UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO OESTE

MARIO EDUARDO BALDO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL EM LESÕES PROVOCADAS POR QUEIMADURAS EM RATOS

Campo Grande
2024

MARIO EDUARDO BALDO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL EM LESÕES PROVOCADAS POR QUEIMADURAS EM RATOS

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em saúde e desenvolvimento na região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em saúde e desenvolvimento na região Centro-Oeste
Linha de pesquisa: Tecnologia em Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Elenir Rose Jardim Cury
Coorientador: Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho.

Campo Grande
2024

MARIO EDUARDO BALDO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL EM LESÕES PROVOCADAS POR QUEIMADURAS EM RATOS

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em saúde e desenvolvimento na região Centro-Oeste da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em saúde e desenvolvimento na região Centro-Oeste Linha de pesquisa: Tecnologia em Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Elenir Rose Jardim Cury.

Banca de Defesa **Nota / conceito**

_____ _____

Profa. Dra. Elenir Rose Jardim Cury - FAMED UFMS

_____ _____

Profa. Dra. Alexandra Maria A. Carvalho- FAMED UFMS

_____ _____

Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira – FAODO UFMS

_____ _____

Profa. Dra. Ellen Gaetti Jardim – FAODO UFMS

_____ _____

Prof. Dr. Júlio Cézar Leite

Avaliação Final: ( ) Aprovado ( ) Reprovado

Dedico este trabalho ao meu pai Mario Baldo (o original), pois foi ele quem me disse que o conhecimento acumulado não serve de nada, se não pode ser posto em prática a serviço de nossos semelhantes.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos aos meus parentes e à minha família, meu pai Prof. Mário Baldo, minha mãe Profa. Silvia Marcia e minha Irmã Fernanda, estas pessoas, sob os olhos de Deus, são as rochas sob as quais construí os alicerces do meu caminho.

Agradeço imensamente minha esposa Maísa pela compreensão, apoio incondicional e paciência. Um dia ainda vou descobrir como um coração tão grande cabe numa pessoa tão delicada.

Meus agradecimentos para meus orientadores Profa. Dra. Elenir Rose Jardim Cury e Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho pela disponibilidade para ensinar, acessibilidade e pelo bom humor mesmo nos momentos de crise. Agradeço a paciência e espero ter minimamente correspondido às expectativas de ambos. Dentro da instituição UFMS pude contar com o apoio da Veterinária Maria Paula Fialho, responsável do biotério, designada para monitorar meu experimento, também pude contar com o departamento de Estomatologia da FAODO na Pessoa do professor Gleyson K. do Amaral Silva aos quais estendo aqui também minha gratidão pelo caráter impecável e sobretudo pela boa fé dos mesmos.

Ainda na UFMS agradeço aos Professores Paulo Zárate Pereira, Rosana Mara Giordano de Barros e Ellen C. Gaetti Jardim uns por semearem o meu interesse pela ciência e outros por não deixarem que este esmorecesse.

Agradeço aos membros e participantes de Serviço de Odontologia Hospitalar da Santa Casa de Campo Grande na pessoa da Dra. Regina Maria Raffaele, grande parte dessa caminhada só foi possível graças a vocês.

Estendo meus agradecimentos a Coordenadoria da Rede de Urgência do município de Campo Grande (CUR/SESAU 2023/2024 – PrefCG), por permitirem que eu participe da nobre e hercúlea tarefa de zelar pelo atendimento de urgência desta capital, os senhores são detentores do meu respeito e admiração.

Finalmente sob o risco de não fazer justiça a todos os que me auxiliaram nesta jornada, meus apoiadores, colegas e amigos estendo meu cumprimentos a todos aqueles que ajudaram, acolheram, socorreram e pouparam a mim durante todos estes anos, desejo do fundo de meu coração que o bom Deus cubra-os com suas bênçãos e lhes garanta um vida de plenitude e realizações.

“Sic Parvis magna...”

Sir Francis Drake

RESUMO:

Este projeto avaliou a viabilidade dos compostos oleicos ozonizados em aplicação tópica direta como proposta de tratamento de lesões por queimadura, mediante a comparação com propostas terapêuticas convencionais. Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar *(Rattus norvegicus)* selecionados aleatoriamente de maneira a compor 3 grupos distintos de 12 ratos nos quais foram induzidas 2 lesões por queimadura de 1cm de diâmetro no dorso dos mesmos onde cada elemento recebeu conduta terapêutica pré-estabelecida, desta forma o grupo1 (G1) ou controle recebeu curativo com cobertura primária sulfadiazina de prata 1%, o grupo 2 (G2) ou Ozônio + recebeu cobertura primária sulfadiazina de prata 1% e aplicação de óleo de girassol ozonizado localmente em toda a extensão do ferimento, o Grupo 3 – Ozônio recebeu curativo com aplicação de óleo ozonizado localmente em toda a extensão do ferimento de maneira a recobrir o mesmo, todas as condutas foram repedidas a cada 24 horas pelos pesquisadores. Os animais componentes do estudo foram submetidos a eutanásia no 4º,8º e 12º dias onde foram colhidas amostras de pele contendo a lesão e parte de tecido saudável adjacente, durante a avaliação macroscópica observou-se que não ouve variação significativa entre os animais avaliados quanto ao potencial de retração e fechamento da ferida. Durante a avaliação microscópica pode-se observar maior neoformação vascular nos grupos tratados com óleo ozonizado, também pode-se observar uma maior deposição de fibras colágenas nos animais tratados com esta substância.

Descritores: ozônio; queimadura; cicatrização; pele; terapia alternativa.

ABSTRACT:

This project evaluated the viability of ozonized oleic compounds in direct topical application as a proposal for the treatment of burn injuries, by comparing them with conventional therapeutic proposals. 36 Wistar rats (Rattus norvegicus) were randomly selected to make up 3 distinct groups of 12 individuals, in which 2 burn injuries of 1cm in diameter were induced on the back of each one, where each rat received a pre-established therapeutic approach, thus group 1 (G1) or control received a dressing with primary coverage of 1% silver sulfadiazine, Group 2 (G2) or Ozone + received primary coverage with 1% silver sulfadiazine and local application of ozonized sunflower oil over the entire length of the wound, Group 3 - Ozone received a dressing with local application of ozonized oil over the entire length of the wound in order to cover it, all the procedures were repeated every 24 hours by the researchers. The animals in the study were euthanized on the 4th, 8th and 12th days and skin samples were taken from the lesion and part of the adjacent healthy tissue. During the macroscopic evaluation, it was observed that there was no significant variation between the animals evaluated in terms of the potential for retraction and wound closure. During the microscopic evaluation, greater vascular neoformation was observed in the groups treated with ozonated oil, and a greater deposition of collagen fibers was also observed in rats treated with this substance.

Keywords: ozone; burn; healing; skin; alternative therapy.

Lista de abreviações e siglas

ATP	Adenosina trifosfato
ECR	Ensaios Clínicos Randomizados
EPA	Ácidos eicosapentaenoico
ERO	Espécimes Reativas ao Oxigênio
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
DHA	Ácido docosaexaenoico
FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos
IGF1R	Fator de crescimento 1 semelhante à insulina
IL1β	Interleucina Beta
IL-4 e IL-31	Interleucinas
LOP	Lipooligopeptídeos
mPas	Milipascal por segundo
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
SIRS	Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica
OMS	Organização Mundial da Saúde
O_3	Ozônio
Th2	Transcritos lesionais das citocinas
TM	Tricrômico de Masson
TNF-α	Fator de Crescimento Tumoral Alfa
VEGFR	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de tabelas e figuras

Figura1- Modelo virtual esquemático contendo as regiões distintas de uma lesão por queimadura na pele. Pág.17

Figura 2- Modelo tridimensional de uma molécula de ozônio, composta por três átomos de oxigênio unidos por ligações covalentes, sua fórmula química é representada pelo termo O_3. Pág.20

Figura 3- Fluxograma do desenho estrutural e desenvolvimento das etapas do ensaio clínico contendo as subdivisões em grupo e respectivos intervalos de eutanásia para coleta de dados. Pág.34

Figura 4- Alocação o das caixas divididas e ambientadas contendo os animais avaliados durante o estudo **A**. Disposição e armazenamento em ambiente laboratorial **B**. Conferencia diária das condições de alimentação, hidratação e higiene durante o curso da etapa clínica **C**. Pág.35

Figura 5- Aplicação de analgésico previamente a indução de queimadura **A**. Indução e de lesão epitelial por queimadura com instrumento confeccionado para esta finalidade **B**. Rato ainda sob sedação imediatamente após a realização das queimaduras **C**. Pág.37

Figura 6- Modelo de utilização do Software ImageJ para determinação da correlação entre tamanho e pixels com escala definida em centímetros **A.** Onde a mensuração da ferida foi feita através da ferramenta “desenhar losango” **B.** Pág.38

Figura 7- Modelo de utilização do Software ImageJ para mensuração das áreas de acantose (A) e a formação de crosta (B) imagens obtidas em aumento de 40µm (correlação entre tamanho e pixels com escala definida em micrômetros). Pág.40

Figura 8- Modelo de utilização do Software ImageJ para a morfometria das fibras colágenas onde observa-se a segmentação (A); A imagem inicial de uma lâmina histológica corada com TM (B); Imagem binária final em 8 bits (C). Pág.41

Tabela 1: Diferença entre peso inicial e final (média +/- desvio padrão DP) dos ratos do experimento considerada a divisão em grupos e de acordo com a progressão deste nos intervalos de eutanásia correspondentes ao 4º,8º e 12º dias. Pág.44

Tabela 2: Diferença entre o tamanho inicial e final da lesão em cm (média ± desvio padrão/DP) dos ratos segundo lado do corpo, grupos do experimento e tempo em dias. Pág.45

Figura 9- Evolução gráfica do percentual de e retração das lesões de queimadura nos grupos do experimento considerando intervalos de tempo de 4,8 e 12 dias Pág.46

Figura 10: Avaliação do processo macroscópico de reparação tecidual onde a primeira fileira corresponde a eutanásia do 4º dia com amostras separadas por grupos (G1, G2 e G3 da esquerda par a direita) sendo a segunda e a terceira fileiras correspondendo ao 8º e 12º dia respectivamente. Pág.47

Tabela 3: Avaliação microscópica dos componentes histológicos (média ± desvio padrão/DP) dos ratos segundo grupos do experimento e tempo em dias. Pág.48

Figura 11- Média ± desvio padrão da quantidade de vasos sanguíneos na neoformação vascular segundo os grupos do experimento e tempo em dias. Pág.50

Figura 12- Fotomicrografias (40 µm) de secção da lesão de pele dos grupos G1 (A), G2 (B e C) e G3 (D), respectivamente, ao 12º dia após a indução de queimadura mostrando a neoformação vascular (setas). Onde (A) manifesta neoformação discreta, (B), C) e (D) neovascularização acentuada HE. Pág.48

Figura 13- Média ± desvio padrão dos valores obtidos na quantificação das fibras colágenas obtidas via morfometria considerando os grupos do experimento e os respectivos intervalos de tempo Pág.51

Figura 14- Fotomicrografias (40 µm) de secção da lesão de pele dos grupos G1, G2 e G3 respectivamente, ao 12º dia após a indução de queimadura submetidas à morfometria via software ImageJ, através do tratamento, ajuste para 8 bits e binarização, onde as estruturas coradas de branco correspondem às fibras colágenas (seus respectivos percentuais já calculados pelo próprio software) Coloração TM. Pág.52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1 A lesão por queimadura 16
2.2 O Tratamento da queimadura 18
2.3 Ozônio como fármaco 20
2.4 Evidencias científicas da Ozonioterapia 21
2.5 Óleo ozonizado em tecidos vivos 22
2.6 Atuação do O3 em lesões de pele 27
2.7 Alternativa no combate de processos infecciosos 28
2.8 O uso comercial dos compostos oleicos ozonizados 30
3 OBJETIVOS 32
3.1 Objetivo geral 32
3.2 Objetivos específicos 32
4 MATERIAIS E MÉTODOS 33
4.1 Aspectos éticos 33
4.2 Elaboração do modelo animal 32
4.3 Indução da Lesão por queimadura 35
4.4 Avaliação Macroscópica das lesões 37
4.5 Avaliação microscópica 38
4.6 Análise estatística 42
5 RESULTADOS 44
5.1 Monitoramento do modelo animal 44
5.2 Evolução do processo cicatricial 44
5.3 Avaliação Histológica 48
6.DISCUSSÃO 53
7.CONCLUSÃO 59
REFERÊNCIAS 60
ANEXOS 65

1. INTRODUÇÃO

De início o ozônio foi rotulado como substância tóxica, conclusão endossada por numerosos estudos laboratoriais e epidemiológicos, uma vez que em excesso em um ambiente fechado o gás pode incorrer em uma série de sintomas respiratórios que vão desde dificuldade em respirar, tosse, congestão, desconforto torácico, angina pectoris e em alguns casos ataque cardíaco. Sob esta perspectiva rotulou-se o ozônio como um perigo para a saúde humana. Estudos laboratoriais reiteraram tais efeitos ao nível celular e molecular, já que por ser um poderoso agente oxidante, este é capaz de desviar a energia destinada ao uso celular comprometendo desta forma a função mitocondrial, diminuição da síntese de ATP além de produzir compostos oxigênio reativos citotóxicos (Thorp e Thorp, 2021).

A prática clínica consolida a utilização do ozônio ($O_{3)}$ como um fármaco, podendo este ser tóxico ou seguro resguardados critérios como dosagem, tempo de exposição e capacidade antioxidante do tecido exposto. O acúmulo de evidências farmacológicas sobre o uso terapêutico e eficácia sobre várias doenças de pele como infecções anaeróbias e herpéticas, úlceras tróficas, queimaduras, celulite e abscessos podendo ser utilizado também como agente tópico para reparo de feridas. Devido à sua segurança, fácil aplicação e manuseio a ozonioterapia vem sendo utilizada com há muitos anos como conduta adjuvante ao tratamento básico, assegurando o sucesso de intervenções onde os métodos tradicionais não alcançam os resultados esperados (Di Mauro, 2019).

Atualmente, propostas terapêuticas envolvendo o ozônio vem sendo estudadas já existindo associações positivas do gás à regulação dos fatores de crescimento endógeno, regulação do fluxo sanguíneo local, potencial antioxidante além da já sabida capacidade deste de inativar vários patógenos, em linhas gerais existe um grande interesse nos mecanismos de interação do O_3 nas respostas celulares mais especificamente no processo de reparação tecidual, mesmo na ausência de estudos mais conclusivos. Obviamente ainda existem ressalvas quanto ao uso do gás em doenças respiratórias, justamente pela eventual toxicidade neste meio, alguns casos de irritação cutânea e

episódios de dermatite ainda soam negativamente para a prescrição indiscriminada da ozonioterapia (Wen *et al*., 2022).

Apesar destas incertezas, a formulação de compostos oleicos ozonizados, tem se mostrado uma opção eficaz e segura no combate às infecções locais e no auxílio na reparação tecidual, sendo uma opção promissora para o tratamento de diversas condições que envolvem a pele e mucosa. Especificamente como tratamento de uso tópico, a Ozonioterapia tem se mostrado uma alternativa segura, onde a administração na forma de óleo ozonizado tem se destacado dentro desta perspectiva. Entretanto mudanças significativas nos processos terapêuticos atuais, exigem respaldo científico e bom desempenho frente ao mercado de produtos disponíveis, considerando a extensa gama de produtos já empregados no tratamento de feridas, é relevante que a seleção desses agentes seja realizada com base em evidências, onde deverão ser considerados critérios como o estado geral do paciente, localização, tipificação da ferida, disponibilidade de acesso ao tratamento desejado (Brito Jr, 2022).

Basicamente o óleo ozonizado é formado a partir da associação entre moléculas de O3 e ácidos graxos insaturados, que podem variar de acordo com a complexidade de sua constituição molecular podendo gerar substancias desde compostos insaturados como o ácido oleico, subácidos em óleos vegetais ou até mesmo pelos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA) em óleo de peixe (Moureu, 2015).

A forma ativa do gás nestes substratos se dá pela constituição da porção 1,2,4-trioxolano via ozonização direta em compostos vegetais, onde o anel trioxolano dentro das matrizes vegetais ozonizadas é capaz de liberar gradualmente O_3 na superfície das lesões cutâneas fomentando reações *in loco* responsáveis por acelerar o processo de cicatrização de uma gama significativa de feridas, apresentando também vasto potencial antimicrobiano e antifúngico, em contrapartida o próprio óleo atua como hidratante e protetor, especialmente para pacientes com o comprometimento da função de barreira por parte do epitélio (Wang, 2018a).

O intuito desta pesquisa foi verificar a possibilidade de utilização do óleo ozonizado como conduta terapêutica, quando comparado a condutas já adotadas pela prática clínica, para o tratamento de lesões epiteliais provocadas

por queimaduras tanto macro quanto microscopicamente, considerando a interferência destes compostos na evolução da reparação tecidual em quesitos como retração da ferida, migração do infiltrado inflamatório, composição do meio extracelular, angiogênese e produção de colágeno. Sob esta justificativa foi elaborado um modelo animal de estudo que propiciou a comparação de três propostas terapêuticas: sendo a conduta tradicional adotada no grupo controle, uma proposta de intervenção associada e uma abordagem se utilizando exclusivamente de compostos oleicos ozonizados.

O resultados obtidos, bem como as condutas utilizadas em função destes, levam a crer que compostos oleicos ozonizados podem ser utilizados como proposta terapêutica no tratamento das lesões de pele por queimadura, somando-se ao crescente número evidencias já produzidas que consolidam a utilização deste composto como alternativa viável e segura para o tratamento de feridas, ulceras e demais injúrias que acometam ao epitélio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

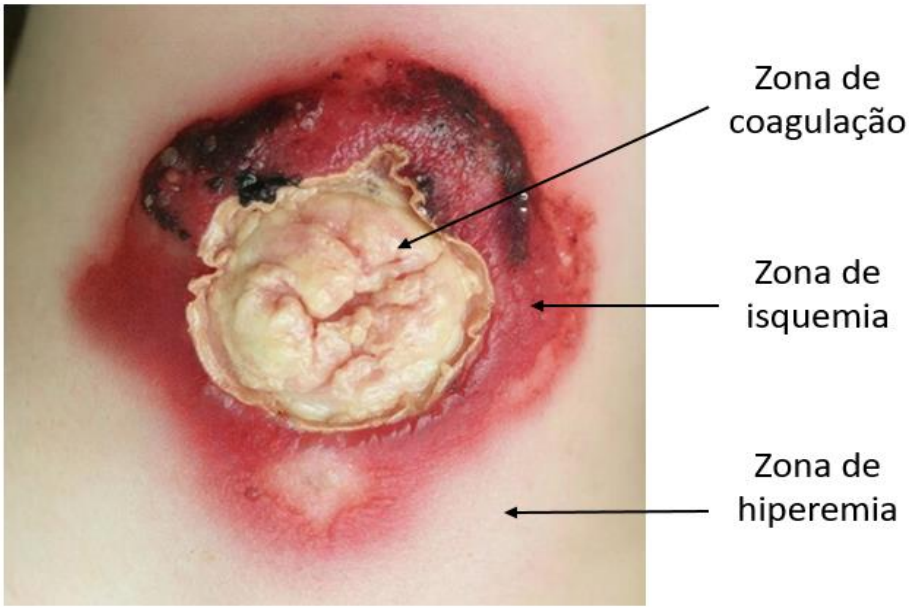
2.1 A lesão por queimadura

No intuito de facilitar a compreensão de uma ferida decorrente de uma queimadura, especificamente em termos histológicos, tais injurias podem ser divididas em três regiões distintas, estas classificadas de acordo com o grau de destruição tecidual e com o comprometimento do fluxo sanguíneo in loco. Partindo desta premissa a parte central da ferida, que é exposta à maior quantidade de calor e consequentemente tornando-se a região mais danificada é conhecida como zona de coagulação, onde o aumento excessivo da temperatura resulta em extensa desnaturação, degradação e consequentemente a coagulação das proteínas o que por sua vez incorre em necrose do tecido subjacente (Rowan, 2025).

Por sua vez ao redor da zona de coagulação encontra-se a zona de isquemia, que ao contrário da anterior apresenta arcabouço tecidual passível de reparação, onde dependendo do tipo de intervenção e a rapidez desta o prognóstico de manutenção da homeostasia das estruturas locais é mais favorável. Distanciando-se do centro da queimadura encontra-se a zona de hiperemia, chamada assim devido ao aumento expressivo do fluxo sanguíneo local devido a vasodilatação decorrente da instalação do processo inflamatório, consistindo na região da recuperação mais favorável se resguardada de novas injurias e de processos infecciosos focais (Hettiaratchy e Dziewulski, 2004).

Em termos histológicos, a profundidade da queimadura pode ser descrita de acordo com a extensão do dano anatômico causado, onde os valores de profundidade são delimitados pela fronteira entre tecido saudável e a área necrótica observada. A diferenciação entre a extensão do dano causado sugere que nas regiões onde ocorre o dano às extruturas microvasculares indicam lesão de média profundidade ou parcial dos tecidos, já regiões com grande desnaturação do colágeno correspondem injurias mais invasivas (Monstrey *et al*., 2008)

Figura 1- Modelo virtual esquemático contendo as regiões distintas de uma lesão por queimadura na pele.



Fonte: Próprio pesquisador

Os profissionais envolvidos nas condutas terapêuticas adotadas para as feridas oriundas de queimaduras devem ter em mente que estas não podem ser consideradas meramente como injúrias localizadas, dada sua propensão em desencadear extensos processos inflamatórios, tanto locais quanto sistêmicos. Entretanto, vale ressaltar que apesar das peculiaridades intrínsecas de um ferimento desta monta, o processo de reparação fisiológico que leva à cicatrização de todas as feridas, se dá através dos mesmos mecanismos e circunstancias independendo de sua etiologia. Tal processo cicatricial se iniciará mediante uma inflamação focal primária onde a vasodilatação local, o extravasamento de fluidos e consequentemente a diapedese celular garantirão o acesso de neutrófilos e monócitos ao local da ferida, dando início a uma primeira resposta imunológica que de imediato será acrescida, via quimiomediadores celulares, por uma migração de macrófagos (Tiwari, 2012).

Dependendo da extensão e profundidade de uma lesão por queimadura, o principal subproduto da reparação tecidual é a formação de tecido necrótico, este por não ser responsivo aos estímulos reparatórios, será isolado dos tecidos vivos e posteriormente degradado durante a evolução do processo inflamatório. Ainda sob efeito da fase inflamatória o correrá na região afetada a fase proliferativa, onde mediadores celulares e citocinas ativarão os queratinócitos e

fibroblastos. Cabendo a ressalva de que a migração dos queratinócitos, para a área da injúria inicial, consiste num mecanismo chave para o fechamento da ferida favorecendo também revascularização da área afetada (Pastar *et al.*, 2014).

Finalmente a remodelação da ferida ocorre logo após a fase proliferativa da cicatrização, o que por sua vez resulta no amadurecimento da cicatriz, tanto o colágeno quanto a elastina depositados sofrem alterações estruturais à medida que os fibroblastos são convertidos em miofibroblastos. Os miofibroblastos por sua vez, participam da contratura da ferida, fazendo com que os estes participem do na manutenção de um equilíbrio delicado entre contração e reepitelização durante o fechamento da ferida (Shih, 2010).

2.2 O tratamento da queimadura

Lesões por queimadura são frequentemente enumeradas como um dos traumas com maior potencial de morbidade que acometem os seres humanos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde aproximadamente 300.000 óbitos anuais ao redor do mundo a cada ano são consequência direta ou relacionados às queimaduras (OMS, 2014). As características da injuria bem como o perfil de destruição tecidual induzem inúmeras disfunções orgânicas, indo desde quadros patológicos de hipermetabolia a processos inflamatórios extensos associados a quadros de infecções localizadas e sepse, o que por sua vez resulta em níveis alarmantes de morbidade e mortalidade (Rivers, 2012).

Só no Brasil o quantitativo anual de hospitalizações gira em torno de 27.500 internações por ano, sendo 62% desse total, indivíduos do sexo masculino com idade média de 24 anos, o reflexo desse perfil é alarmante considerando o impacto na força de trabalho e suas limitações futuras. Consideradas as discrepâncias regionais bem como as proporções continentais do país, o impacto financeiro sobre o sistema de saúde é evidente e quando somados todos os procedimentos e propostas terapêuticas acrescidos do intervalo de tempo necessário para a recuperação satisfatória, com o menor número de sequelas possíveis para os pacientes vítimas de queimaduras (Santos, 2017).

Sabe-se que lesões por queimadura resultam em choque cardiogênico, hipovolêmico e vasogênico, a redução do volume intravascular torna-se critica principalmente devido ao aumento da permeabilidade capilar e das mudanças de fluidos. Por outro lado, mediadores inflamatórios como histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, aminas vasoativas entre outros permitem a perda de proteínas para o interstício. O resultado é a redução do líquido intravascular, eletrólitos e proteínas com rápido equilíbrio com os compartimentos intersticiais. Clinicamente, isso se manifesta por hipovolemia, hemoconcentração, edema, oligúria e disfunção cardiovascular. Entretanto os autores ressaltam que, mediante a introdução de protocolos de ressuscitação hídrica, condutas terapêuticas visando a remissão precoce da queimadura, a utilização de agentes antimicrobianos locais e sistêmicos visando a otimização no controle de infecções, são consideradas melhorias de tratamento que refletiram positivamente na recuperação dos pacientes submetidos às mesmas (Snell, 2013).

De acordo com Castilla (2016), a compreensão da fisiopatologia da lesão por queimadura é importante para uma proposta terapêutica coerente, tais lesões são capazes de incitar respostas tanto locais quanto sistêmicas, queimaduras mais graves podem desencadear reações imunes desproporcionalmente mais severas incorrendo em processos inflamatórios exacerbados. Fato que suscita frequentemente o questionamento sobre o grau de complexidade do comprometimento sistêmico do paciente gravemente queimado, como por exemplo a falência múltipla de órgãos como comorbidade associada. Ainda com a ressalva de que, pacientes gravemente queimados são mais suscetíveis a casos de sepse que culminam e episódios de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), acarretando em danos ao trato respiratório, gastrointestinal, excretor e até mesmo ao sistema nervoso central.

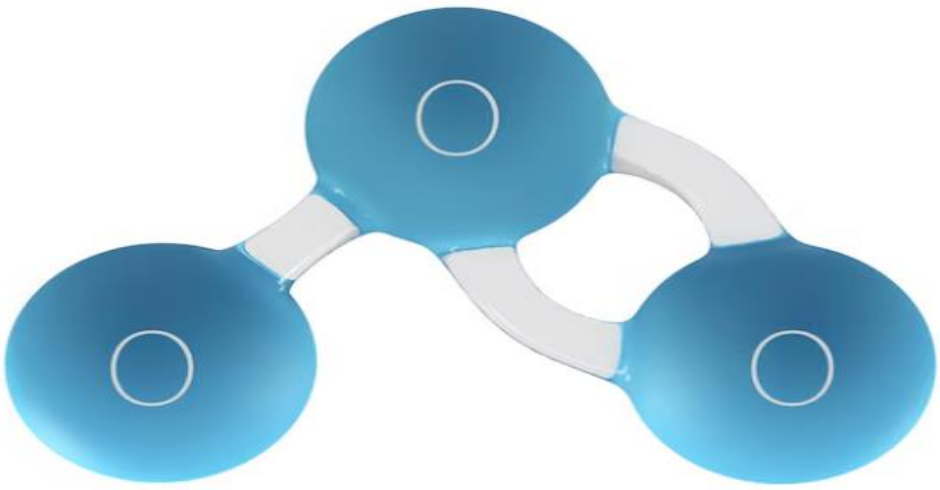
Consideradas as complexas interações celulares e bioquímicas que compõe o processo de reparação tecidual desde a angiogênese ao processo de consolidação da cicatriz, a utilização de compostos ozonizados ou mesmo o próprio gás como alternativa terapêutica vem sido citado na literatura já a algum tempo. A avaliação das possíveis interações imunológicas, Imunohistoquimica e bioquímicas, sugerem que o processo de cura é otimizado através da utilização da Ozonioterapia e indo além, correlacionam tal melhora ao fator de crescimento

de fibroblastos (FGF2) bem como valores otimizados de diferenciação dos miofibroblastos. O que em linhas gerais corroboraria para melhor cicatrização tanto para lesões agudas quanto para traumas crônicos (Soares, 2019).

2.3 Ozônio como fármaco

Atualmente o O_3 está disponível para uso médico através de várias formulações, podendo ser usado em sua forma gasosa primordial para o tratamento de feridas topicamente, em ambiente controlado insuflando-se invólucros plásticos com uma mistura de gases ozônio-oxigênio (70 e 80 µg/mL respectivamente) por um determinado período de tempo (Figura 2). A agua ozonizada é obtida por aparelhos geradores do gás capazes de saturar este em meio aquoso, sendo utilizada com eficácia comprovada como coadjuvante no tratamento de infecções e afecções de pele. Já o óleo é obtido pela mistura do ozônio com ácidos graxos insaturados, sendo recomendado para o uso no tratamento de infecções cutâneas persistentes, com resultados positivos para vários microrganismos, sendo que uma das grandes vantagens deste composto é a possibilidade de utilização do mesmo por parte do paciente fora do ambiente clínico, reduzindo o número de retornos deste ao hospital (Wang, 2018b).

Figura 2- Modelo tridimensional de uma molécula de ozônio, composta por três átomos de oxigênio unidos por ligações covalentes, sua fórmula química é representada pelo termo O_3.



**Fonte: Imagem gerada por inteligência artificial via freepik.com*

Reconhecido como uma das melhores moléculas bactericidas, antivirais e antifúngicas já vem sendo utilizado no tratamento de feridas crônicas, onde seus efeitos benéficos na reparação tecidual podem ser atribuídos à diminuição da infecção bacteriana, bem como ao aumento da tensão de oxigênio pela exposição de O_3 na área da ferida. Quando aplicado em veículo aquoso, o gás não é capaz de penetrar no meio intracelular, porém reage instantaneamente com as duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados levando à formação de produtos bioativos, sendo tal via secundária responsável pela ativação de fatores de crescimento e aceleração do ciclo celular in loco (Solovastro et al, 2015).

Pesquisas realizadas em seres humanos, já estão obtendo resultados favoráveis ao utilizarem-se do O_3 em veículo oleoso, visto que neste formato tais compostos seriam mais estáveis possibilitando a perfusão mais lenta e prolongada da molécula do gás junto à região afetada, de maneira que a substancia possa agir de forma mais funcional para a reparação tecidual, (Valacchi *et al.*, 2013; Chen *et al*., 2020).

Em comparação com medicamentos em uso de longa data como indometacina e Nitrofural, os óleos com um baixo grau de ozonização (22% – 24%) tem aplicação clínica potencial para inflamação e cicatrização tratamento de feridas, alguns dos subprodutos de compostos oleicos ozonizados também participam processo terapêutico in loco, tendo como condição chave para sua eficácia clínica o grau de saturação do gás no veículo liquido. Por sua vez a via de administração do ozônio tende a influenciar diretamente na inibição da inflamação, dentro desta perspectiva, o uso de composto oleicos tendem a reduzir inflamações localizadas em até 30%, sendo até mais efetivos que as soluções fisiológicas ozonizadas. A cicatrização completa de feridas em camundongos diabéticos tratados com óleos ozonizados foi obtido durante o mesmo tempo que o relatado para camundongos não diabéticos, sem a observação de sinais de infecção (Guerra-Blanco *et al*., 2017).

2.4 Evidências cientificas da Ozonioterapia

Com o intuito de investigar o efeito do tratamento com ozônio medicinal em processos inflamatórios do trato gastrointestinal, a Ozonioterapia foi utilizada como conduta terapêutica para colite distal aguda induzida por ácido acético em

um estudo de modelo animal. Os autores observaram que o uso do gás reduzindo significativamente os níveis plasmáticos de TNF-α e IL1β, melhorando também a resposta histológica tissular in loco, levando a crer que o O^3 em contato com processos inflamatórios instalados é capaz de não só reduzir o edema local como mitigar processos inflamatórios além de afetar os processos de proliferação celular e vascularização local (Aslaner *et al*., 2016).

Como fármaco de uso dermatológico o ozônio serve como uma alternativa prática com eficácia sabidamente comprovada contra bactérias, agindo de maneira a interromper diretamente o ácido nucleico ou o invólucro lipossômico destes microrganismos, com a membrana comprometida a permeabilidade favorece ainda mais o acesso das moléculas de ozônio dentro do perímetro celular comprometendo o metabolismo desta. Via de regra a molécula de O_3 é capaz de interagir com o meio e ao dissociar-se liberando radicais livres de oxigênio agressivos aos espécimes presentes nas feridas de pele como fungos e vírus, indiretamente atuado como ativadora da resposta imunológica tanto celular quanto humoral (Zeng e Lu, 2018).

Dentro da problemática apresentada, algumas propostas terapêuticas mais recentes têm ganhado visibilidade na literatura, dentre elas a Ozonioterapia tem sido cotada como alternativa viável e relativamente acessível para o tratamento de lesões e/ou traumas epiteliais bem como dos demais tecidos subjacentes. Em revisão sistemática com o intuito de avaliar a Ozonioterapia como conduta terapêutica para ferimentos e injurias crônica, Fitzpatrick (2018) considerou existirem boas evidências para apoiar terapia com ozônio como procedimento médico curativo, independendo da modalidade aplicada, potencialmente eficaz para o tratamento de feridas crônicas. Entretanto, apesar dos resultados favorecerem de forma consistente a aplicação do gás e seus subprodutos como tratamento, mencionando o mesmo como passível de adoção pela prática médica convencional, cabe a ressalva de que tanto a heterogeneidade das amostras, tipo de abordagem quanto o número reduzido de participantes nos estudos avaliados sugerem pesquisas mais aprofundadas sobretudo com faixas etárias definidas.

O ozônio pode reagir com os óleos vegetais para produzir compostos oleicos ozonizados que têm propriedades antimicrobianas e podem ser usados na dermatologia, partindo deste princípio Moreau *et al.* (2015), estudaram o

processo de obtenção desses óleos considerando principalmente sua acides, concentração de peróxidos e concentração de iodo. De acordo com os autores a adição do gás no óleo de girassol tornou este um agente antibacteriano significativamente eficaz, durante avaliação *in vitro*, contra as três principais cepas bacterianas responsáveis pela mastite (*S. aureus, E. coli e S. uberis*). Os autores ressaltam ser necessário um estudo aprofundado para uma melhor compreensão da ação dos óleos ozonizados sobre bactérias e para identificar e quantificando os compostos responsáveis pela atividade antibacteriana antes de considerar ensaios in vivo.

No intuído de verificar a eficácia da Ozonioterapia em pacientes portadores de ulceras cutâneas causadas por Diabetes Mellitus Liu (2015), realizou revisão sistemática, considerando como banco e de dados todos os artigo que continham ensaios clínicos randomizados (ECR) que por sua vez comparassem a terapia de ozônio com a terapia de ozônio simulada ou quaisquer outras intervenções consideradas como tratamento para úlceras nos pés de indivíduos portadores de Diabetes Mellitus, independendo da data ou idioma da publicação. A pesquisa em questão não obteve sucesso em determinar se a terapia com ozônio é eficaz quando administrada isoladamente ou como parte de um pacote de cuidados para tratamentos das respectivas ulceras. Os autores atribuem este resultado à baixa reprodutibilidade dos ensaios randomizados, seja pela metodologia inespecífica ou pelos resultados advindos de informações de baixa qualidade, considerando tais vieses não conseguiram tirar conclusões sobre a efetividade da Ozonioterapia, especificamente no tratamento de úlceras causadas pela referida alteração hormonal.

Avaliando o potencial terapêutico dos óleos ozonizados, Günaydin *et al.* (2017), constataram que a aplicação medicinal destes subprodutos vem sendo ministrada com significativo sucesso para uma gama extensa de injurias que vão desde infecções, ulceras, queimaduras, doenças fúngicas e até mesmo gengivites. Quando considerado um espectro de tal magnitude, é interessante notar que apesar de extremamente eficaz contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e vírus os compostos oleicos ozonizados apresentam baixa ou nenhuma citotoxicidade, mesmo para aqueles detentores de consideráveis concentrações de peróxidos. O que em outras palavras, endossa a existência de

um potencial curativo otimizado do produto estudado, porém sem ônus e/ou efeitos colaterais para o arcabouço celular que eventualmente recebera a substancia em questão.

Em estudo detalhado avaliando a caracterização química minuciosa de óleos vegetais ozonizados e na forma de gel, onde foi incluído o monitoramento do comportamento da calorimetria diferencial dessas substancias, os autores observaram que os óleos ozonizados mostraram atividade antimicrobiana significativa contra Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Ugazio *et al*., 2020).

Especificamente os óleos vegetais na forma de gel (Oleogel), uma composição mais recente, provaram ser mais ativos contra cepas historicamente multirresistentes, tais como linhagens de *E. faecalis e S. aureus*. No mesmo estudo os pesquisadores ainda fazem a ressalva de que, tanto os Óleos ozonizados quanto o Oleogel mostraram-se potencialmente ativos contra mutações celulares de perfil neoplásico não incorrendo em atividade citotóxica quando testados em fibroblastos de espécies murinas NIH / 3T3. Configurando por sua vez, característica desejável para o uso seguro dessas substancias em pacientes com feridas crônicas e outras condições dermatológicas, onde a toxicidade mínima para as células normais é critério de eleição para fármacos e/ou processos terapêuticos (Almeida Kogawa *et al*., 2015).

Experimentos conduzidos com uma preparação médica com composto de gel dermatológico contendo 30% de óleo de semente de girassol ozonizado com valores de acidez do ácido oleico 1,60%, de peróxido 335 meqO2/kg e viscosidade 193 mPas. Dados obtidos a partir dos modelos de cultura prévios in vitro, indicaram a não citotoxicidade do composto oleico, indo mais além os autores realizaram um teste de desafio microbiano, também in vitro, no intuito de avaliar a probabilidade de contaminação do referido gel por parte do usuário, foram inoculados no produto microrganismos conhecidos por contaminarem formulações semelhantes, as amostras foram observadas em um período de 28 dias sendo que os resultados obtidos demostraram a resistência do produto quanto a proliferação e contaminação microbiana (Serio, 2017).

Numa tentativa de validar o óleo ozonizado como proposta viável para o tratamento da Dermatite Atópica, Lu *et al.* (2018) submetendo cobaias murinas a agentes alérgenos, observaram que o óleo ozonizado inibiu significativamente

a exacerbação dos processos inflamatórios induzidos em função do estudo. Os autores também observaram uma considerável redução no tempo geral de remissão das lesões, quando comparadas com as do grupo controle tratadas com veículo oleoso sem ozônio. Ainda de acordo com os autores o óleo ozonizado inibiu a expressão do Fator de Transformação do Crescimento beta (TGF-β) em comparação com os grupos tratados com veículo sem o aditivo, proteínas séricas e os transcritos lesionais das citocinas Th2 incluindo IL-4 e IL-31 foram menores no grupo submetido à ozonioterapia do que nos grupos controle.

Avaliando o potencial curativo de soluções tópicas contendo ozônio para o tratamento de infecções cutâneas por bactérias multirresistentes, Song (2017) constatou, mediante estudo in vitro, a eficácia do potencial de eliminação de colônias formadas por cepas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* ou MRSA). Baseados no sucesso laboratorial, os autores se utilizaram do mesmo composto oleico, em tratamento tópico local, em pacientes portadores de lesões ulceradas epiteliais colonizadas por bactérias multirresistentes, onde observaram a regressão das mesmas em intervalos relativamente curtos, variando de acordo com a profundidade e tamanho das lesões. O que, na concepção do pesquisador em questão, colaboraria para que a ozonioterapia seja considerada um tratamento potencialmente eficaz para Infecções cutâneas multirresistentes, com raros efeitos colaterais e boa viabilidade financeira.

No intuito de avaliar os efeitos de três graus diferentes de óleo de gergelim ozonizado em feridas cutâneas agudas feitas na pele de camundongos hairless tipo SKH1, Valachi (2011), observou tanto a evolução do fechamento das feridas, parâmetros histológicos, o nível de proteínas-chave (endotelial vascular) bem como fatores de crescimento e a Ciclina D1 avaliados em relação ao nível de peróxido presente nos respectivos óleos ozonizados. Foi observada a significativa melhora na rapidez de oclusão da ferida na primeira fase reparadora, mais suscetível a infecções. Fato que de acordo com os autores, sugere a utilização de compostos peróxidos como conduta terapêutica a ser considerada, confirmando a validade dos óleos ozonizados como agentes potencializadores de cura.

Em revisão sistematizada da literatura utilizando-se de artigos abrangeram apenas ensaios clínicos controlados com abordagem voltada para

o tratamento de doenças de pele, Zeng e Lu (2018) verificaram que, na grande maioria dos estudos selecionados, a eficácia da ozonioterapia como conduta terapêutica ao ponto de sugerir que esta possa ser utilizada como tratamento alternativo e/ou complementar em alguns tipos de condições dermatológicas, como úlceras diabéticas nos pés, úlceras digitais, queimaduras cutâneas entre outras. No entanto, as evidências disponíveis sobre o uso de ozônio como tratamento de longo prazo ainda são escassas, ficando ao encargo dos profissionais de saúde avaliar a relação risco-benefício dessa terapia para seus respectivos pacientes.

2.5 Óleo ozonizado em tecidos vivos

O entendimento acerca dos efeitos farmacológicos do ozônio na pele, requer algumas considerações fisiológicas, anatômicas e funcionais importantes, via de regra o O_3 tem um baixo potencial de penetração estrutura do epitélio, a principal causa desta característica é sua capacidade de reação rápida com ácidos graxos poli-insaturados e água dos tecidos, levando à formação de Espécimes Reativas ao Oxigênio (ERO) e Lipooligopeptídeos (LOP), que por sua vez são facilmente eliminados por moléculas antioxidantes da pele e/ou parcialmente absorvidos através da microcirculação venosa e vasos linfáticos (Di Mauro, 2019).

Tais processos suscitam a hipótese de que o O_3 seja um agente pré condicionante (PC) significativamente eficaz, o principal efeito in loco do ozônio é a indução de stress oxidativo, que começa nos tecidos epiteliais porém imediatamente desencadeia uma resposta das células sanguíneas em particular as hemácias, ativas metabolicamente, estas são capazes de fornecer energia e liberar compostos antioxidantes, que somados à liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células, constituem uma resposta considerável a um fator etiológico que já não encontra-se ativo, já que uma vez em contato com fluidos corporais, o O_3 solubiliza-se imediatamente. Por outra via de atuação algumas das moléculas decorrentes da oxidação lipídica acabam agindo como substâncias mensageiras para a ativação da função genética favorecendo a transcrição de biomoléculas capazes de neutralizar os efeitos adversos do ozônio nos tecidos, reduzindo sua potencial citotoxicidade a valores ínfimos (Sagai e Bocci, 2011; Günaydın *et al*., 2018; Thorp e Thorp, 2021).

O ozônio quando associado a compostos oleicos destaca-se como facilitador do processo de reparação tecidual, a eficácia do óleo ozonizado pode representar proposta integrativa no tratamento de lesões teciduais, especialmente em pacientes que apresentam patologias como diabetes mellitus, aterosclerose e dermatite, existindo relatos de que óleo auxilia também no alívio da dor e na aceleração do processo de cicatrização (Anzolin *et al*., 2020).

Dentro desta perspectiva existem fortes indícios de que o óleo ozonizado de uso tópico seja capaz de otimizar a reparação tecidual, interferindo na proliferação, crescimento e na diferenciação celular. O potencial de atuação do O_3 no aumento da fosforilação do receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF1R), junto ao fator de crescimento epidérmico (EGFR) bem como o dos quimioceptores para o fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) esclarece, segundo os autores, o mecanismo de ação tópica do ozônio em feridas crônicas consolidando sua potencial aplicação terapêutica (Lu *et al*., 2023).

No que diz respeito a relação de interferência do O_3 em processos de neoformação vascular Valacchi *et al*. (2011) e Sanguanini *et al.* (2020), observaram em estudos com modelos animais, o aumento significativo dos fatores de crescimento endotelial vascular em indivíduos tratados com compostos oleicos ozonizados. Os autores descreveram um perfil otimizado de resposta celular mediante a utilização do O_3, inclusive identificando reação mais rápida e perfil mais ativo das células envolvidas no processo de reparação das feridas.

2.6 Atuação do O3 em lesões de pele

Dos trabalhos de revisão de literatura dedicados à Ozonioterapia, pôde-se observar uma vertente preexistente que já associa O_3 ao tratamento das feridas e úlceras cutâneas (Liu *et al.*, 2015; Brito Jr *et al*., 2020; Mota *et al*., 2020), ao que tudo indica a utilização compostos oleicos ozonizados é eficaz no combate a lesões crônicas da derme, seus fatores antimicrobiano e antifúngico favorecem o processo de reparação tecidual privando este de ter de lidar com infecções oportunistas.

Ainda sobre tal premissa (Zeng & Lu, 2018), mencionam o óleo ozonizado como medicamento prático e barato, podendo ser usado dermatologicamente

em vários processos infecciosos, além de atuar como antioxidante em vários processos patológicos. Porém ainda há de ser lançada luz sobre as propriedades físico-químicas dos compostos a base de O_3, como por exemplo seu potencial biossintético, vasodilatador e modulador da sensação álgica.

Tal vertente se repete dentre os estudos que se utilizaram de modelos animais, porém com alguns achados interessantes (Lu *et al.*, 2023; Lima *et al.*, 2022; Valacchi *et al.*, 2011; Sanguanini *et al.*, 2020) verificaram, em diferentes modelos de pesquisa com diferentes propostas investigativas que, além da resposta melhorada na reparação de feridas na pele, o uso do óleo ozonizado é capaz de favorecer a neoformação vascular na região do ferimentos e/ou lesões no epitélio, onde a interferência e eventual mediação do processo de angiogênese in loco tende a auxiliar significativamente a cicatrização e reparação tecidual dessas lesões.

Levantamentos anteriores referem como seguro o uso dermatológico das soluções ozonizadas, sobretudo quando levado em consideração o potencial antifúngico e antibiótico do O_3, advogam a favor do gás também a biocompatibilidade dos compostos utilizados e a melhoria visível quando da utilização destes no fechamento de feridas e úlceras crônicas. Mesmo ao considerarmos a indução do mecanismo de stress oxidativo, este não incorre em dano aos tecidos subjacentes visto que não existem relatos citotoxicidade oriunda da interação deste com o epitélio (Fitzpatrick *et al.*, 2018; Di Mauro, 2019; Wen *et al.*, 2021).

2.7 Alternativa no combate de processos infecciosos

Facilmente encontradas na pele humana, *Staphylococcus aureus (S. aureus) e Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)* são frequentemente relacionadas a episódios de infecção principalmente devido ao seu potencial de colonização das feridas e/ou injurias no epitélio, dentro deste contexto (Zang & Lu, 2018), referem que o potencial antibiótico dos compostos oleicos ozonizados no combate destas infecções reside em sua atuação moderada e continua na inativação das bactérias, na sua obtenção relativamente barata e em seu amplo espectro de atuação. Vale ressaltar que alguns de seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados, como a ativação dos sistemas

imunológicos tanto celular quanto humoral bem como seu potencial antioxidante frente a vários processos patológicos.

Cientes que o *Staphylococcus aureus (S. aureus)* é responsável por 90% da composição da microbiota em lesões de Dermatite Atópica (DA) interferindo negativamente na evolução da doença, Zeng *et al.* (2020) relataram que o efeito bactericida do O3 é capaz de corrigir a diversidade microbiológica nas áreas afetadas, favorecendo uma melhor recuperação das lesões causadas pela dermatite com perceptível remissão dos sintomas, alívio do prurido e redução de inflamação local.

No intuito de esclarecer a eficácia antibacteriana dos óleos ozonizados em feridas e úlceras infectadas em mucosas e na pele, Zanardi *et al.* (2013) se utilizaram de culturas de microrganismos comumente encontrados nestes sítios, as cepas de referência foram de, *Enterococcus faecalis , Pseudomonas aeruginosa , Escherichia coli , Candida albicans e Staphylococcus aureus*. Os compostos ozonizados demonstraram eficácia impedindo a crescimento e a proliferação bactérias e fungos durante o estudo, os autores ressaltam que a aplicação de um veículo oleoso na forma tópica exige a higienização previa da superfície danificada, remoção de tecido necrótico, pus, deposição de fibrina e excesso de exsudatos líquidos.

Considerando as infecções fúngicas superficiais que afetam diferentes partes do corpo humano como pele, mucosa cabelos e unhas Gonzales (2016), estudou novas propostas de tratamento antimicótico, testando compostos aquosos e oleicos a base de O_3 in vitro em culturas de *Candida albicans, Trichophyton rubrum, Fusarium spp e Microsporum canis*, onde percebeu o potencial antifúngico destes compostos em amostras dos três primeiros espécimes.

Em estudo anterior Thomson *et al.* (2011), verificaram, em modelos animais, que soluções oleosas contendo O_3 apresentaram-se seguras para o uso tópico além de combativas contra diferentes espécimes de fungos causadores de dermatofitose, sugerindo que tais soluções fossem comparadas com outras condutas terapêuticas em testes de eficácia.

Cientes do já documentado potencial antimicótico e boa tolerância cutânea dos óleos ozonizados Menendez *et al.* (2011) e Lu *et al.* (2018), conduziram estudos comparativos com fármacos amplamente utilizados e

propostas terapêuticas alternativas, em ambos os estudos os autores observaram significativa remissão dos sintomas e redução das colônias fúngicas residuais sem quaisquer efeitos colaterais e/ou adversos decorrentes do uso do ozônio. Cabendo a ressalva de que, apesar dos pesquisadores estudarem diferentes tipos de fungos, chegaram a conclusões semelhantes no que diz respeito à eficácia dos compostos oleicos frente a medicamentos consolidados com terapia antimicótica de eleição como o cetoconazol.

2.8 O uso comercial dos compostos oleicos ozonizados

Atualmente já existe uma ampla produção e comercialização de compostos a base de O_3, muito provavelmente em função de sua fácil obtenção, estes podem ser gerados via mecanismos que promovam o borbulhamento do gás em frascos contendo o óleo, a incorporação da molécula de ozônio ao óleo vegetal resulta de uma reação química, onde este reage com as ligações duplas de carbono presente nas cadeias lipídicas, tal reação produz uma série de novas moléculas como ozonídeos e lipoperóxidos (Anzolin *et al.*, 2021).

Como subproduto comercializável o óleo ozonizado é recomendado por suar propriedades antissépticas, porém existem indícios de que apesar de serem considerados excelentes antimicrobianos, estudos laboratoriais não foram capazes de atestar a eficácia do O_3 em alguns tipos de fungos (Gonzales, 2016).

Também foram observados perfis diferenciados de resposta frente algumas cepas bacterianas, levantando ao questionamentos quanto a atuação e o amplo espectro dos compostos ozonizados (Zeng, 2020).Somam-se aos questionamentos quanto ao uso do O_3 o fato de que existem dificuldades reais de se conduzir estudos populacionais multicêntricos, sobretudo com ensaios clínicos capazes de englobar indivíduos de várias regiões para que se obtenham tamanhos de amostra apropriados, que sejam capazes de detectar diferentes reações frente aos tratamentos propostos (Wen *et al.*, 2022).

Especificamente para os estudos que envolvam lesões crônicas de pele, algumas variáveis podem interferir significativamente nos resultados obtidos, no caso das lesões de pé diabético por exemplo, pacientes com glicemia controlada e em uso regular de medicação associada, tendem a apresentar prognósticos melhores, fato que sugere que estudos posteriores deveriam considerar a

adesão dos pacientes à conduta terapêutica, sobretudo seus benefícios frente outras propostas de tratamento (Liu *et al.*, 2015).

Apesar da carência de dados quanto as concentrações ideais do O_3 nos compostos oleicos, não é de todo correto afirmar que quanto mais melhor, visto que alguns estudos já alertam que parte da eficácia destes compostos depende diretamente da concentração do Gás e que nem sempre as maiores concentrações estão relacionadas aos melhores resultados (Martinez-Sanches, 2021).

Existe uma preocupação dos pesquisadores quanto a segurança dos compostos ozonizados, especialmente quanto a falta de critério no uso doméstico, onde a ocorrência de eventos adversos é geralmente relacionada a falta de atenção durante a administração do produto, grande parte da segurança do uso no epitélio está relacionado ao uso tópico superficial, por sua vez propostas mais invasivas devem adotar abordagens mais criteriosas (Wen *et al*., 2022).

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atuação do óleo de girassol ozonizado no processo de reparação tecidual em lesões provocadas por queimaduras em ratos.

3.2 Objetivos específicos

1- Comparar a eficácia do óleo ozonizado com propostas terapêuticas já disponíveis no mercado utilizadas sob mesmas prerrogativas e/ou circunstancias.

2- Avaliar macroscopicamente a evolução do potencial reparador de compostos ozonizados no processo de cicatrização em queimaduras induzidas em modelo animal.

3- Obter perfil histológico dos processos patológicos teciduais considerando o comportamento dos fibroblastos, infiltrados inflamatórios de polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN).

4- Avaliar microscopicamente o potencial de interferência dos compostos oleicos ozonizados no mecanismo de neoformação vascular e na produção de colágeno durante o processo de reparação tecidual.

4 MATERIAIS & MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi concebido e realizado segundo as normas do Comitê de ética para Pesquisa em Animais CONCEA tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (CEUA-UFMS) com registro n° 1.298/2023. Os episódios envolvendo a eutanásia e demais processos de manejo dos animais foram supervisionados pela equipe técnica do biotério da instituição.

4.2 Elaboração do modelo animal

O modelo experimental de queimaduras já foi estudado em murinos, sobretudo no intuito de verificar a reparação tecidual da pele dos animais, sendo que o processo de cicatrização entre espécies distintas de mamíferos é notadamente semelhante no que diz respeito a proliferação celular e a remodelação in loco considerando-se episódios de agressão específicos, existindo portanto uma forte correlação entre o processo de reparação tecidual destes animal com a pele dos seres humanos, o que valida a escolha dos mesmos para este modelo de experimento, Castilla (2016).

Especificamente para este estudo foram utilizados 36 animais divididos em três grupos, cada um contendo 12 ratos que receberam a intervenção caracterizada por duas lesões de queimadura no primeiro dia do experimento seguido de conduta terapêutica com medicação tópica local por 12 dias a cada 24 horas (Figura 3), dispostos e organizados conforme a orientação:

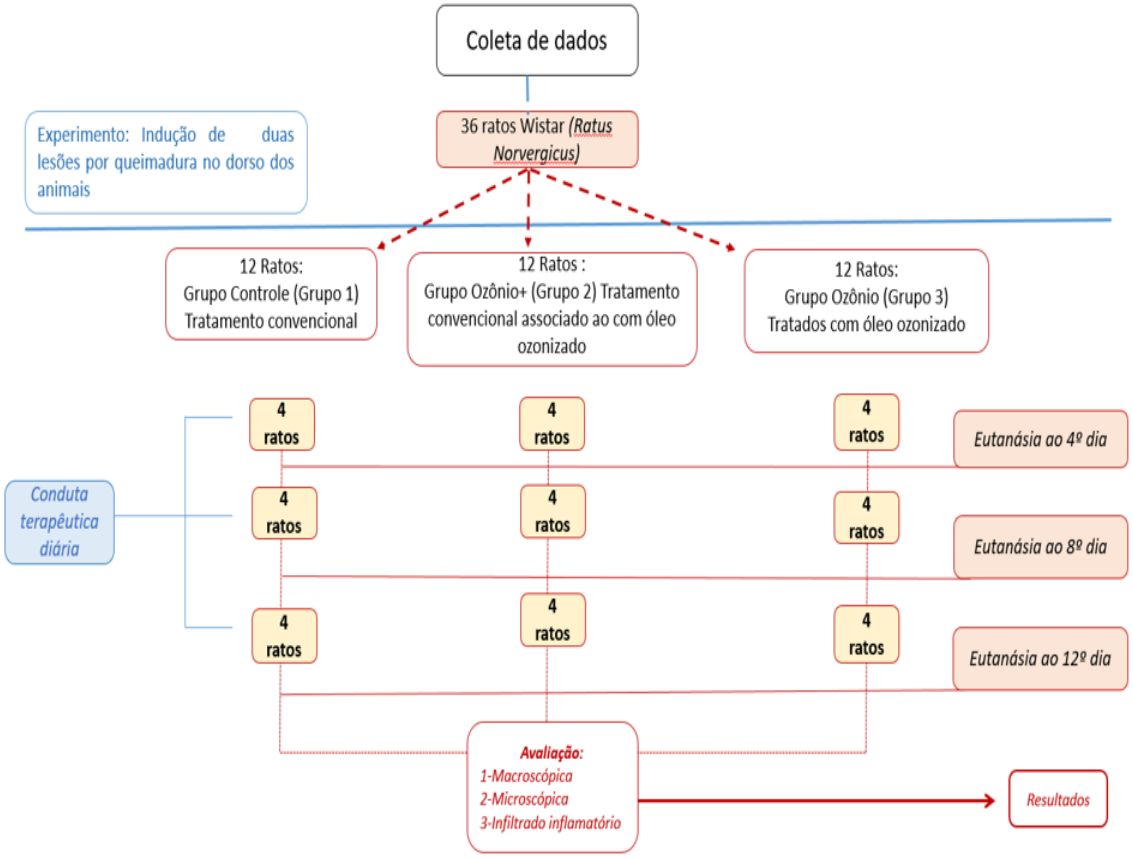
Grupo 1 - Controle: receberá curativo com soro fisiológico para limpeza da ferida e será aplicado como cobertura primária sulfadiazina de prata a 1% com oclusão total do ferimento, com troca do curativo a cada 24h.

Grupo 2 - Ozônio +: este também receberá aplicação de óleo de girassol ozonizado Ozonecare^{TM} com gotejamento perpendicular sobre cada lesão de forma local em toda a extensão do ferimento em doses de 0,2ml ou quatro gotas por lesão, recobrindo esta pelo composto oleico associado a uma cobertura secundária por sulfadiazina de prata a 1% com oclusão total do ferimento e troca deste a cada 24h.

Grupo 3 - Ozônio: receberá aplicação de óleo de girassol ozonizado Ozonecare^{TM} com gotejamento perpendicular sobre cada lesão de forma local

em toda a extensão do ferimento em doses de 0,2ml ou quatro gotas por lesão recobrindo esta pelo composto oleico, com repetição da conduta a cada 24h.

Figura 3- Fluxograma do desenho estrutural e desenvolvimento das etapas do ensaio clínico contendo as subdivisões em grupo e respectivos intervalos de eutanásia para coleta de dados.



Fonte: Próprio pesquisador.

Considerando tais orientações foram utilizados animais da espécie *Rattus norvegicus* WISTAR, machos, adultos, com peso médio de 250g, obtidos mediante solicitação ao biotério da UFMS, nascidos entre 28/12/2023 e 04/01/2024. Em função do delineamento da pesquisa, os animais foram selecionados aleatoriamente e alocados em duplas, em caixas divididas por anteparo acrílico rígido e imóvel que permitia visibilidade, porém impedindo o contato físico entre os espécimes (Figura 4A).

Foram constituídas para esta finalidade 18 caixas contento forragem de maravalha onde foram disponibilizadas alimentação e agua de forma equânime e *ad libitum*, tais receptáculos permaneceram no mesmo laboratório com ciclos de iluminação programados para dia e noite e monitorados diuturnamente até o termino do experimento (Figura 4B e 4C). Vale ressaltar que os cuidados dedicados à condução da etapa clínica também foram pensados no intuito de

minimizar eventuais situações desencadeadoras de stress entre os componentes da amostra, evitando que situações adversas comprometessem a homeostasia dos espécimes avaliados.

Figura 4- Alocação o das caixas divididas e ambientadas contendo os animais avaliados durante o estudo (**A**). Disposição e armazenamento em ambiente laboratorial (**B**). Conferencia diária das condições de alimentação, hidratação e higiene durante o curso da etapa clínica (**C**).

Fonte: Próprio pesquisador.

4.3 Indução da lesão por queimadura

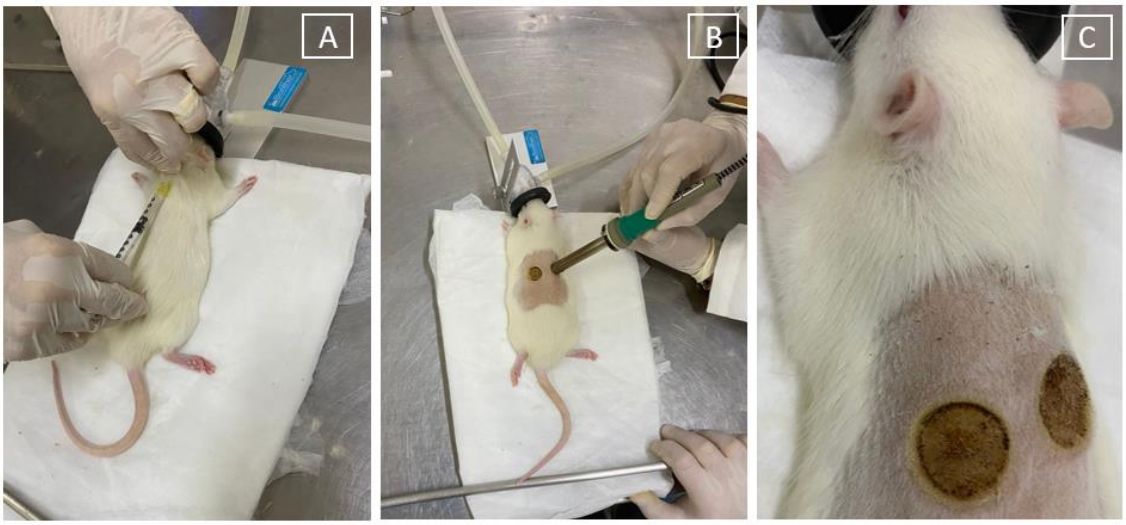
A indução de queimaduras experimentais em modelos animais é uma ferramenta essencial para entender a patogênese dos danos à pele em humanos, de maneira que se possam delinear e projetar novos métodos de tratamento. Por sua vez modelos animais murinos têm sido usados para investigar o processo patológico das queimaduras de longa data, porém recentemente tem-se atribuído significativa importância na verificação da efetividade das medicações tópicas em feridas cutâneas causadas por queimaduras (Campelo, 2011). Consideradas tais premissas, uma ferramenta geradora de queimaduras foi criada em função do estudo, onde uma haste cilíndrica de aço inoxidável de 100 g de com um centímetro de diâmetro foi adaptada a um ferro de solda de 60W, 127V, G14/127 Western^{TM} com a finalidade específica de confeccionar as lesões por queimadura, (Fig. 5B). A temperatura da haste era monitorada por um termômetro infravermelho com mostrador digital, para uso industrial de feixe laser (-50º A 380ºC) usado sem contato direto. Mediante o acionamento do instrumento aquecido dispunha-se o termômetro próximo a este no intuito de verificar quando o mesmo atingiria a

temperatura de 100ºC, tal processo foi repetido previamente a confecção de cada uma das lesões por queimadura. (Cai et al, 2014).

Constatada a eficácia da anestesia os animais foram submetidos à tricotomia na região o dorso do animal, com um barbeador elétrico com lâmina de 4 cm de largura, mantido a um ângulo de 45 graus em relação à pele onde foram executadas duas passagens na mesma área, minimizando desta forma o trauma na pele, subsequentemente foi feita a antissepsia da região com solução de digluconato de clorexidina alcóolica a 0,5% (Castilla, 2016)

Para que fossem gerados os ferimentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa, os espécimes foram submetidos a anestesia geral, por meio de anestésico inalatório (Isofluorano), dose de 3-5% para indução e 1-2% para manutenção. Também foi administrada em todos os animais da amostra, medicação analgésica injetável prévia com solução de buprenorfina 5mg em doses de 0,3 ml (Figura 5A).

Figura 5- Aplicação de analgésico previamente a indução de queimadura (**A**). Indução e de lesão epitelial por queimadura com instrumento confeccionado para esta finalidade (**B**). Rato ainda sob sedação imediatamente após a realização das queimaduras (**C**).



Fonte: Próprio pesquisador.

A área para queimadura foi considerada de 12 cm (±2 cm) × 8 cm (±2 cm), limitada a região lombar. A palpação da décima segunda costela bilateralmente e traçando uma linha horizontal abaixo delas marcou o limite superior, a palpação do osso pélvico e o desenho de uma linha horizontal acima dele marcaram o limite inferior. Apalpar e traçar uma linha vertical seguindo o curso dos processos espinhosos vertebrais marcou a linha média. Uma linha horizontal dividindo os limites superior e inferior também foi desenhada. Essas linhas dividiam o lombo

em quatro áreas iguais para a confecção de duas lesões por queimaduras análogas e paralelas entre si.

Sob efeito da anestesia geral, foi avaliada a profundidade da sedação mediante dois testes consecutivos de pinçagem em membros diferentes. Consideradas tais prerrogativas, a haste aquecida foi posicionada perpendicularmente à pele, apoiada em seu próprio peso, estabilizada entre o polegar e o indicador do pesquisador por 10 segundos cronometrados, no intuito de causar duas lesões de queimadura de segundo grau, de tamanho aproximado de 1,0 x1,0, com distância de 2cm entre elas. (Figura 5C).

4.4 Avaliação macroscópica das lesões

O processo de mensuração da retração das feridas iniciou-se junto à confecção das mesmas e foi desenvolvido considerando os episódios de eutanásia programada conforme o mencionado na Figura 1. Desta feita, foram avaliadas 72 feridas iniciais a partir do dia zero (realização as queimaduras) e comparadas com as respectivas evoluções das mesmas considerando os episódios de eutanásia com 4, 8 e 12 dias totalizando 24 feridas por episódio.

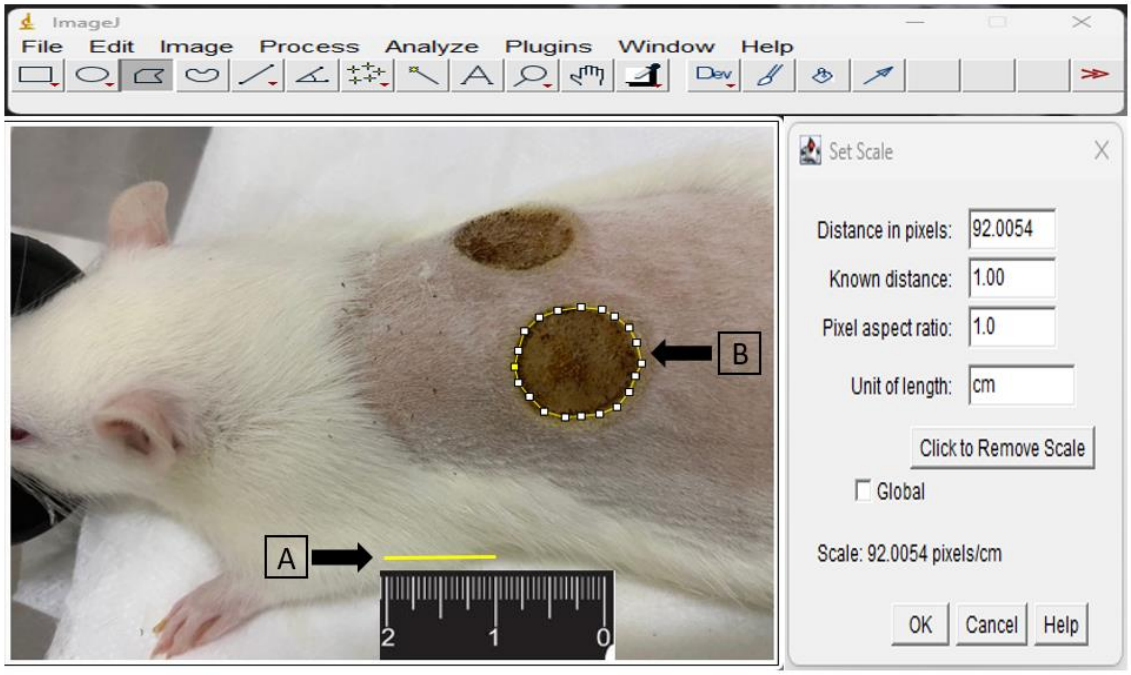
Nos referidos momentos, cada ferida foi fotografada com uma câmera Apple de lente dupla (grande-angular e ultra angular) de 12 MP com zoom óptico de 2x e digital até 5x, Pixels a 100% (grande-angular) e estabilização automática de imagem com imagens capturadas no formato JPEG, sob iluminação artificial e distância padronizada (25 cm).

Por sua vez o cálculo do grau de retração da ferida, os valores foram transformados em porcentagem de acordo com a fórmula:

$$\mathbf{GRF} = \frac{(AIF - AF^{N})}{AIF} \times 100$$

Onde GRF é o grau de retração da ferida; AIF corresponde a área inicial da ferida e consequentemente AF^{N}a área da ferida no dia da fotografia, o N por sua vez correspondendo ao intervalo de tempo em dias entre as imagens (4, 8 e 12 dias respectivamente).

Figura 6- Modelo de utilização do Software ImageJ para determinação da correlação entre tamanho e pixels com escala definida em centímetros (**A).** Onde a mensuração da ferida foi feita através da ferramenta “desenhar losango” (**B).**



Fonte: Próprio pesquisador.

4.5 Avaliação microscópica

As amostras de tecido necessárias para a avaliação histológica foram obtidas e processadas considerando os episódios de eutanásia no 4º 8º e 12º nesta ordem. O intuito deste processo foi o de verificar a evolução das três propostas terapêuticas adotadas como conduta em seus respectivos grupos, partindo da indução das feridas por queimadura considerando seu estadiamento quando da realização das eutanásias.

Mediante tal justificativa, quatro espécimes de cada grupo foram submetidos a eutanásia por meio de sobredose de Isofluorano em concentração elevada dentro de uma caixa de indução, com morte confirmada via abertura da caixa torácica e remoção do coração. Duas amostras de tecido foram colhidas de cada indivíduo, estas sendo compostas por fragmentos retangulares contento a totalidade da lesão e suas respectivas bordas do tecido normal adjacente (0,5 cm de margem), com profundidade correspondendo à dimensão do próprio epitélio.

O processamento dos fragmentos se deu através da identificação e fixação destes em formalina tamponada a 10% por 48 horas, sendo

posteriormente transferidos para uma solução de álcool 70%, onde aguardaram o processamento histológico seguido da inclusão em parafina. Ao termino deste processo foram obtidos dois blocos por indivíduo, totalizando 72 blocos de parafina de onde foram extraídos cortes histológicos de 5 µm, os quais foram distendidos sobre lâminas de vidro e corados através das técnicas de hematoxilina e eosina (HE), para avaliação global dos cortes de tecido, e pelo Tricrômico de Masson (TM), para melhor evidenciação das fibras colágenas existentes bem como os locais de fibrose do interstício.

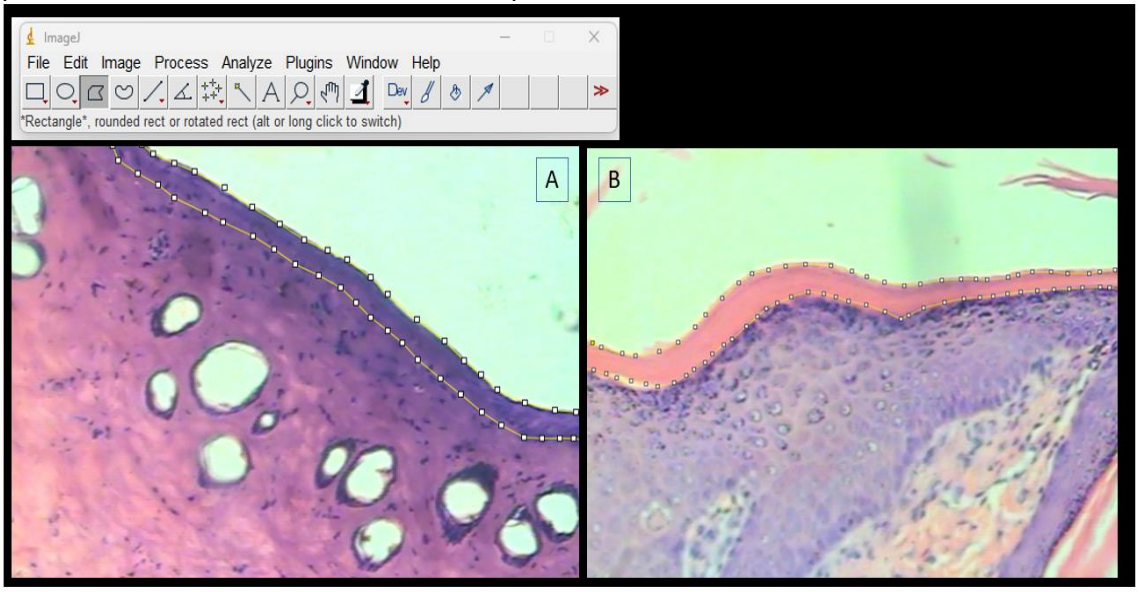
Todo este material foi concebido no intuito de verificar, em termos histológicos in loco, a evolução de alguns dos mecanismos de reparação tecidual como: 1) a migração de células componentes do infiltrado inflamatório frente a uma lesão por queimadura; 2) a consolidação e manutenção de tecido necrótico com subsequente formação de crosta sob a ferida; 3) o processo de neoformação vascular durante a evolução da reação cicatricial; 4) o quantitativo de fibras colágenas produzidas em função da injuria.

Dentro da mesma premissa, foi considerada a necessidade de se avaliar a evolução do Arcabouço Extra Celular (AEC), que de acordo com Sanguanini et al (2021), pode ser classificado atribuindo-se a métrica de um a três, onde: 1- corresponderia AEC vascular ou seja, apresentando neoformação vascular evidente, presença de fibroblastos imaturos, com deposição esparsa de fibras colágenas com aspecto ondulado; 2- indicando AEC fibrovascular apresentando vasos neoformados porém caracterizando-se também pela presença de fibroblastos imaturos e maduros, deposição moderada de fibras colágenas mais agrupadas e eosinofílicas; 3- AEC fibroso, com ampla deposição de fibras colágenas eosinofílicas de constituição espessa e compacta, apresentando fibroblastos maduros e pouco vascularizado.

Especificamente no intuito de se avaliar o processo de neoformação vascular, foi feita abordagem quantitativa simples calculando-se, mediante contagem por sítio, a média de vasos sanguíneos presentes em4 campos por lâmina à objetiva de 100µm, onde foram considerados o agrupamento de hemácias e presença de estruturas tubulares correspondentes a vasos sanguíneos, sendo excluídas células avulsas e acúmulos com características de extravasamento local e/ou hematomas, conforme os critérios adaptados de Valacchi *et al*. (2011) e Sanguanini *et al.* (2021).

Variáveis como presença de edema, infiltrado inflamatório polimorfonuclear, mononuclear, foram classificadas em ausentes, quando ainda não eram visibilizadas no campo óptico (0); discretas, quando eram localizadas de forma esparsa ou isolada, com muitas áreas livres de infiltrados (1); moderada, quando já eram visibilizadas formando agregados, porém com áreas adjacentes livres de infiltrados (2); acentuada, quando estas células apareciam com grande frequência (3).

Figura 7- Modelo de utilização do Software ImageJ para mensuração das áreas de acantose (**A**) e a formação de crosta (**B**) imagens obtidas em aumento de 40µm (correlação entre tamanho e pixels com escala definida em micrômetros).



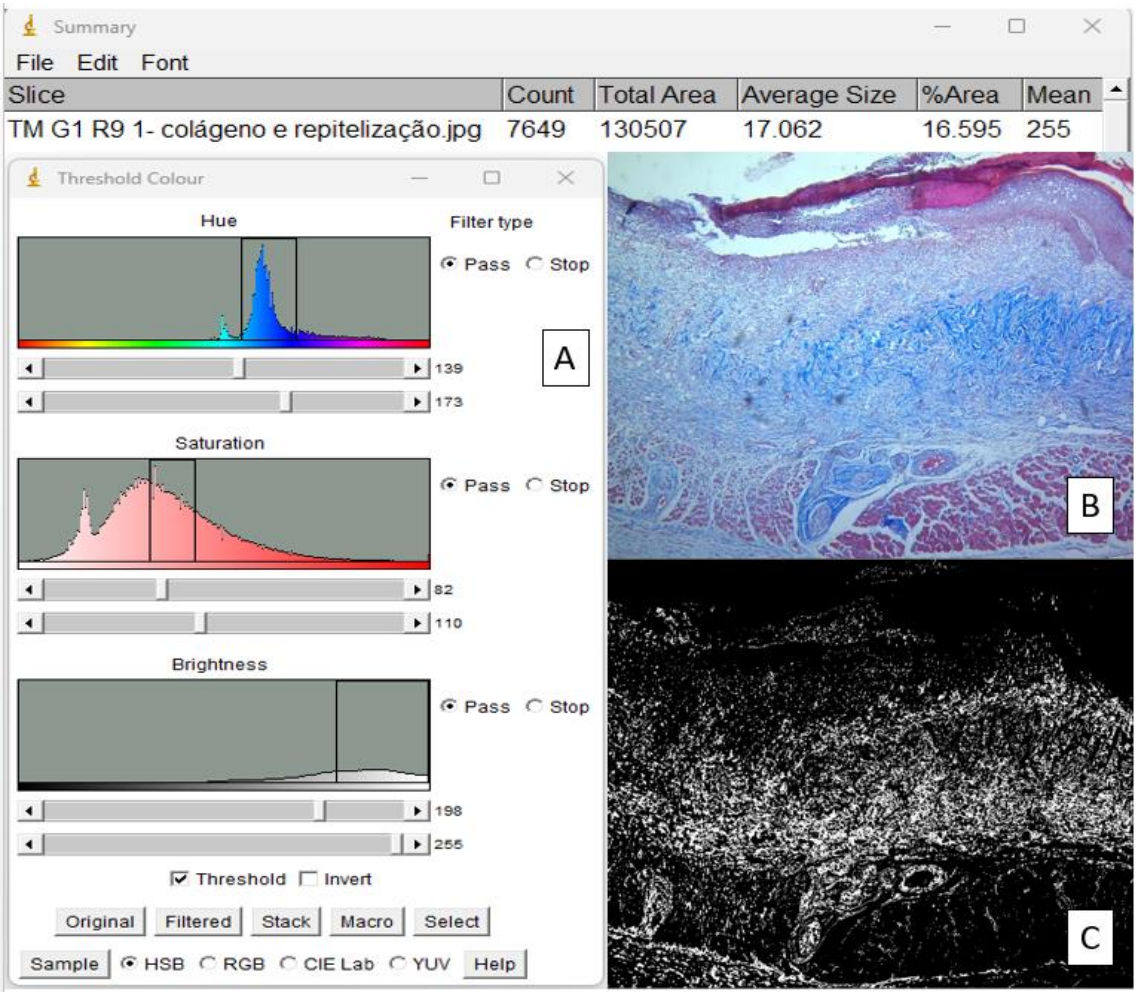
Fonte: Próprio pesquisador.

Por sua vez a presença e formação de acantose assim como a de crosta foram mensuradas quanto ao tamanho e espessura na região afetada mediante delimitação das áreas envolvidas e comparação entre os achados histológicos (Figura 7). Vale ressaltar que, com exceção da quantificação do colágeno, a avaliação do infiltrado inflamatório, do perfil extracelular bem como a observação e pontuação dos sítios ne neoformação vascular foram realizados mediante o cegamento do examinador, visto que este não tinha conhecimento das propostas terapêuticas utilizadas nos respectivos grupos durante a análise das peças histológicas.

O Tricrômico de Masson (TM) é uma técnica de coloração histológica relativamente simples, porém eficaz para avaliar a produção de colágeno em tecidos, incluindo lesões e ferimentos, sendo capaz de diferenciar o colágeno,

corado pela imersão em ácido pícrico e azul de anilina, de outras estruturas celulares, como o núcleo (corado em preto) e o citoplasma (corado em vermelho).

Figura 8- Modelo de utilização do Software ImageJ para a morfometria das fibras colágenas onde observa-se a segmentação (**A**); A imagem inicial de uma lâmina histológica corada com TM(**B**); Imagem binária final em 8 bits (**C**).



Fonte: Próprio pesquisador.

Considerando tais premissas, as lâminas com os cortes histológicos corados foram submetidas a avaliação microscópica no intuito de obtenção das imagens para fins comparação. Por sua vez a quantificação do colágeno presente nas secções avaliadas foi determinada via morfometria com o auxílio também do software ImageJ, onde a presença e a área ocupada por fibras colágenas foi comparada à área total da amostra, (Figura 8A). Vale ressaltar que tal conduta possibilita também a observação da qualidade do colágeno produzido, através a avaliação da espessura, organização das fibras além da

presença de demais estruturas como vasos sanguíneos e células inflamatórias (Rezende *et al*., 2020).

Em relação a presença, quantificação e avaliação morfométrica das fibras colágenas a utilização do software ImageJ configura-se como ferramenta poderosa e gratuita para análise de imagens, amplamente utilizado na histologia. Através do processo de segmentação (Thresholding), foi possível separar as estruturas presentes nas fotografias digitalizadas obtidas a partir lâminas histológicas, cabendo a ressalva de que em função do fracionamento todas as imagens avaliadas foram convertidas no formato de 8 bits e sumarizadas, (Figura 8C).

Após o processamento das imagens avaliadas as mesmas apresentaram coloração e aspecto binário (preto e branco), onde as áreas brancas corresponderão às áreas repletas de colágeno. Durante este processo o software ImageJ fornece uma tabela de valores contendo a área total, média e já apresentando os respectivos valores área calculados na forma de porcentagem. Uma das vantagens de se utilizar do TM na avaliação histológica dos ferimentos é que a coloração permite identificar a fase da cicatrização em que se encontra a lesão, observando a predominância de células inflamatórias, fibroblastos ou fibras colágenas, também pode ser observada a evolução e maturação da cicatriz já que a organização e a espessura das fibras colágenas indicam o grau de maturação da mesma (Miot e Brianezi, 2010).

4.6 Análise estatística

As informações coletadas foram organizadas em um banco de dados em formato Excel, submetidos a análise descritiva e inferencial pelo programa Bio Estat 5.3 (Sociedade Mamirauá, Belém/Pará/Brasil). O nível de significância adotado foi de 5%.

As variáveis quantitativas foram apresentadas pela média calculada e desvio padrão (DP). Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste t ou Dunnet, após a checagem da normalidade da distribuição pelo Coeficiente de Variação e Teste de Lilliefors. Especificamente para as variáveis quantitativas apresentadas na forma de escores, utilizou-se do teste não-paramétrico de Kruskal Wallis associando este ao teste de Dunn.

5. RESULTADOS

5.1 Monitoramento do modelo animal

Segundo a Tabela 1, ao avaliar o peso final menos o peso inicial dos ratos, houve diferença estatisticamente significativa no G3 na comparação dos momentos do experimento, sendo que a maior diferença média ocorreu aos 4 dias, seguido do valor aos 12 dias e a menor diferença aos 8 dias do experimento. No período de 12 dias, ao comparar os grupos, houve maior diferença média no G3 (p<0,001), seguido do G2 e o menor no G1, fato que leva a crer que o uso do ozônio isolado interferiu no ganho de peso dos animais do G3.

Tabela 1: – Diferença entre o peso inicial e final (média ± desvio padrão/DP) dos ratos segundo grupos do experimento e tempo em dias.

Grupos	4 dias		8 dias		12 dias		*p*-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
G1	7,6	4,6	8,2	7,2	* 5,5	0,9	0,131
G2	48,3	48,1	26,8	13,3	** 18,8	7,6	0,102
G3	[a] 46,4	12,0	[b] 19,7	11,3	*** [c] 32,2	4,8	**<0,001**
***p*-valor**	0,738		0,376		**0,014**		-

Nota: teste ANOVA seguido do teste de *t*, *p*-valor≤0,05 (em negrito) e letras diferentes nas linhas indicam que há diferença estatisticamente significativa. Nas colunas, ao invés de letras, foram utilizados asteriscos, sendo a quantidade diferente indicativa de diferença estatística.

Tendo por base que as lesões induzidas nos modelos animais invariavelmente apresentaram tamanho médio inicial de 0,78 cm^2, (Área da circunferência = $\pi \times r^2$) foi observado que, entre a confecção das lesões e a primeira eutanásia, houve um discreto aumento no tamanho das feridas, porém este regrediu à medida que o processo de cicatrização evoluía. As mensurações submetidas à morfometria evidenciaram uma retração do ferimento mais efetiva nos animais do Grupo 2, em relação aos dos outros grupos (Figura 6).

5.2 Evolução do processo cicatricial

A evolução do processo de reparação tecidual não ocorreu de forma uniforme, o tamanho inicial das lesões quando comparado com as respectivas mensurações obtidas após a primeira eutanásia (4º dia), evidenciou um aumento de tamanho das mesmas, sendo que tais valores foram reduzindo na medida que o processo de reparação tecidual avançava (dias 8 e 12 respectivamente).

Em relação à diferença entre o tamanho inicial e final da lesão em cm (Tabela 2), no lado direito houve diferença entre os momentos do experimento apenas para o G3, sendo maior aos 8 dias em comparação aos 4 e 12 dias, estes últimos iguais. No lado esquerdo, no G2, menor aos 4 dias em comparação a 8 e 12 dias, estes últimos iguais. Já o G3 apresentou valores mais expressivos aos 8 dias ($p \leq 0,05$), em comparação aos 4 e 12 dias, estes últimos iguais, a avaliação isolada de cada momento do experimento, revelou não ter havido diferença significativa entre os grupos do estudo.

Tabela 2: – Diferença entre o tamanho inicial e final da lesão em cm (média ± desvio padrão/DP) dos ratos segundo lado do corpo, grupos do experimento e tempo em dias.

Grupos	4 dias		8 dias		12 dias		*p*-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Lado direito							
G1	0,23	0,10	0,35	0,13	0,25	0,06	0,219
G2	0,15	0,06	0,30	0,08	0,28	0,13	0,100
G3	[a] 0,15	0,06	[b] 0,38	0,13	[a] 0,15	0,06	**0,007**
***p*-valor**	0,291		0,657		0,152		-
Lado esquerdo							
G1	0,30	0,14	0,40	0,14	0,30	0,08	0,541
G2	[a] 0,15	0,06	[b] 0,38	0,13	[b] 0,38	0,10	**0,014**
G3	[a] 0,20	0,05	[b] 0,40	0,05	[a] 0,30	0,05	**0,001**
***p*-valor**	0,127		0,826		0,224		-

Nota: teste ANOVA seguido do teste de *t*, *p*-valor≤0,05 (em negrito) e letras diferentes nas linhas indicam que há diferença estatisticamente significativa.

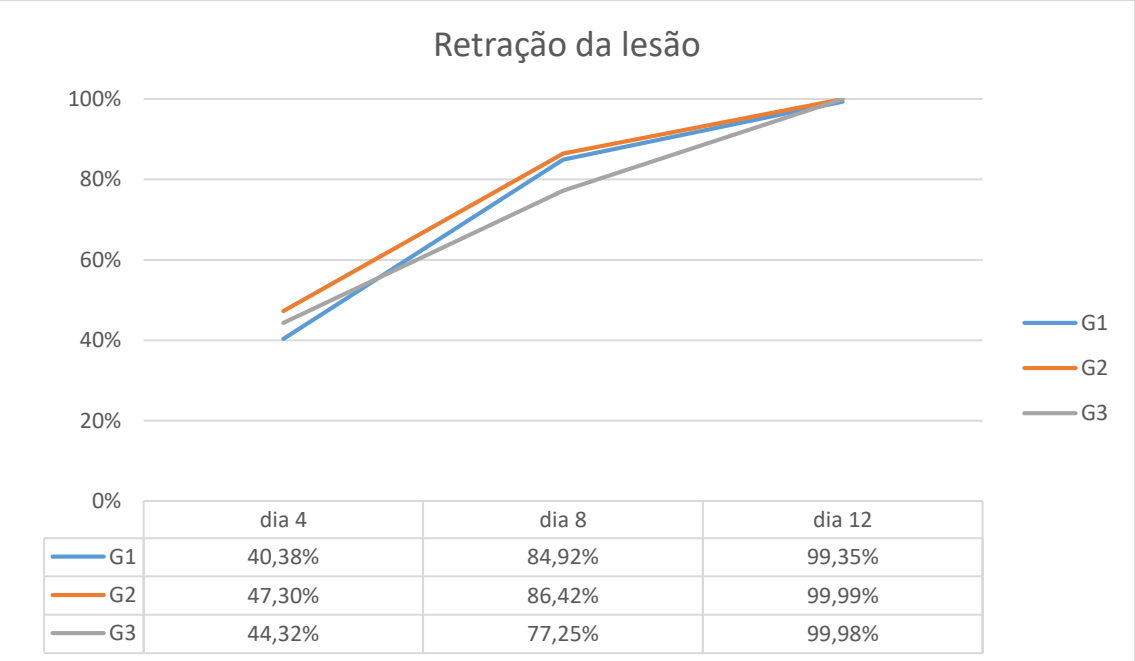
Tal informação fica mais evidente quando expostas na estrutura de gráfico, podendo-se observar a evolução das diferentes propostas terapêuticas entre si com diferenciação pouco expressiva, com discreta vantagem dos animais do G2 sobre os demais grupos, cabendo a ressalva de que os valores decorrentes da morfometria tendem a equiparar-se na medida em que o processo de reparação tecidual progride juntamente com as condutas terapêuticas até o término do estudo (Figura 8).

A formação e a evolução da crosta cicatricial podem ser acompanhadas pelas amostras de imagens da (Figura 9), onde os elementos do G1 apresentaram estrutura mais rígida e uniforme recobrindo o ferimento. Por sua vez os animais do G2 e G3 apresentaram crostas mais maleáveis e de coloração amarelada, entretanto efetivas quanto a proteção e ao vedamento das feridas. Vale ressaltar que os elementos tratados com o óleo ozonizado apresentaram o

crescimento mais expressivo dos pelos na região tricotomizada, em alguns casos sendo necessária nova remoção dos pelos locais previamente à biopsia.

Ainda de acordo com a Figura 8, a retração da lesão ocorreu de forma diretamente proporcional à evolução cronológica do experimento, atingindo seus valores mais significativos nos animais avaliados ao término dos 12 dias. Ao comparar os grupos entre si, não houveram diferenças significativa entre o quarto e oitavo dia, consequentemente as aferições do 12º dia também não revelaram alterações significativa entre G2 e G3, apesar destes apresentarem retração maior da lesão em comparação ao G1.

Figura 8- Evolução gráfica do percentual de retração das lesões de queimadura nos grupos do experimento considerando intervalos de tempo de 4,8 e 12 dias.

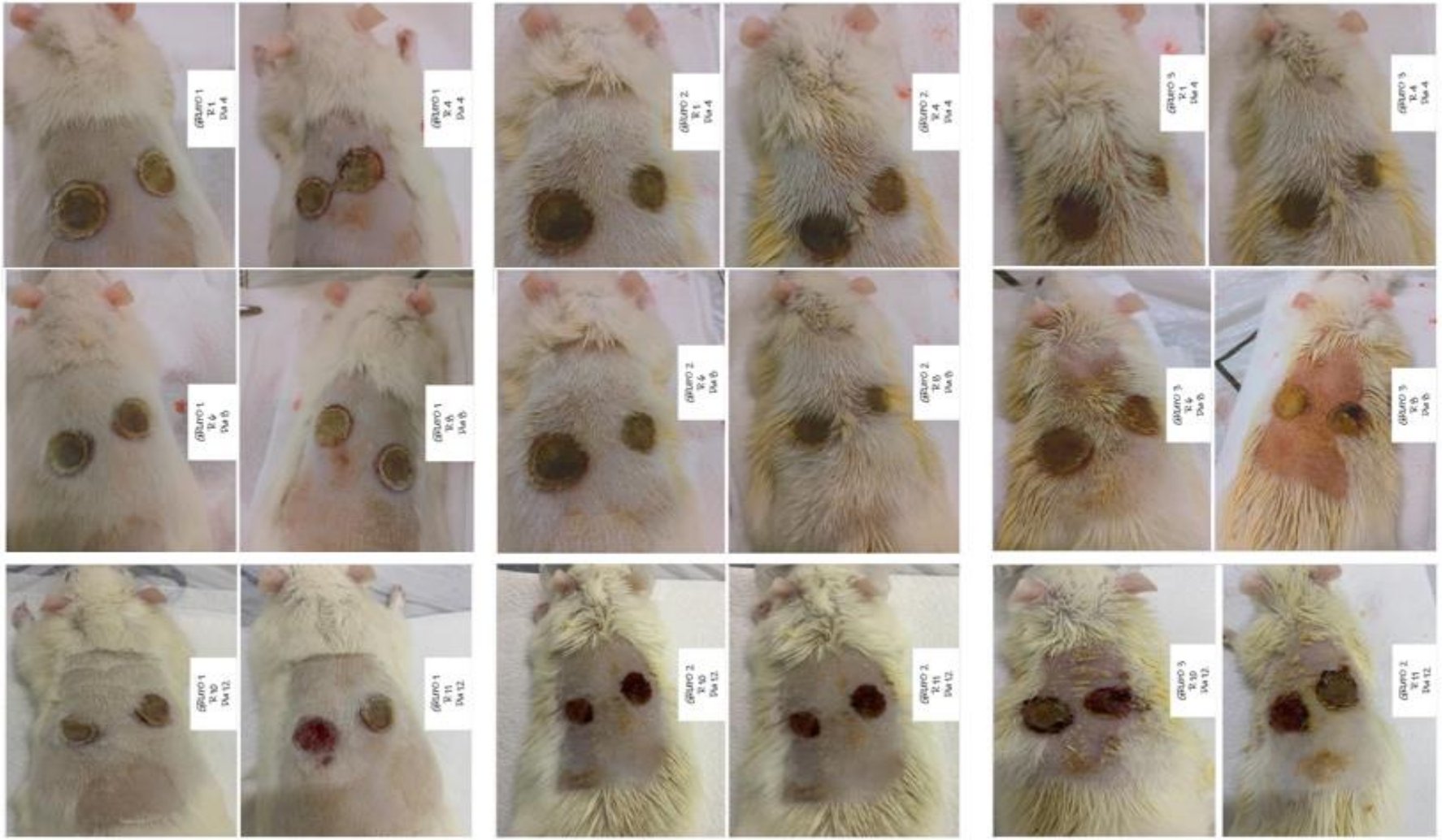


	dia 4	dia 8	dia 12
G1	40,38%	84,92%	99,35%
G2	47,30%	86,42%	99,99%
G3	44,32%	77,25%	99,98%

Teste ANOVA seguido do teste de Dunnett, *p*-valor≤0,05 (em negrito) indica que há diferença estatisticamente: 4 dias *p*=0,553 (G1=G2=G3); 8 dias p=0,074 (G1=G2=G3); 12 dias ***p*<0,001** (G1≠G2=G3); G1 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias); G2 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias); G3 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias).

Tanto os dados da Tabela 2, quanto as imagens da Figura 9 chamam a atenção para a evolução mais morosa da retração do ferimento do Grupo 3 do 4º para o 8º dia em relação aos demais grupos. Porém com a evolução do experimento todos os três grupos apresentaram valores de retração da lesão de queimadura muito próximos entre si.

Figura 9- Avaliação do processo macroscópico de reparação tecidual onde a primeira fileira corresponde a eutanásia do 4º dia com amostras separadas por grupos (G1, G2 e G3 da esquerda par a direita) sendo a segunda e a terceira fileiras correspondendo ao 8º e 12º dia respectivamente.



6.3 Avaliação Histológica

Tabela 3- Avaliação microscópica (média ± desvio padrão/DP) dos ratos segundo grupos do experimento e tempo em dias.

Grupos	4 dias		8 dias		12 dias		*p*-valor
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Edema							
G1	^{*a}2,25	0,46	^{a}1,38	0,52	^{b}0,00	0,00	**<0,001**
G2	^{**a}2,75	0,46	^{a}1,63	0,52	^{b}0,13	0,35	**<0,001**
G3	^{**a}3,00	0,00	^{a}1,63	0,52	^{b}0,25	0,46	**<0,001**
***p*-valor**	**0,007**		0,526		0,697		-
Acantose							
G1	^{a}0,00	0,00	^{b}1,00	0,00	^{b}1,00	0,00	**<0,001**
G2	^{a}0,00	0,00	^{b}1,00	0,00	^{b}1,00	0,00	**<0,001**
G3	^{a}0,00	0,00	^{b}1,00	0,00	^{b}1,00	0,00	**<0,001**
***p*-valor**	1,000		1,000		1,000		-
Perfil Extracelular							
G1	^{a}1,00	0,00	^{b}2,00	0,00	^{b}1,75	0,46	**<0,001**
G2	^{a}1,00	0,00	^{b}2,00	0,00	^{b}2,00	0,00	**<0,001**
G3	^{a}1,00	0,00	^{b}2,00	0,00	^{b}2,00	0,00	**<0,001**
***p*-valor**	1,000		1,000		0,124		-
PMN (1)							
G1	^{a}3,00	0,00	^{b}1,00	0,00	^{b}0,00	0,00	**<0,001**
G2	^{a}3,00	0,00	^{b}1,00	0,00	^{b}0,00	0,00	**<0,001**
G3	^{a}3,00	0,00	^{b}1,00	0,00	^{b}0,00	0,00	**<0,001**
***p*-valor**	1,000		1,000		1,000		-
MN (2)							
G1	^{a}1,00	0,00	^{a}0,75	0,46	^{b}0,00	0,00	**<0,001**
G2	^{a}1,00	0,00	^{a}0,75	0,46	^{b}0,00	0,00	**<0,001**
G3	^{a}1,00	0,00	^{a}1,00	0,00	^{b}0,00	0,00	**<0,001**
***p*-valor**	1,000		0,320		1,000		-
Reepitelização							
G1	^{*a}0,63	0,52	^{*b}2,00	0,00	^{*b}3,00	0,00	**<0,001**
G2	^{*a}1,00	0,00	^{*b}2,00	0,00	^{*b}3,00	0,00	**<0,001**
G3	^{**a}0,00	0,00	^{**b}1,50	0,53	^{**b}2,63	0,52	**<0,001**
***p*-valor**	**<0,001**		**0,010**		**0,037**		-

Nota: teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn, *p*-valor≤0,05 (em negrito) e letras diferentes nas linhas indicam que há diferença estatisticamente significativa. Nas colunas, ao invés de letras, foram utilizados asteriscos, sendo a quantidade diferente indicativa de diferença estatística. (1) infiltrados inflamatórios de polimorfonucleares. (2) infiltrados inflamatórios de mononucleares.

Dados referentes ao perfil do infiltrado inflamatório, podem ser observados na Tabela 3, onde independendo do grupo avaliado, a evolução do processo cicatricial coincide com a redução de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, por sua vez a não cronicidade da lesão por queimadura não justificaria a instalação e permanência de um infiltrado mononuclear, fato observado em todos os grupos, cabendo a ressalva de que os grupos tratados

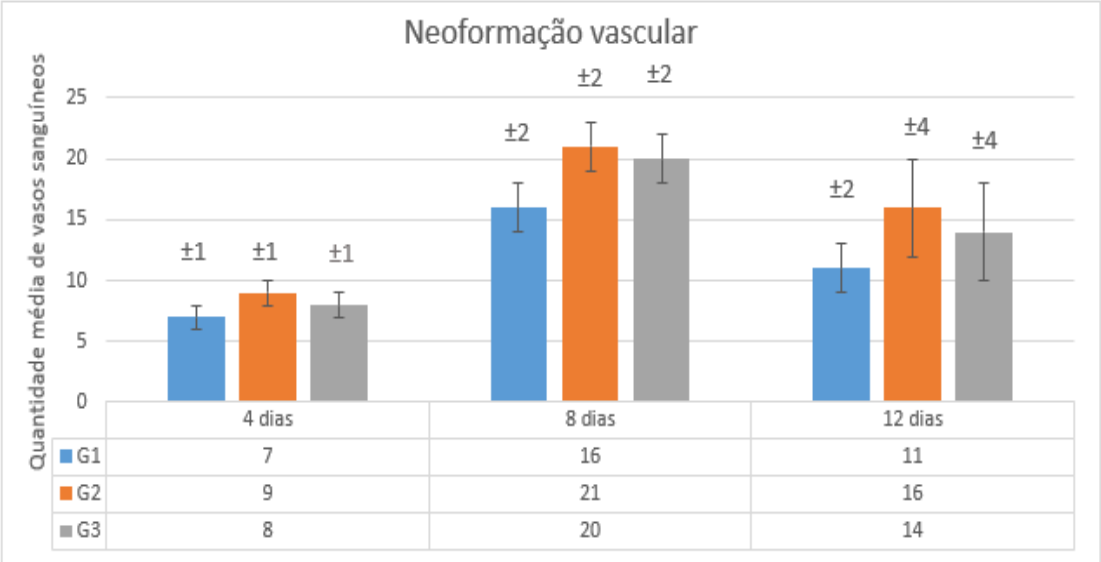
somente com compostos ozonizados apresentaram, na primeira fase do experimento, episódios de edema residual discretos porém perceptíveis. A progressão histológica do processo de reepitelização também pode ser observada na Tabela 3, juntamente com os valores referentes às manifestações de episódios de hiperplasia epidérmica também conhecida como acantose, microscopicamente perceptível pelo aumento da espessura da epiderme, sendo característica comum de processos inflamatório mais agressivos.

Durante a evolução do experimento, observou-se a diminuição do edema, aumento de acantose, melhora do perfil extracelular, diminuição de PMN e MN e aumento de reepitelização. Ao comparar os grupos entre si, houve maior edema no G3, seguido do G2 e menor em G1 no quarto dia do experimento, sem diferença estatística nos outros tempos. A reepitelização foi menor no G3, e o G2 foi igual ao G1 em todos os momentos do experimento (Tabela 3).

Os grupos tratados com o composto oleico ozonizado apresentaram valores médios maiores de estruturas vasculares neoformadas em relação ao grupo tratado exclusivamente com sulfatizada de prata durante a avaliação histológica, cabendo a ressalva de que todos os três grupos avaliados apresentaram redução do quantitativo de vasos contabilizados no advento da terceira eutanásia (12º dia), considerando-se portanto o intervalo de 8 dias para o ápice da manifestação do estimulo da angiogênese conforme demonstrado pela Figura 10.

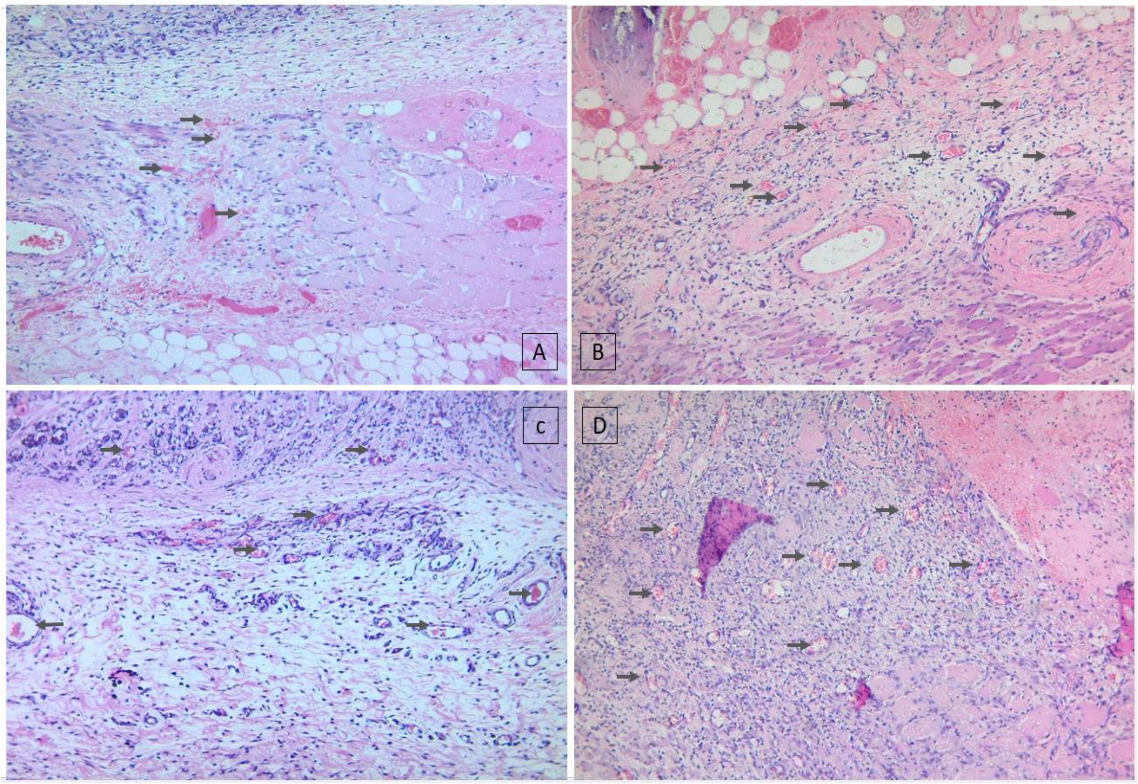
De acordo com a Figura 10, em todos os grupos houve aumento dos valores médios de colágeno à medida que aumentou o tempo do experimento (maiores valores aos 12 dias). Ao comparar os grupos entre si, não houve diferença no quarto dia; no oitavo dia, o G2 e G3 apresentaram valores médios maiores de colágeno; e no décimo segundo dia, o G2 apresentou valores médios maiores que os demais grupos.

Figura 10- Média ± desvio padrão da quantidade de vasos sanguíneos na neoformação vascular segundo os grupos do experimento e tempo em dias.



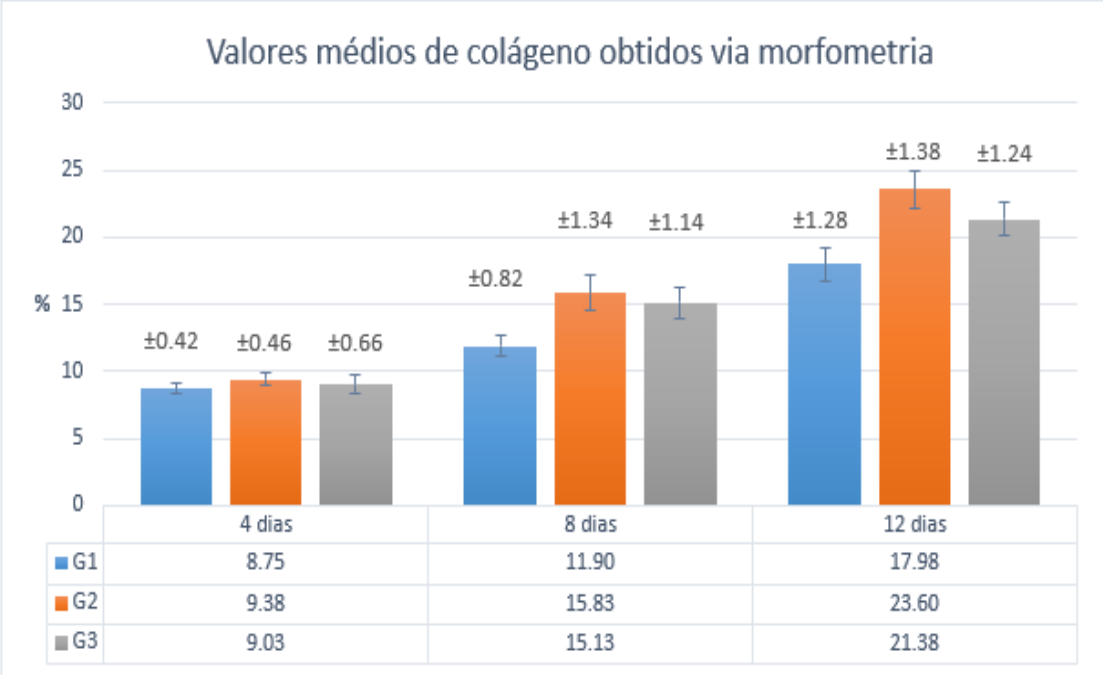
Teste ANOVA seguido do teste de *t* ou Dunnett, *p*-valor≤0,05 (em negrito) indica que há diferença estatisticamente: 4 dias ***p* = 0,001** (G1≠G2≠G3); 8 dias ***p*<0,001** (G1≠G2≠G3); 12 dias ***p* = 0,022** (G1≠G2=G3); G1 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias); G2 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias); G3 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias). O Teste de Dunnett foi realizado nos dois últimos valores de *p*.

Figura 11- Fotomicrografias (100 µm) de secção da lesão de pele dos grupos G1 (**A**), G2 (**B** e **C**) e G3 (**D**), respectivamente, ao 12º dia após a indução de queimadura mostrando a neoformação vascular (setas). Onde (**A**) manifesta neoformação discreta, (**B**), (**C**) e (**D**) neovascularização acentuada HE.



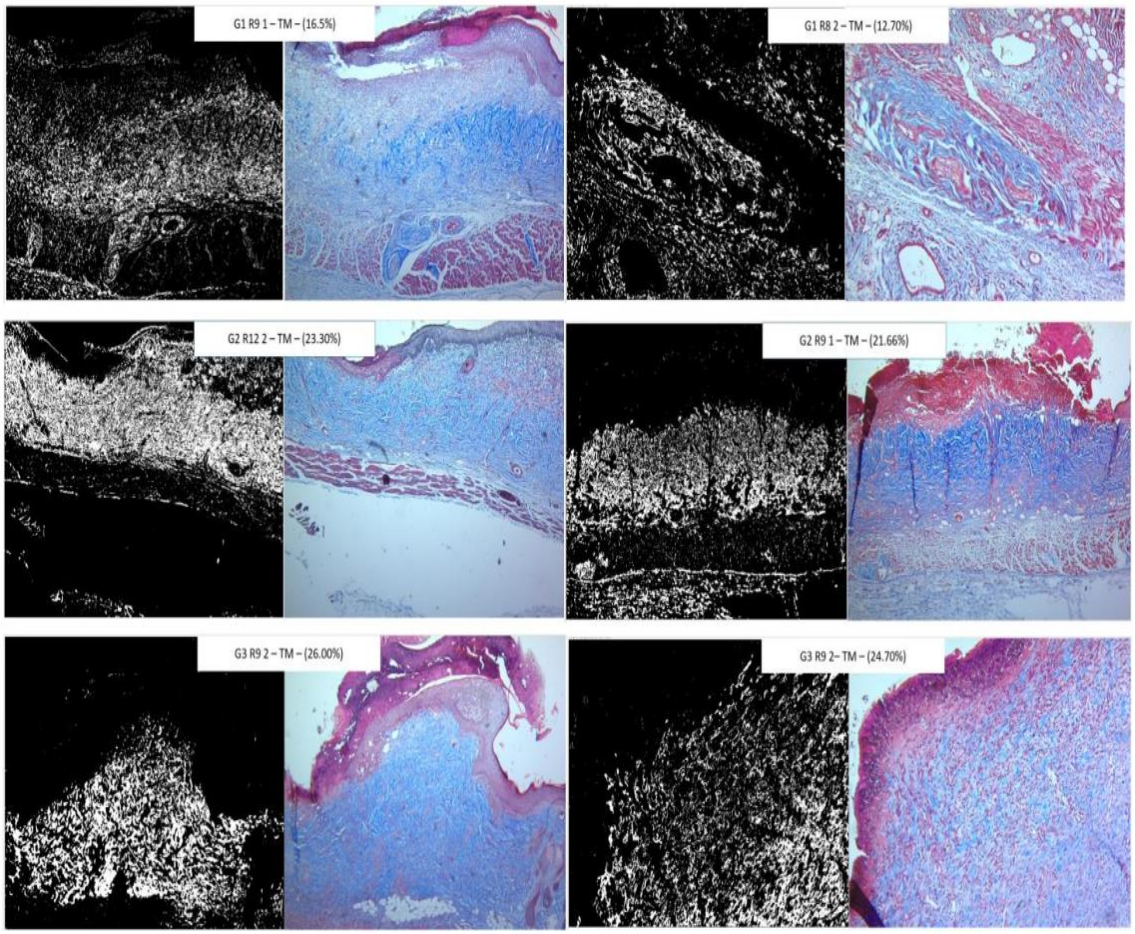
O resultado da avaliação morfométrica das imagens obtidas a partir de laminas coradas com TM foram calculadas em valores percentuais conforme a disposição da Figura 10. Os grupos tratados com óleo ozonizado (G2 e G3) apresentaram valores discretamente maiores que o G1. Entretanto aqui também foi possível perceber que elementos do G2 tratados com a associação da pomada e do óleo obteve valores maiores dos que se utilizavam destes componentes de forma isolada (p<0,001). A avaliação histológica constatou a formação das fibras colágenas a partir do tecido sadio, com o ferimento sendo preenchido gradativamente durante a evolução do processo reparador, cabendo a ressalva de que a metodologia adotada para a detecção do colágeno neste inquérito não possibilita a diferenciação entre os colágenos do tipo I e III.

Figura 12- Média ± desvio padrão dos valores de colágeno obtidos via morfometria segundo grupos do experimento e tempo em dias.



Teste ANOVA seguido do teste de t, p-valor≤0,05 (em negrito) indica que há diferença estatisticamente: 4 dias p=0,286 (G1=G2=G3); 8 dias ***p*=0,002** (G1≠G2=G3); 12 dias ***p*<0,001** (G1≠G2≠G3); G1 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias); G2 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias); G3 ***p*<0,001** (4≠8≠12 dias).

Figura 13- Fotomicrografias (100 µm) de secção da lesão de pele dos grupos G1, G2 e G3 respectivamente, ao 12º dia após a indução de queimadura submetidas à morfometria via software ImageJ, através do tratamento, ajuste para 8 bits e binarização, onde as estruturas coradas de branco correspondem às fibras colágenas (seus respectivos percentuais já calculados pelo próprio software) Coloração TM.



6. DISCUSSÃO

A escolha da temperatura limite de 100º Celcius,como base para indução de feridas neste modelo experimental, foi pensada mediante a necessidade de manutenção de um arcabouço celular minimamente sadio. Sob tais circunstancias foi possível avaliar, durante a evolução da reparação tecidual, fenomenos como a acantose o desenvolvimento e a consolidação da crosta nos ferimentos (Campelo *et al.,* 2011).

Apesar de identificado durante a avaliação histológica, o processo de formação de acantose, ou a proliferação da camada espinhosa do epitélio, não é ùnico e esclusivamente associado às lesões térmicas, a simples ruptura da continuidade da derme pode alterar significativamente a resposta inflamatória oriunda deste processo (Toyama *et al*., 2021). De acordo com os achados histológicos no presente levantamento, não foram identificados valores significativos paras quaisquer das propostas terapeuticas adotadas na melhoria tecidual in loco, por outro lado a remodelação da referida camada espinhosa transcorreu de forma praticamente idêntica em todos os grupos do experimento (Tabela 3).

Durante a avaliação macroscópica para verificar a redução do tamanho da ferida, o estudo morfométrico das lesões não obteve valores significativos quanto ao perfil cicatricial entre o grupo controle e grupos tratados com o O_3. Durante a análise estatística deste quesito, os valores médios obtidos por grupo não foram capazes de assegurar significância entre as amostras em seus respectivos grupos. Em estudo semelhante, Pai *et al*., (2014), mencionam que os resultados não expressivos na redução das lesões podem ser atribuídos às concentrações do gás, mais especificamente para valores menores ou iguais a 500 mEq/kg de peróxidos.

Os achados de Sanguanini *et al.,* (2020), corroboram com tal afirmação, visto que esbarraram em resultados pouco expressivos quanto aos valores de retração da ferida em comparação com os grupos não tratados com O_3. Outro estudo também sugere que os resultados inexpressivos de cicatrização, obtidos mesmo com a utilização do ozônio, podem ter sido limitados em decorrência da concentração de peróxidos no veículo utilizado, visto que valores inferiores a 400 mEq/kg ou superiores a 1500 mEq/kg tendem a não exercer influência estatisticamente relevante no que diz respeito ao processo de retração das

feridas (Fitzpatrick *et al.*, 2018). Por outro lado, a literatura consultada refere como ideal, no que diz respeito aos óleos ozonizados, concentrações entre 500 a 1500 mEq/kg de peróxidos, reiterando que estas também são capazes de promover episódios mais intensos de neoformação vascular (Zeng *et al*., 2018; Sanguanini *et al.,* 2020).

O critério comportamental dos animais nos grupos que foram tratados com compostos oleicos deve ser levado em consideração, especificamente no que tange o menor desempenho da retração da ferida dos mesmos, visto que foi observado, como fator de interferência, que a permanência do óleo sobre os ferimentos, pele e pelos adjacentes, induziram ao prolongamento e a maior intensidade do comportamento de auto higiene (Sanguanini *et al.,* 2020). Ainda somado a este fator, vale ressaltar que o odor marcante dos óleos ozonizados não passaria desapercebido pelo olfato dos animais alocados nos respectivos grupos podendo, portanto, também ser considerado como uma variável digna de nota.

Em linhas gerais existe um mérito na utilização dos modelos animais para o estudo de condutas terapêuticas, consagradas ou não pela literatura, seja em tratamentos principais ou adjuvantes, em especial considerando-se o grau de morbidade das lesões provocadas por queimaduras, onde configura-se a busca por propostas mais assertivas no que diz respeito à otimização do processo de cicatrização, redução do tempo do processo como um todo e consequentemente a melhoria do quadro geral do paciente (Campelo, 2011; Tiwari, 2012).

Invariavelmente as lesões por queimadura tem um caminho diferenciado no que diz respeito ao seu processo de reparação, pacientes expostos a injurias térmicas apresentam desafios únicos como lidar com processos de necrose já instalados e respostas inflamatórias exacerbadas, nem sempre condizentes com sua etiológia primária (Rowan *et al.,* 2015).

A reepitelização e o consequente fechamento da ferida se dá pela ativação de queratinócitos e fibroblastos, via de regra tal processo é mediado por citocinas recrutadas na fase inflamatória, apesar de necessário para a cicatrização de feridas a inflamação, exacerbada e generalizada é característica dos episódios envolvendo queimaduras sendo comumente associada ao comprometimento da homeostasia do indivíduo queimado, episódios de edema danosos ao epitélio e cicatrização hipertrófica. Ainda existindo o agravamento de

que os tratamentos anti-inflamatórios convencionais podem potencialmente exacerbar os sintomas e atrasar o reparo tecidual de forma significativa (Shih et al, 2010; Rowan *et al.,* 2015).

A literatura consultada manifesta certa segurança quando da indicação dos compostos oleicos ozonizados como conduta terapêutica dermatológica, seu uso em afecções e infecções dos tecidos epiteliais, tem mostrado resultados significativamente promissores. Dentro deste contexto, estudos que se utilizaram de modelos animais para verificar a eficácia destes óleos ressaltam sua interação favorável durante o processo de cicatrização e reparação tecidual (Lu, *et al.,* 2023; Soares *et al.,* 2019; Valacchi *et al.,* 2011). Correlacionando ainda de forma mais específica, a atuação destas substâncias como promotoras de melhoria significativa no processo de angiogênese junto às áreas tratadas (Lima *et al.*, 2022; Sanguanini *et al.*, 2020).

Foram encontrados valores significativos quanto a neoformação vascular onde ambos os grupos tratados com compostos ozonizados (G2 e G3) apresentaram manifestação mais expressiva da angiogênese in loco, a partir da avaliação histológica mais especificamente nas amostras colhidas entre o 8º e o 12º dia. Diferentes estudos de metodologia heteróloga realizados em modelos animais, chegaram a conclusões semelhantes quanto ao potencial reparador dos compostos ozonizados (Lu *et al.,* 2023; Lima *et al.,* 2022; Soares *et al.,* 2019). Já Valacchi *et al.* (2011), observaram que ao avaliarem a taxa de fechamento de feridas, se utilizando de parâmetros histológicos e de fatores de crescimento endotelial vascular, notaram resposta mais precoce e maior envolvimento das células no processo de reparação das feridas, através do incremento do crescimento endotelial e da constatação do estímulo perceptível de neoformação vascular mediante o uso de óleo de gergelim ozonizado na cicatrização de feridas cutâneas.

Com o mesmo intuito, porém sob a perspectiva das interações celulares Lu *et al.* (2023), observaram que durante o tratamento de feridas crônicas, o óleo ozonizado tópico acelerou a reparação as mesmas aumentando a fosforilação do fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF1R), do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e também do fator endotelial vascular (VEGFR). Os autores ainda ressaltam que a exposição de queratinócitos epidérmicos normais a um meio ozonizado aumentou a proliferação celular e a distância de

migração de compostos proteicos associados a quinase B e demais quinases reguladas por sinal extracelular, tais constatações além de esclarecer o mecanismo de ação do ozono tópico em feridas crónicas corroboram para sua potencial aplicação terapêutica.

Considerando também a angiogênese como critério para constatação da eficácia do processo de cicatrização Soares *et al*. (2019), procuraram estabelecer a influência do aporte de O_3 in loco nos padrões de expressão do Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF2), bem como a diferenciação miofibroblástica durante a cicatrização de feridas induzidas em modelo animal. Dentro deste contexto, durante a avaliação dos cortes histológicos obtidos no decorrer do estudo, a atuação dos fibroblastos foi avaliada somente pela participação destes na produção do colágeno e na manutenção do perfil extracelular junto ao tecido conjuntivo. Especificamente neste quesito, os animais do G2 e G3 obtiveram resultados mais expressivos, fato que corrobora para assegurar como positiva a interação do Ozônio junto aos tecidos lesados tanto na fase aguda quanto na crônica no decorrer do processo de cicatrização.

A literatura também atribui ao fenômeno do pré-condicionamento tecidual, decorrente da exposição das áreas afetadas a compostos ricos em O_3, uma resposta melhorada do arcabouço celular envolvido no processo de cicatrização, onde uma das principais características desta atuação prévia seria uma melhor interação entre os tecidos e as estruturas vasculares adjacentes (Thorp e Thorp, 2021). Fato que poderia justificar o melhor desempenho nas respostas celulares constatadas junto aos grupos tratados com óleo ozonizado.

Considerando a estrutura da epiderme, composta por várias camadas de queratinócitos, onde estes são responsáveis por restaurar a mesma nos episódios de trauma local num processo conhecido como epitelização, é de bom tom considerar que a capacidade regenerativa da pele depende do arcabouço celular pré-existente. Por sua vez múltiplos reguladores, como fatores de crescimento, citocinas, integrinas, queratinas, MMPs, quimiocinas e matrizes extracelulares modulam a migração de queratinócitos durante o fechamento da ferida, em outras palavras o desencadeamento de um processo inflamatório agudo, as células inflamatórias, desempenham um papel crucial na ativação dos fibroblastos, as células responsáveis pela produção de colágeno (Pastar *et al.,* 2014).

Os valores encontrados referentes à deposição de colágeno durante a avaliação do processo de cicatrização, correspondem ao somatório dos colágenos tipo I e tipo III, estes mais comuns e estão diretamente envolvidos no processo de cicatrização. Sendo o colágeno tipo III o primeiro a ser depositado na ferida, formando uma matriz provisória que permite a proliferação celular e a deposição de outros componentes da matriz extracelular, já o colágeno tipo I deposita-se mais tardiamente, porém compõe a maior parte da cicatriz sendo essencial na remodelação desta (Rowan *et al.,* 2015).

Levando em consideração que o Tricrômico de Mason (TM) é uma técnica de coloração histológica que permite a visualização de diferentes componentes teciduais, como colágeno, músculo e núcleo celular e que apesar de sua versatilidade para a análise histopatológica, aqui cabe a ressalva de que ela não é capaz de diferenciar os tipos de colágeno entre si (Morgan *et al.*, 2022).

A literatura consultada sugere que estudos histológicos visando a observação específica da deposição e orientação das fibras colágenas, devam se utilizar também da microscopia de luz polarizada por intermédio de corantes como o Picrossírius, visto que avaliações morfométricas associadas a esta técnica são capazes de quantificar os diferentes tipos de colágenos de maneira mais assertiva (Wang *et al.*, 2018). Entretanto vale ressaltar que a produção destas proteínas, corresponde como peça fundamental do processo de reepitelização e consolidação do ferimento, por sua vez os valores percentuais do colágeno aferidos pela morfometria pesam a favor da interação positiva do O_3 junto à elaboração destas fibras.

De posse das informações colhidas durante este levantamento, em sua pior performance, os óleos ozonizados podem ser seguramente utilizados como antissépticos locais na prevenção de infecções secundárias, já que seu princípio ativo não induz resistência bacteriana mesmo em casos de uso contínuo (Thomson *et al.*, 2011; Menendez *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2018b). Entretanto considerados os achados deste inquérito, associando-os ao que já se conhece da literatura consultada sobre os compostos oleicos ozonizados, consolidam-se cada vez mais as evidencias favoráveis a utilização destes em feridas cutâneas, seja pela biocompatibilidade e melhora da resposta celular in loco ou pelo favorecimento do processo de reparação tecidual propriamente dito (Valacchi *et al.*, 2011; Sanguanini *et al.*, 2020). Tecidos expostos ao O_3 tendem a manifestar

respostas mais assertivas frente às injurias sofridas, mesmo em caso de lesões por queimaduras, visto que estas geralmente evoluem de forma mais morosa pois o organismo tem de lidar com o colapso do arcabouço tecidual adjacente bem como processos necróticos já instalados.

A não realização de uma avaliação imunohistoquimica dos fragmentos derivados das lesões e a não utilização de técnicas e corantes histológicos de luz polarizada como o Picrossírius por exemplo, pesam como as principais limitações deste levantamento, visto que os dados derivados destas condutas já foram utilizados em modelos animais de indução de ferimentos (Sanguanini *et al.*, 2021). Informações deste montante agregariam valor significativo aos achados deste estudo, tanto no processo de interação celular e mediação da resposta inflamatória quanto na caracterização mais específica das fibras colágenas que participaram da reparação tecidual. Também vale ressaltar que parte da atuação dos compostos ozonizados dá-se através do contato direto com as regiões afetadas sabe-se, porém, que lesões térmicas apresentam em sua região central uma área de coagulação e desnaturação proteica que, dependendo da extensão e profundidade desta, invariavelmente evolui para uma região de necrose, o que limitaria significativamente o potencial de interação do O_3 junto ao ferimento propriamente dito.

Lesões provocadas por queimadura acometendo o epitélio permanecerão como um desafio terapêutico, visto que existe uma significativa gama de variáveis capazes de interferir no processamento destas por parte dos organismos vivos, indo desde a mais comum exacerbação do processo inflamatório ao estimulo exagerado dos queratinócitos acarretando na cicatrização irregular e formação de queloides (SHIH *et al.*, 2010).

Dada a esta condição ímpar e considerando o sucesso já relatado da utilização do O_3 em feridas com potencial de cronicidade (Serra *et al.*, 2023). Os resultados deste inquérito endossam o uso dos compostos oleicos ozonizados no tratamento de lesões de pele provocadas por queimaduras, mesmo que estes não interfiram de forma assertiva na retração dos ferimentos, a disponibilidade de O_3 nos tecidos adjacentes pode favorecer, junto ao arcabouço celular local, respostas celulares mais assertivas interagindo de maneira a acrescer a neoformação vascular e produção de colágeno nas áreas afetadas.

7. CONCLUSÔES

Quando comparado a Sulfadiazina de prata, o do óleo de girassol ozonizado não incorreu em diferença macroscópica significativa no processo de retração das lesões por queimadura, visto que todos os grupos avaliados apresentaram resultados estatisticamente similares entre si, havendo uma melhora discreta quando da associação entre as duas condutas. Por outro lado, a avaliação microscópica constatou potencial de interferência positivo, considerando-se os valores mais promissores referentes à reepitelização, neoformação vascular bem como uma deposição mais perceptível de fibras colágenas nos espécimes tratados com o composto oleico.

Levando em consideração o potencial do stress oxidativo e do pré-condicionamento promovidos pelo ozônio em contato com os tecidos, recomenda-se que estes mecanismos sejam estudados mais a fundo em ensaios mais amplos no intuito consolidar o papel do gás nos processos de reparação do epitélio, em particular no caso de lesões mais severas.

8. REFERÊNCIAS

1. ANZOLIN, Ana Paula *et al*. Effectiveness of topical ozonated oil in severe osteoarthritis: A randomised, triple-blinded, placebo-controlled study. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 43, p. 101351, 2021.

2. ASLANER, Arif *et al*. Medical ozone treatment ameliorates the acute distal colitis in rat. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, p. 256-263, 2016.

3. BRITO JÚNIOR, Anildo Alves de *et al*. Application of ozonized oils in human body and oral cavity systems. **RGO-Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 70, p. e20220027, 2022.

4. CAI, Elijah Zhengyang et al. Creation of consistent burn wounds: a rat model. **Archives of plastic surgery**, v. 41, n. 04, p. 317-324, 2014.

5. CAMPELO, Ana Paula Bomfim Soares *et al*. An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, p. 38-42, 2011.

6. CASTILLA, Mireia R *et al*. Recent advances in biomarkers in severe burns. **Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches**, v. 45, n. 2, p. 117-125, 2016.

7. CHEN, Xiaowei *et al*. Effect of ozone oil for prevention and treatment of sorafenib-induced hand-foot skin reactions: a randomized controlled trial. **Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University**, v. 40, n. 10, p. 1488-1492, 2020.

8. DE ALMEIDA KOGAWA, Nathália Rodrigues *et al*. Synthesis, characterization, thermal behavior, and biological activity of ozonides from vegetable oils. **RSC Advances**, v. 5, n. 80, p. 65427-65436, 2015.

9. DI MAURO, Rosaria *et al*. The biochemical and pharmacological properties of ozone: the smell of protection in acute and chronic diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 634, 2019.

10. FITZPATRICK, Erin; HOLLAND, Olivia J.; VANDERLELIE, Jessica J. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. **International wound journal**, v. 15, n. 4, p. 633-639, 2018.

11. GONZÁLEZ, Karla. Actividad antifúngica in vitro de aceite de girasol ozonizado en hongos causales de micosis superficiales, v.14, n.1, p.63-73, 2016.

12. GUERRA-BLANCO, P. *et al*. Ozonation degree of vegetable oils as the factor of their anti-inflammatory and wound-healing effectiveness. **Ozone: Science & Engineering**, v. 39, n. 5, p. 374-384, 2017.

13. GÜNAYDIN, Yasemin *et al*. Ozonated olive oil with a high peroxide value for topical applications: in-vitro cytotoxicity analysis with L929 cells. **Ozone: Science & Engineering**, v.40, n.1, p.37-43, 2018.

14. HETTIARATCHY, Shehan; DZIEWULSKI, Peter. Pathophysiology and types of burns. **Bmj**, v. 328, n. 7453, p. 1427-1429, 2004.

15. LIMA, Flávia Quadros *et al*. Thermographic assessment of cutaneous wounds in rats under the effect of biomodulative therapies. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 134, n. 3, p. e202-e203, 2022.

16. LIU, Jian *et al*. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 10, 2015.

17. LU, J. *et al*. A preliminary study on topical ozonated oil in the therapeutic management of atopic dermatitis in murine. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 29, n. 7, p. 676-681, 2018.

18. LU, Jian-Yun *et al*. Topical Ozone Accelerates Diabetic Wound Healing by Promoting Re-Epithelialization through the Activation of IGF1R–EGFR Signaling. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 143, n. 12, p. 2507-2514. e6, 2023.

19. LU, Jianyun *et al*. Efficacy of combination of ozonated water with oil for treatment of tinea pedis. **Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 147-151, 2018.

20.MARTÍNEZ-SANCHEZ, Gregorio. Scientific rational for the medical application of ozonized oils, an up-date. **Ozone Therapy Global Journal**, v. 11, n. 1, p. 239-272, 2021.

21.MENENDEZ, Silvia; FALCON, Leopoldina; MAQUEIRA, Yordana. Therapeutic efficacy of topical OLEOZON® in patients suffering from onychomycosis. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. e272-e277, 2011.

22.MIOT, Hélio Amante; BRIANEZI, Gabrielli. Análise morfométrica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (clusters) de cor. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 361-364, 2010.

23.MOTA, Márcio Rabelo *et al*. Influência da ozonioterapia na cicatrização de úlceras do pé diabético. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 58274-58286, 2020.

24. MOUREU, Sophie *et al*. Ozonation of sunflower oils: Impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. **Chemistry and physics of lipids**, v. 186, p. 79-85, 2015.

25. MONSTREY, Stan *et al*. Assessment of burn depth and burn wound healing potential. **burns**, v. 34, n. 6, p. 761-769, 2008.

26. MORGAN, Noran H. *et al*. Role of Masson's trichrome stain in evaluating the effect of platelet-rich plasma on collagenesis after induction of thermal burn in adult male albino rats. **Tanta Medical Journal**, v. 50, n. 2, p. 86-93, 2022.

27.PAI, S. A. *et al*. Potential of ozonated sesame oil to augment wound healing in rats. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 76, n. 1, p. 87, 2014.

28. PASTAR, Irena *et al*. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. **Advances in wound care**, v. 3, n. 7, p. 445-464, 2014.

29.REZENDE, R. S. *et al*. Análise ultraestrutural do colágeno de feridas cutâneas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas de equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 03, p. 827-835, 2020.

30. RIVERS, Edgard. P. *et al*. Early interventions in severe sepsis and septic shock: a review of the evidence one decade later. **Minerva anestesiologica**, v. 78, n. 6, p. 712, 2012.

31. ROWAN, Matthew P. *et al*. Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Critical care**, v. 19, p. 1-12, 2015.

32. SAGAI, Masaru; BOCCI, Velio. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress?. **Medical gas research**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2011.

33. SANGUANINI, Rafael C. *et al*. Ozonized solutions favor the repair of experimentally induced skin wounds in rats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, p. 914-921, 2021.

34. SANTOS, João Vasco *et al*. Burden of Burns in Brazil from 2000 to 2014: A Nationwide Hospital-Based Study. **World Journal of Surgery**, v. 41, n. 8, p. 2006-2012, 2017.

35. SNELL, Jane A. *et al*. Clinical review: the critical care management of the burn patient. **Critical Care**, v. 17, n.5, p. 241, 2013.

36. SERIO, Francesca *et al*. A new formulation, based on ozonated sunflower seed oil: in vitro antibacterial and safety evaluation. **Ozone: Science & Engineering**, v. 39, n. 3, p. 139-147, 2017.

37. SERRA, Maria Emília Gadelha *et al*. The role of ozone treatment as integrative medicine. An evidence and gap map. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 1112296, 2023.

38. SHIH, Barbara *et al*. Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease. **Wound repair and regeneration**, v. 18, n. 2, p. 139-153, 2010.

39. SOARES, Ciro D. *et al*. Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats. **Growth Factors**, v. 37, n. 1-2, p. 95-103, 2019.

40. SOLOVĂSTRU, Laura Gheucă *et al*. Randomized, controlled study of innovative spray formulation containing ozonated oil and α-bisabolol in the topical treatment of chronic venous leg ulcers. **Advances in skin & wound care**, v. 28, n. 9, p. 406-409, 2015.

41. SONG, Mingsheng *et al*. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 2, p. 2449-2455, 2018.

42. TIWARI, V. K. Burn wound: How it differs from other wounds?. **Indian journal of plastic surgery**, v. 45, n. 02, p. 364-373, 2012.

43. TOYAMA, Sumika *et al*. Regulatory T cells exhibit interleukin-33-dependent migratory behavior during skin barrier disruption. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7443, 2021.

44. THOMSON, Pamela *et al*. Actividad antifúngica y perfil de seguridad del producto natural derivado del aceite de maravilla ozonizado (AMO3) en dermatofitos. **Revista chilena de infectología**, v. 28, n. 6, p. 512-519, 2011.

45. THORP, K. E.; THORP, J. A. Ozone Preconditioning: Waking up the dragon. **Gaz. Med. Sci.**, v. 2, p. 10-39, 2021.

46. UGAZIO, Elena *et al*. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 334, 2020.

47. VALACCHI, Giuseppe *et al*. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 1, p. 107-115, 2011.

48. VALACCHI, Giuseppe. *et al*. Ozonated oils as functional dermatological matrices: Effects on the wound healing process using SKH1 mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 1, p. 65-73, 2013.

49. WANG, Xiaoqi. Emerging roles of ozone in skin diseases. **Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical sciences**, v. 43, n. 2, p. 114-123, 2018.

50. WANG, Yue *et al*. Effects of ozone stimulation of bronchial epithelial cells on proliferation and collagen synthesis of co-cultured lung fibroblasts. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 15, n. 6, p. 5314-5322, 2018.

51. WEN, Qing *et al*. A systematic review of ozone therapy for treating chronically refractory wounds and ulcers. **International wound journal**, v. 19, n. 4, p. 853-870, 2022.

52. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014) Burns fact sheet no 365. http: //www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/ Acesso em 12 de dez 2022.

53. ZANARDI, Lacopo et al. What is the best strategy for enhancing the effects of topically applied ozonated oils in cutaneous infections?. **BioMed research international**, v. 2013, n. 1, p. 702949, 2013.

54. ZENG, Jinrong et al. Topical ozone therapy restores microbiome diversity in atopic dermatitis. **International Immunopharmacology**, v. 80, p. 106191, 2020.

55. ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International immunopharmacology**, v. 56, p. 235-241, 2018.

ANEXO I

Certificado de autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais:

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atuação do Óleo Ozonizado no processo de reparação tecidual em modelo animal para lesões provocadas por queimaduras/EVALUATION OF THE PERFORMANCE OF OZONIZED OIL IN THE TISSUE REPAIR PROCESS IN AN ANIMAL MODEL FOR INJURIES CAUSED BY BURNS", registrada com o nº 1.298/2023, sob a responsabilidade de Rondon Tosta Ramalho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 10/11/2023.

Finalidade	( ) Ensino	(x) Pesquisa
Vigência da Autorização	01/10/2023 a 30/09/2025	
Espécie/linhagem/raça	*Rattus norvegicus*/Wistar	
Nº de animais	36	
Peso/idade	280g/adulto	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central da UFMS	

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 07 de 12 de 2023

NOTA MÁXIMA NO MEC UFMS É 10!!!

Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 07/12/2023, às 14:48, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4523670** e o código CRC **2C8EC8CE**.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Av Costa e Silva s/nº - Cidade Universitária
Fone: (67) 3345-7825
CEP 79070-900 - Campo Grande - MS