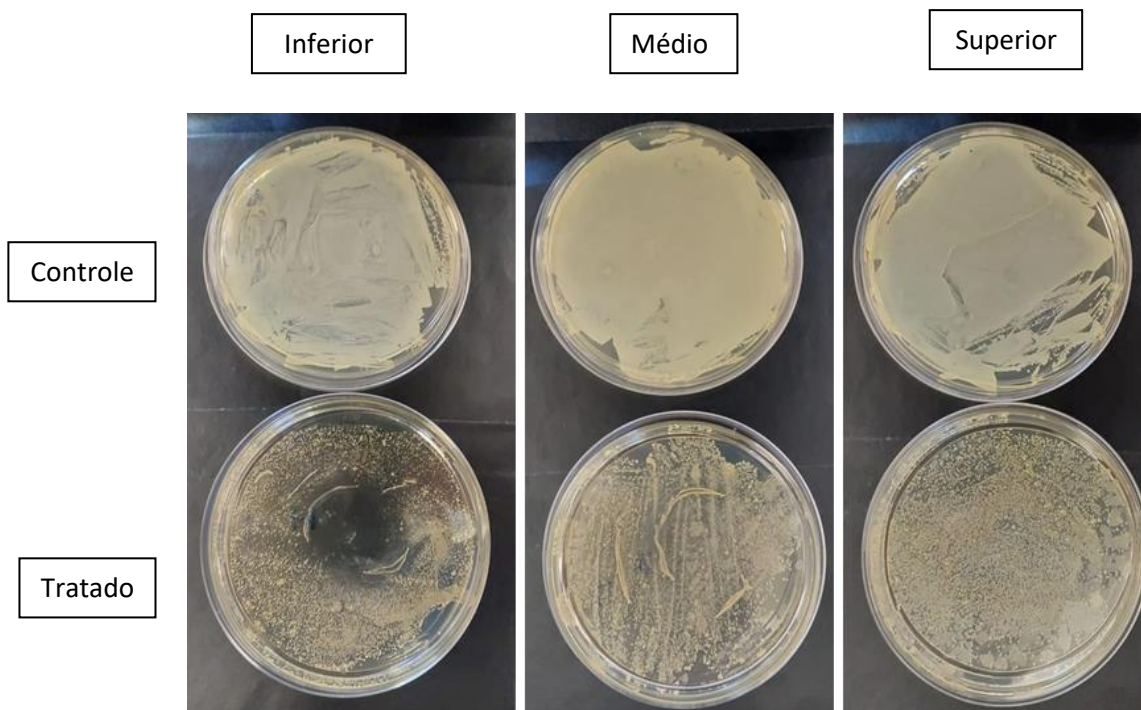
Já a amostra em volume da espuma, foi retirada por completo e transferida para um tubo contendo 20 mL de PBS. Em seguida, da mesma forma que anteriormente citado, os tubos foram homogeneizados em agitador automático durante 60 segundos e, logo após, 100 µL de cada amostra foram semeados na superfície de placas de Petri contendo meio de cultura BHI Agar e o método utilizado para o espalhamento foi o spread-plate, que consiste em espalhar a suspensão bacteriana com o auxílio de uma alça de Drigalski para obtenção de colônias isoladas após as diluições. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C e, após 24 horas, a contagem das UFC/mL foi realizada.

Cálculo das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{média do n}^\circ \text{ de UFC} \times 10^{\text{diluição}}}{\text{volume do plaquesamento}}$$

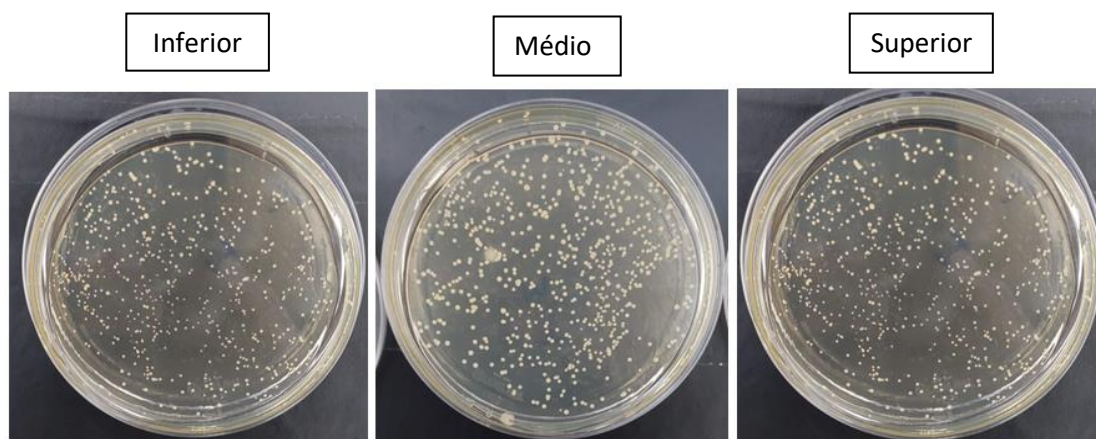
#### 4. Resultados

Inicialmente, foram realizados testes para avaliar a homogeneidade da descontaminação dentro da câmara. Nestes testes, placas de petri contaminadas com a bactéria foram inseridas em 3 alturas distintas (terço superior, médio, inferior) na câmara e foi avaliado o tratamento por temperatura a 70 °C por 60 min. A seguir, estão apresentados os resultados obtidos nas placas do grupo controle e tratamento.



**Figura 4.** Primeiro teste realizado para avaliar a homogeneidade da descontaminação por temperatura (70 °C, 60 min), em três alturas distintas (terços inferior, médio e superior) da câmara, tanto do grupo controle (não tratado), quanto do grupo tratado.

Como pode ser observado na Figura 4, a descontaminação não ocorreu de forma homogênea, havendo maior inativação no terço inferior. Desta forma, associamos ozônio com temperatura e, então, o mesmo teste foi realizado e o resultado encontra-se a seguir (Figura 5).



**Figura 5.** Segundo teste realizado para avaliar a homogeneidade da descontaminação por temperatura (70 °C, 60 min) após realizar os ajustes na câmara. As placas de petri representam as três alturas distintas (terços inferior, médio e superior) da câmara, do grupo tratado.



De acordo com a imagem acima (Figura 5), a descontaminação no interior da câmara, por meio da temperatura, ocorreu de forma homogênea nas três alturas avaliadas. Desta forma, prosseguiu-se com o teste no colchão em si, avaliando a temperatura, ozônio e tempo de exposição.

A Tabela 1 mostra os valores da média, em Log (UFC/mL), de bactérias *S. aureus* recuperadas das amostras de cada região delimitada na capa, na superfície da espuma e em um volume de espuma, nas condições controle e tratamentos, com seus respectivos desvios padrão. Além disso, são mostrados os valores, em Log (UFC/mL), da redução bacteriana obtida nos grupos tratados.

**Tabela 1.** Grupos avaliados e valores da média do Log (UFC/mL) de *S. aureus* recuperadas das amostras de cada material, com seus respectivos desvios padrão e reduções obtidas.

Grupo	Média Log (UFC/mL)	Redução Log (UFC/mL)
Capa - controle	8,10 ± 0,1	-
Capa - Terço inferior (70 °C + O <sub>3</sub> , 60 min)	2,52 ± 0,2	5,58
Capa – Terço médio (70 °C + O <sub>3</sub> , 60 min)	2,46 ± 0,2	5,64
Capa – Terço superior (70 °C + O <sub>3</sub> , 60 min)	2,93 ± 0,2	5,17
Capa – lateral maior (70 °C + O <sub>3</sub> , 60 min)	2,91 ± 0,1	5,19
Capa - lateral menor (70 °C + O <sub>3</sub> , 60 min)	2,94 ± 0,2	5,16
Espuma – superfície (controle)	4,20 ± 0,2	-
Espuma – superfície (90 °C + O <sub>3</sub> , 90 min)	2,59 ± 0,2	1,61
Espuma – volume (controle)	4,42 ± 0,1	-
Espuma – volume (70 °C + O <sub>3</sub> , 60 min)	3,99 ± 0,2	0,43
Espuma – volume (90 °C + O <sub>3</sub> , 90 min)	2,68 ± 0,3	1,74

De acordo com a Tabela 1, é possível afirmar que para a **capa** do colchão, o tratamento com 70 °C + O<sub>3</sub> por 60 min reduziu aproximadamente 5 log, independente da região do colchão avaliada, o que equivale a **99,999% de redução**. Com relação aos testes realizados na **superfície da espuma** do colchão, o tratamento com 90 °C + O<sub>3</sub> por 90 min foi capaz de reduzir 1,61 log da bactéria, o que equivale a **mais de 90% de redução**. Por fim, quando um **volume de espuma** foi tratado com 70 °C + O<sub>3</sub> por 60 min, foi observada uma redução de apenas 0,43 log, o equivalente a 71% de redução. Para aumentar a efetividade do tratamento, foi avaliada uma maior temperatura (90 °C) por

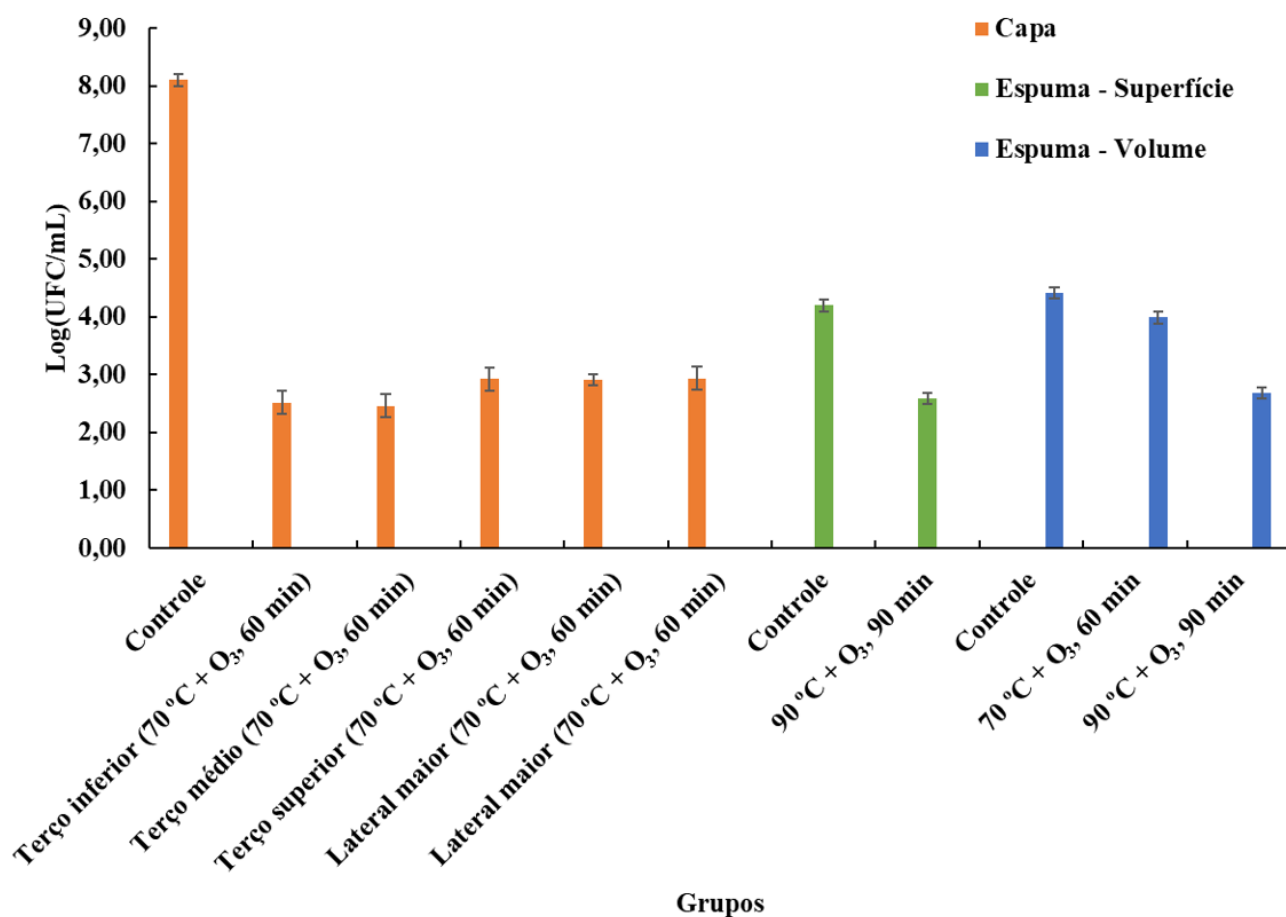




um tempo maior de exposição (90 min) na presença do ozônio. Nesta condição (90 °C + O<sub>3</sub>, 90 min), foi então obtida uma redução de 1,74 log, o equivalente a **mais de 90% de redução**.

Esses resultados de redução da bactéria *S. aureus* na **capa** do colchão mostram diminuições em torno de 5 log, reduções estas superiores aos procedimentos convencionais de desinfecção realizados em hospitais, atualmente.

Para melhor visualização dos resultados obtidos, os mesmos foram organizados em gráfico, como mostra a Figura 5 abaixo.



**Figura 5.** Gráfico do Log (UFC/mL) de bactérias *S. aureus* recuperadas das amostras avaliadas na espuma e na capa do colchão hospitalar na condição controle e nas condições de tratamento com temperatura e ozônio em diferentes tempos. As barras representam a média (em log) com seus respectivos desvios padrão.



## 5. Considerações gerais

### *Índice de redução microbiológica e associação de técnicas*

Em microbiologia, a redução de três ordens logarítmicas (3 log ou 99,9%) é comumente aceitável quando se trata de certificações de métodos utilizados para eliminar microrganismos. Normalmente, novas técnicas de descontaminação são associadas à limpeza das superfícies a serem descontaminadas por soluções germicidas como álcool etílico a 70% ou soluções com base de cloro, ou técnicas de esterilização adicionais como a associação ao gás ozônio e radiação por luz ultravioleta, que por si só apresentam efeito germicida. Esta prática aumenta consideravelmente o sucesso na descontaminação, podendo reduzir o tempo necessário para uma descontaminação aceitável. Em casos de práticas associadas, o efeito de redução de 3 ordens logarítmicas para aplicação de gás ozônio pode ser considerado satisfatório, desde que outras técnicas de alto potencial descontaminante sejam utilizadas em associação.

## 6. Conclusão

Os resultados apresentados neste relatório confirmam a ação da câmara de ozônio com temperatura na redução microbiana de colchão hospitalar nas condições avaliadas. Essa redução foi expressiva, com alcance em torno de 5 log na capa do colchão, representando cerca de 99,999% de redução microbiana. Para obter bons resultados na espuma, maior tempo de exposição e temperatura foram necessários. Na espuma interna (tanto em superfície quanto em volume) foram obtidas reduções bacterianas de mais de 1 log, representando mais de 90% de redução microbiana. Portanto, esse tratamento (temperatura + ozônio) mostrou-se efetivo na redução de bactérias da superfície da capa do colchão e da espuma, podendo ser utilizado como ferramenta adicional aos métodos padrões de limpeza e desinfecção de colchões hospitalares.

Dra. Fernanda Alves Dias de Sousa  
Cirurgiã-dentista, Mestre e Doutora em Reabilitação Oral  
Área de atuação: Microbiologia  
CEPOF – IFSC/USP



**IFSC UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO**  
Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador são-carlense, 400 / 13566-590  
Caixa Postal 369 / 13560-970  
São Carlos - SP, Brasil  
Fone: +55 16 3373-9823  
[www.ifsc.usp.br](http://www.ifsc.usp.br) - <http://cepof.ifsc.usp.br/>

---

Eng. Daniel José Chianfrone  
Engenheiro Eletrônico  
CEPOF – IFSC/USP

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato  
Físico e Engenheiro de Materiais  
Doutor em Física  
CEPOF – IFSC/USP