



UNIVERSIDADE BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
CAMPUS ITAQUERA

JYNANI PICHARA MORAIS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA
VIABILIDADE CELULAR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
OZONIOTERAPIA**

**IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL POTENTIAL AND CELL
VIABILITY OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF OZONETHERAPY**

São Paulo – SP

2022

JYNANI PICHARA MORAIS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA
VIABILIDADE CELULAR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
OZONIOTERAPIA**

Qualificação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Profa. Dra. Livia Assis Garcia
Orientador (a)

Profa. Dra. Carla Roberta Tim
Coorientador(a)

São Paulo – SP
2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M821a MORAIS, Jynani Pichara.

Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano e da viabilidade celular de diferentes concentrações de ozonioterapia / Jynani Pichara Morais. - Itaquera: Universidade Brasil, 2022.

62 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-Graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Profa. Dra. Livia Assis.

Coorientação: Profa. Dra. Carla Tim.

1. Ozonioterapia. 2. Viabilidade celular. 3. Citotoxicidade. 4. Reparo de feridas. 5. Efeito antimicrobiano. I. Assis, Livia. II. Tim, Carla. III. Título.

CDD 620.82



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA VIABILIDADE CELULAR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OZONIOTERAPIA"

Houve alteração do Título: sim () não (x):

Autor(es):

Discente: **Jynani Pichara Morais**

Assinatura: _____

Orientador(a): **Prof.(a) Dr.(a) Livia Assis Garcia**

Assinatura: _____

Coorientador(a):

Assinatura: _____

Data: 30/03/2022



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE APROVAÇÃO

JYNANI PICHARA MORAIS

**"AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DA
VIABILIDADE CELULAR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OZONIOTERAPIA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Livia Assis Garcia

Prof.(a) Dr.(a) Livia Assis Garcia (presidente-orientadora)

Amanda F. F. Barros

Prof.(a) Dr.(a) Amanda Farage Frade Barros (UNIVERSIDADE BRASIL)

Ana Laura Martins de Andrade

Prof.(a). Dr(a). Ana Laura Martins de Andrade (CENTRO UNIVERSITARIO NOSSA SENHORA DO PATROCÍNIO)

São Paulo, 30 de março de 2022

Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a). Livia Assis Garcia

Houve alteração do Título: sim () não ():

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a mim mesma, por ter decidido tomar as rédeas da minha vida, por ter aprendido a me valorizar e, principalmente, por ter aprendido a me respeitar!

AGRADECIMENTOS

À Deus sempre em primeiro lugar.

Ao meu esposo Luciano, que foi quem mais me deu força para que esse mestrado acontecesse e sempre está comigo em todas as minhas decisões.

Aos meus pais e ao meu irmão, que de forma direta ou indireta, sempre estão me apoiando e ajudando em tudo que preciso.

À minha orientadora Lívia, pela confiança, amizade e ensinamentos.

À equipe Ozônio Line, que sempre me ajudou com os aparelhos da ozonioterapia necessários para desenvolvimento de trabalhos.

Ao meu amigo Welmer pelas divisões de trabalhos e compartilhamentos de aulas.

Aos professores Rodrigo Labat Marcos, Hueliton Wilian Kido e Alessandra Baptista pelo auxílio com os experimentos em laboratórios.

À uma grande amiga que fiz, Valeska, técnica do laboratório da Universidade Brasil, que me ajudou imensamente com os experimentos com microrganismos.

À CAPES pela bolsa que me proporcionou.

Obrigada: é o que eu tenho a dizer a cada um de vocês!

RESUMO

Ferida cutânea é uma condição clínica com alta prevalência e representa um problema de saúde pública. Embora a terapia com ozônio (O₃), ozonioterapia, seja amplamente utilizada na prática clínica devido os efeitos antimicrobianos e reparadores, ainda são escassas as evidências sobre dosimetrias ideais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar, *in vitro*, a citotoxicidade de diferentes concentrações de ozonioterapia em linhagens de queratinócitos (NOK) e fibroblastos (L929), assim como o potencial antimicrobiano para *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). As células NOK e L929 foram semeadas na concentração de 1×10^4 e as Cepas de bactérias gram-positivas *S.aureus* e de bactérias gram-negativas *E. coli* na concentração de 1×10^8 e divididas em 7 grupos experimentais: Controle tratadas com ozônio nas doses de 0 (G0), 5 (G5), 10 (G10), 20 (G20), 30 (G30), 40 (G40) e 50 µg/mL (G50). O efeito do ozônio na viabilidade/citotoxicidade celular foi determinado por meio de ensaio de *AlamarBlue*®, ensaio de *Live/Dead*® e a análise morfométrica da porcentagem de células vivas e células mortas. O efeito do gás sobre os microrganismos foi avaliado pela contagem da unidade formadora de colônia (UFC). Os resultados obtidos mostram que ozônio nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL apresentaram os maiores valores de viabilidade de células NOK (queratinócitos) e L929 (fibroblastos), assim como uma maior densidade e porcentagem de células vivas no período experimental de 72 horas quando comparado às demais concentrações. No entanto, não foi possível observar a diferença entre a porcentagem de células mortas entre os grupos experimentais. Ainda, o ozônio promoveu redução das UFCs em todas as concentrações testadas. Com os resultados obtidos no presente estudo, é possível confirmar o potencial reparador da ozonioterapia em uma resposta dose-dependente, assim como seu potencial antimicrobiano. Entretanto, faz-se necessário estudos que elucidem os mecanismos moleculares pelos quais ele exerce tais efeitos biológicos.

Palavras chaves: Ozonioterapia; viabilidade celular; citotoxicidade; reparo de feridas; efeito antimicrobiano.

ABSTRACT

Cutaneous wound is a clinical condition with high prevalence and represents a public health problem. Although ozone therapy (O₃), ozone therapy, is widely used in clinical practice due to its antimicrobial and restorative effects, evidence on ideal dosimetries is still scarce. Thus, the aim of the present study was to evaluate and compare, *in vitro*, the cytotoxicity of different concentrations of ozone therapy in keratinocyte (NOK) and fibroblast (L929) lines, as well as the antimicrobial potential for *Staphylococcus aureus* (S.aureus) and *Escherichia coli* (E. coli). NOK and L929 cells were seeded at a concentration of 1x10⁴ and strains of gram-positive bacteria S.aureus and gram-negative bacteria E. coli at a concentration of 1x10⁸ and divided into 7 experimental groups treated with ozone at doses of 0 (G0), 5 (G5), 10 (G10), 20 (G20), 30 (G30), 40 (G40) and 50 µg/mL (G50). The effect of ozone on cell viability/cytotoxicity was determined using the *AlamarBlue*® assay, the *Live/Dead*® assay, and morphometric analysis of the percentage of live and dead cells. The effect of the gas on the microorganisms was evaluated by counting the colony forming unit (CFU). The results obtained show that ozone at concentrations of 5, 10 and 20 µg/mL presented the highest viability values of NOK (keratinocytes) and L929 (fibroblasts) cells, as well as a higher density and percentage of live cells in the experimental period of 72 hours when compared to other concentrations. However, it was not possible to observe the difference between the percentage of dead cells between the experimental groups. Furthermore, ozone promoted a reduction in CFUs at all concentrations tested. With the results obtained in the present study, it is possible to confirm the reparative potential of ozone therapy in a dose-dependent response, as well as its antimicrobial potential. However, studies are needed to elucidate the molecular mechanisms by which it exerts such biological effects.

Keywords: Ozone therapy; cell viability; cytotoxicity; wound repair; antimicrobial effect.

DIVULGAÇÃO E TRANFEÊNCIA DE CONHECIMENTO

Foi realizado um estudo, in vitro, com células da pele, queratinócitos (NOK) e fibroblastos (L929) e com bactérias *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). A proposta foi a aplicação de uma terapia com O₃, ozonioterapia, em diferentes doses com a finalidade de observar a toxicidade do gás, assim como verificar se a terapia proporcionava morte de bactérias. A ozonioterapia mostrou não gerar citotoxicidade em células da pele e teve eficácia na eliminação de bactérias, sendo que as doses 5,10 e 20 µg/mL podem ser consideradas como as de melhores potenciais para um tratamento de feridas cutâneas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico de redução de alamarBlue® de células NOK no período de 24 e 72 horas	33
Figura 2 - Gráfico de redução de alamarBlue® de células L929 no período de 24 e 72 horas.....	34
Figura 3 – Imagens de fluorescência do ensaio de viabilidade/citotoxicidade de células NOK.....	36
Figura 4 – Imagens de fluorescência do ensaio de viabilidade/citotoxicidade de células L929.....	38
Figura 5 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células vivas NOK no período de 24 e 72 horas.....	39
Figura 6 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células vivas L929 no período de 24 e 72 horas.....	40
Figura 7 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células mortas NOK no período de 24 e 72 horas.....	41
Figura 8 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células mortas L929 no período de 24 e 72 horas.....	41
Figura 9 – Imagens representativa da UFC de <i>S.aureus</i>	43
Figura 10 – Imagens representativa da UFC de <i>E. coli</i>	44
Figura 11 – Gráfico representativo da fração de sobrevivência de <i>S.aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B).....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 PELE E FERIDAS CUTÂNEAS	17
3.2 OZONIOTERAPIA	21
4 METODOLOGIA	27
4.1 ETAPA 1	27
4.1.1 Linhagens celulares e condições de cultura	27
4.1.2 Delineamento experimental	28
4.1.3 Protocolo de Ozonioterapia	29
4.1.4 Ensaio com alamarBlue®	29
4.1.5 Ensaio de Live/Dead®	29
4.2 ETAPA 2	30
4.2.1 Cepas	30
4.2.2 Preparação do inóculo	30
4.2.3 Delineamento Experimental	31
4.2.4 Protocolo de Ozonioterapia	31
4.3 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	33
5.1 VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE ALAMARBLUE®	33
5.2 VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE – KIT LIVE/DEAD®	34
5.3 ANÁLISE DA PORCENTAGEM DAS CÉLULAS VIVAS	39
5.4 ANÁLISE DA PORCENTAGEM DE CÉLULAS MORTAS	40
5.5 Análise da UFC	42
5.6 Análise da fração de sobrevivência	45
6 DISCUSSÃO	46

7 CONCLUSÃO PARCIAL50

REFERÊNCIAS.....51

1 INTRODUÇÃO

Feridas cutâneas são lesões frequentes observadas na prática clínica e podem estar relacionadas à significativa incapacidade funcional, dor e até morte (REZAI et al., 2019; BORENA et al., 2015).

O reparo de uma ferida abrange um processo multifásico de fenômenos bioquímicos, celulares e fisiológicos que visam restaurar o tecido epitelial e tecido conjuntivo (GOODARZI et al., 2018). As fases sequenciais do reparo, inflamação, proliferação e maturação/remodelamento se sobrepõe de forma contínua e temporal (GURTNER et al., 2008; BONIFANTE & HOLLOWAY, 2019). No entanto, algumas condições específicas, como isquemia, neuropatias, comorbidades e presença de microrganismo, com destaque para as bactérias gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e de bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* (*E. coli*), podem perturbar e reduzir a ordem desses eventos sequenciais de reparo, resultando em uma ferida cutânea crônica (RIPPA et al., 2019; BOWER et al., 2020; LEONG et al., 2018).

O aumento no número de casos de feridas cutâneas crônicas é expressivo e contribui para uma baixa qualidade de vida, além de gerar altos custos para a saúde pública devido ao tratamento prolongado e, muitas vezes, pouco eficiente (SEN et al., 2009). Estima-se que a incidência aumente cada vez mais, principalmente com o envelhecimento populacional e o crescimento exponencial de indivíduos portadores de comorbidades e doenças metabólicas (BOWER et al., 2020).

O tratamento de feridas cutâneas crônicas visa aliviar a sintomatologia dolorosa, inativar os microrganismos existente e otimizar o reparo dos tecidos acometidos (WEN et al, 2021). Nesse contexto, diversos tratamentos locais e sistêmicos têm sido testados e utilizados, entretanto, nenhum tratamento específico foi estabelecido (KARGOZAR et al, 2020).

Atualmente, o interesse na aplicação da terapia com ozônio (O₃), ozonioterapia, aumentou consideravelmente no campo da reabilitação de distúrbios dermatológicos por se tratar de um procedimento minimamente invasivo, bem tolerado e de baixo custo. De acordo com Di Paolo, Bocci & Gaggiotti, 2004, os efeitos do ozônio baseiam-se em sua característica de ser um potente agente oxidante que, quando em contato com os fluidos orgânicos, ocasionam subprodutos (também conhecidos como

ozonídeos), culminando em diversos eventos bioquímicos e celulares que resultam desde efeitos antimicrobianos à estímulo do reparo tecidual.

Desta forma, embora haja o uso difundido da ozonioterapia na prática clínica comum, algumas questões referentes à sua utilização no reparo de feridas crônicas ainda não são bem compreendidas. Em particular, há uma carência de estudos na literatura investigando o efeito de diferentes concentrações do gás em células epidérmicas e dérmicas, assim como sobre os microrganismos prevalentes em feridas cutânea e que levam ao insucesso do reparo das mesmas. Diante disto, foi levantada a hipótese de que o gás poderia ter um potencial antimicrobiano sem ocasionar citotoxicidade em células responsáveis pelo reparo da pele, constituindo-se um tratamento adequado e eficaz a ser utilizado na prática clínica. Nesse sentido, evidências celulares e microbiológicas perante esse cenário são de grande valia para compreender com exatidão os benefícios da abordagem terapêutica no tratamento de feridas cutâneas crônicas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a eficácia de diferentes concentrações de ozônio sobre a viabilidade de fibroblastos e queratinócitos, assim como, sobre *S. aureus* e *E. coli*, através de um estudo *in vitro*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar, *in vitro*, a citotoxicidade efeito de diferentes de concentrações de ozonioterapia em linhagens de queratinócitos (NOK) e fibroblastos (L929), assim como o potencial antimicrobiano para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Investigar os efeitos de diferentes concentrações de ozônio na citotoxicidade de queratinócitos (NOK) e fibroblastos (L929);
- Verificar a efetividade de diferentes concentrações de ozônio sobre os microrganismos mais prevalentes em lesões crônicas;
- Identificar as melhores concentrações de ozônio que apresentem o melhor potencial a ser utilizado em feridas cutâneas, de forma o estimular células responsáveis pelo reparo e ocasionar a descontaminação de feridas cutâneas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PELE E FERIDAS CUTÂNEAS

A pele é um órgão não visceral e representa uma interface entre o corpo humano e o ambiente externo. Em virtude das características biológicas de suas estruturas, exerce diversas funções, como as de proteção contra fatores químicos, mecânicos, térmicos e patógenos, controle da permeabilidade cutânea, termorregulação, controle metabólico, sensorial e estética (WONG et al., 2015).

Morfologicamente, a pele é composta de 2 importantes camadas: epiderme e derme. A camada mais superficial, a epiderme, não é vascularizada e é caracterizada como epitélio estratificado com células pavimentosas e queratinizadas, tendo como principal componente celular os queratinócitos, cuja função principal é a produção de queratina. Essas células possuem a característica de alta capacidade proliferativa e de diferenciação, organizando-se em cinco estratos denominados de córneo (camada mais externa), lúcido, granular, espinhoso e basal (camada mais profunda). Cabe destacar que as células da camada basal, também conhecidas como germinativas, são as responsáveis pela renovação celular da epiderme (KHAVKIN et al., 2011; NIGAM et al., 2008). Ainda, é pertinente mencionar que na epiderme existem os melanócitos, presentes na camada basal da epiderme, com formato dentrítico, responsáveis por produzir a melanina (pigmento que define a coloração da pele e absorve a radiação UV); células de Merkel, cuja função é atuarem como receptores de percepção tátil e mecânica; células de *Langerhans* com a finalidade promover a defesa imunológica da pele (BARONI et al., 2012).

Subseqüencialmente à epiderme encontra-se a junção dermoepidérmica, composta por colágeno do tipo IV e filamentos de queratina, os quais dão origem às cristas dérmicas e papilas dérmicas, delimitando o final da epiderme e início da derme (WONG et al., 2015).

A derme compreende a parte mais espessa da pele, composta por estruturas responsáveis por sua elasticidade e resistência. É composta principalmente de fibroblastos, os quais sintetizam todos os componentes da matriz extracelular (MEC), fibrilares, como o colágeno e elastina, e não fibrilares, como o ácido hialurônico, glicoproteínas e proteoglicanos. Encontra-se também uma variedade de células

imunológicas, incluindo macrófagos e células dendríticas, além de glândulas, folículos pilosebáceos e músculo eretor do pelo (KHAVKIN et al., 2011).

Em concordância com a organização e distribuição, a derme pode ser dividida em um arranjo frouxo, composto predominantemente de fibras de colágenos do tipo III e fibras oxitalâmicas (dispostas perpendicularmente), denominado de derme papilar e outra parte composta por um arranjo mais denso, composto predominantemente de fibras de colágeno do tipo I e elásticas (disposta horizontalmente), denominada de derme reticular (WONG et al., 2015). Destaca-se que a derme papilar é responsável pela flexibilidade da pele, enquanto a reticular confere a extensibilidade e elasticidade (NIGAM et al., 2008).

A pele é susceptível a lesões, ou seja, agressões de agentes estressores de diversas etiologias que comprometem sua integridade, dando origem às feridas cutâneas (REZAI et al., 2019). Dependendo da intensidade da agressão, a ferida pode ser chamada de superficial (acomete apenas estruturas superficiais, a epiderme e derme são rompidas) ou pode ser chamada de grave ou profunda (envolve estruturas mais profundas, como músculos, tendões e outras estruturas) (LEDGER et al., 2020). Essas características estão diretamente relacionadas com o tipo de reparo, sendo que nas superficiais ocorre frequentemente a regeneração, definida como a restauração das características estruturais e funcionais do tecido, e nas feridas profundas ocorre a cicatrização, onde há uma deposição de um tecido cicatricial caracterizado como tecido conjuntivo não modelado, formando a cicatriz e alterando a estrutura e funcionalidade do tecido lesado (BORENA et al., 2015).

O reparo de uma ferida é um processo multifásico que consiste em três estágios sobrepostos, entretanto distintos: inflamação, proliferação e remodelamento (GURTNER et al., 2008). O evento inicial, a fase inflamatória, começa no momento da lesão e é caracterizada pela vasoconstrição secundária à liberação de catecolaminas, agregação plaquetária e deposição de fibrina (formação do coágulo), proporcionando a hemostasia local. Na sequência ocorre vasodilatação subsequente em resposta à liberação de histamina dos mastócitos circulantes que aumentam a permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e monócitos) e proteínas plasmáticas para o local da ferida (fenômeno de exsudação). Ainda existe uma liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), otimizando o recrutamento de neutrófilos e monócitos/macrófagos para o espaço intersticial a fim de realizar a fagocitose de

tecidos danificados e possíveis microrganismos. Vale salientar que as células inflamatórias liberam outras citocinas pró-inflamatórias, com destaque para o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina do tipo 1 (IL-1 β) e anti-inflamatórias, assim como fatores de crescimento que auxiliam o processo subsequente do reparo. Conforme a fase inflamatória progride, os macrófagos se tornam o tipo de célula dominante dentro de 24 a 72 horas. Seu papel na orquestração do fechamento da ferida é fundamental e muda conforme o reparo progride (GURTNER et al., 2008; BONIFANTE & HOLLOWAY, 2019).

A segunda fase, denominada de proliferativa, tem como objetivo diminuir a área do tecido lesado e caracteriza-se por eventos de reepitelização, fibroplasia e angiogênese. Esses processos iniciam-se no microambiente da lesão nas primeiras 48 horas e podem se perdurar até o 14^o dia após o início da lesão. Dentre os principais fatores de crescimento liberados por macrófagos, fibroblastos e queratinócitos no local da lesão, destaca-se o fator de crescimento epidérmico (EGF) que atua na quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e queratinócitos basais; fator de crescimento transformador do tipo beta (TGF- β), responsável por estimular fibroblastos e miofibroblastos a produzir colágeno (com destaque para o colágeno tipo III), elastina, glicosaminoglicanas e outras proteínas da MEC e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) envolvendo proliferação celular endotelial. Assim, essa fase é responsável pela formação do tecido de granulação, arcabouço do reparo tecidual, destacando o importante papel dos fibroblastos, responsáveis por produzir os componentes da MEC, substratos que irão dar tenacidade e integridade ao tecido, associado à ação dos queratinócitos, responsáveis por diferenciação, estratificação e maturação do epitélio, ou seja, reepitelização da ferida (RIPPA et al., 2019; WOODLEY et al., 2017; GOODARZI et al., 2018).

O remodelamento é a última fase do reparo da ferida e ocorre do vigésimo primeiro dia até 1 ano ou mais após a lesão. Também conhecido como fase de maturação da ferida, os componentes do tecido sofrem alterações na tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. O colágeno do tipo III, que foi produzido na fase proliferativa por fibroblastos, agora é substituído pelo colágeno do tipo I, mais resistente, sendo que esse processo é coordenado pelo TGF- β e PDGF (BONIFANTE & HOLLOWAY, 2019). Além disso, os processos angiogênicos diminuem, o fluxo sanguíneo da ferida diminui e a atividade metabólica aguda da ferida diminui para baixo e finalmente o processo se cessa (GOODARZI et al., 2018).

Dentro deste contexto, a ferida cutânea aguda tende a se reparar de maneira espontânea e efetiva, restabelecendo as propriedades anatômicas e funcionais do tecido. No entanto, em algumas condições específicas que prejudique estas fases, como a presença de lesões extensas na pele ou doenças associadas, como diabetes ou infecções, o processo de reparo pode ser prejudicado, resultando em feridas cutâneas crônicas (RIPPA et al., 2019; BOWER et al., 2020). Ainda, destaca-se a influência negativa dos microrganismos presentes nas feridas que impactam significativamente no atraso do reparo (ORTINES et al., 2018). Embora as feridas cutâneas sejam frequentemente polimicrobianas e compostas por muitas espécies bacterianas diferentes, as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (*E. coli*) são os patógenos mais dominantes e possuem importância epidemiológica primordial em feridas cutâneas crônicas (LEONG et al., 2018).

Define-se ferida crônica qualquer lesão de continuidade que não há o reparo da integridade anatômica e funcional no período de três meses (WEN et al., 2021; GURTNER et al., 2008). Com base nas etiologias causais, o *Wound Healing Society* classifica as feridas crônicas em quatro categorias: úlceras venosas, úlceras por insuficiência arterial, úlceras por pressão e úlceras diabéticas (KIRSNER, 2016).

Devido a alta prevalência (principalmente com o envelhecimento populacional e o aumento exponencial de pacientes portadores de comorbidades e doenças metabólicas) e a baixa taxa de cura completa, as feridas cutâneas crônicas têm um impacto significativo na saúde e na qualidade de vida dos pacientes, visto que essas causam dor, perda de função e mobilidade, depressão, angústia e ansiedade, constrangimento, isolamento social, morbidades crônicas ou mesmo morte (REZAI et al., 2019; BORENA et al., 2015).

Diversos métodos de tratamentos vêm sendo desenvolvidos e estudados com objetivo de auxiliar no processo de reparo da pele, entretanto, a gestão do tratamento para feridas cutâneas crônicas ainda é controversa (KARGOZAR et al, 2020). As estratégias de tratamento padrão incluem o manejo da doença subjacente, tratamentos locais para melhorar o ambiente da ferida, como desbridamento, curativo e tratamento sistêmico (por exemplo, aplicação de antibióticos, suplementos nutricionais, recursos eletrofísicos) e muitos outros. No entanto, sabe-se que esses métodos conservadores resultam em altas taxas de recorrência de úlceras e amputações (WEN et al, 2021).

O interesse na aplicação da terapia com O_3 , atualmente conhecido como ozonioterapia, neste campo aumentou consideravelmente nos últimos anos, principalmente por ser uma opção de tratamento conservador, minimamente invasivos e de baixo custo (ZENG et al., 2018; FITZPATRICK et al., 2018; IZADI et al., 2018; AGOSTI et al., 2016).

3.2 OZONIOTERAPIA

O potencial terapêutico do gás ozônio (O_3) através da técnica denominada ozonioterapia vêm sendo reportado na literatura científica desde o período da Primeira Guerra Mundial, quando o gás foi utilizado de forma tópica para a desinfecção e tratamento de feridas cutâneas gravemente contaminadas de soldados (DI PAOLO, BOCCI & GAGGIOTTI, 2004).

O O_3 é uma molécula composta por três átomos de oxigênio (O), sendo a terceira potência oxidante de estrutura dinamicamente instável que se decompõe rapidamente em moléculas de oxigênio (O_2) e em um átomo de oxigênio, altamente reativo. Apresenta uma meia-vida de 40 minutos a 20°C e cerca de 140 minutos a 0°C (DI PAOLO, BOCCI & GAGGIOTTI, 2004).

As primeiras observações sobre a existência desta molécula foram feitas em 1785, por um médico e físico holandês denominado Martins Van Marum, o qual relatou que as descargas elétricas de tempestades exalavam um odor diferenciado. Posteriormente, um químico-físico alemão, Friedrich Christian Schönbein (1840), descreve que as descargas elétricas ao entrarem em contato com o O_2 originavam um gás de coloração azulada e odor singular, denominando-o de gás ozônio, do grego *ozein* (aquilo que cheira) (BOCCI, 2006; BOCCI, ZANARDI & TRAVAGLI, 2011).

O O_3 pode ser produzido a partir das moléculas de O_2 através de fontes básicas de energia, incluindo eletrólise química, descargas elétricas e radiação da luz ultravioleta (UV) (BOCCI et al., 2009). Já a ozonioterapia emprega uma mistura gasosa de O_2 medicinal/ O_3 que, de acordo com a literatura, possui potencial terapêutico para diferentes situações clínicas (BOCCI, ZANARDO & TRAVAGLI, 2011; SCHWARTZ & SÁNCHEZ, 2012).

A ozonioterapia, de acordo com o a Declaração de Madrid (2020), é recomendada ser administrada de maneira tópica através de água, óleo e gás O_2/O_3

(bolsa hermética); e sistêmica, insuflação retal, endovaginal e auto-hemoterapia maior ou menor (BOCCI, 2005). Com relação aos óleos ozonizados, destaca-se a utilização de óleos com altas concentrações de ácidos graxos insaturados, como o de girassol e oliva (BOCCI et al., 2011; BOCCI et al., 2015).

Diversos grupos de pesquisa têm estudado a ação da ozonioterapia em diferentes tecidos biológico com a finalidade de melhor compreender os mecanismos de ação que sustentam seus efeitos locais e sistêmicos (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ 2005; KOÇYIĞIT et al., 2018; KARGOZAR et al., 2020). Chirumbolo et al., (2021) mostraram em uma recente revisão que vários autores apoiam que a ozonioterapia é capaz de modular condições inflamatórias, possui ações antioxidantes, analgésicas, imunomodulatórias e angiogênicas, assim como propriedades antimicrobianas (inativação de bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários), sustentando suas heterogêneas aplicações clínicas que vêm sendo utilizada em diversos países.

A literatura atual relata que a ozonioterapia possui potencial terapêutico em diversas doenças de pele, incluindo lesões cutâneas infecciosas ou não, doenças alérgicas, queimaduras e outras condições que culminam no reparo da pele (ZENG et al., 2018; FITZPATRICK et al., 2018; IZADI et al., 2018).

É relatado que o O₃ em contato com a célula gera um estresse oxidativo moderado e controlado, visto que o gás oxida estruturas celulares, com destaque para os ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular, decompondo-se prontamente em produtos de peroxidação lipídica (LOPs, do inglês *lipid oxidation products*) e espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*), incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical ânion superóxido (O⁻), radical hidroxila (HO) e óxido nítrico (NO). Os subprodutos (ozonídeos) gerados atuam como mediadores fisiológicos, responsáveis por estimular importantes fatores de crescimento benéficos para a reparação de tecidos. É importante observar que o nível de LOPs e ROS devem ser adequados para agirem como reguladores bioquímicos e evitar efeitos tóxicos celulares (ELVIS & EKTA, 2011).

O estudo de Re et al, (2008) descreve que a ozonioterapia promove uma condição de pré-condicionamento oxidativo e estimula o sistema antioxidante endógeno. Pequenos e repetidos estresses oxidativos reorganizam mecanismos bioquímicos através de atividades de segundos mensageiros. É demonstrado que o H₂O₂ e aldeídos ativos, (principalmente 4-hidroxi-2-nonenal [4-HNE]), são os responsáveis por ativar o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2). O Nrf2 tem importância clínica

em induzir a transcrição de elementos de resposta antioxidante (ERA), que consequentemente aumentará numerosas enzimas antioxidantes, destacando a superóxido dismutase (SOD), GPx, glutathione-S-transferase (GSTr), catalase (CAT) (JOHNSON et al., 2008). Essa normalização do potencial redox resultará em diversos benefícios, como a melhora no metabolismo celular, liberação de citocinas e fatores de crescimento, assim como o aumento na circulação (vasodilatação local e angiogênese), elementos cruciais para favorecer o reparo de feridas (BOCCI, 2006). Ainda é descrito que a ozonioterapia promove um “choque terapêutico” atóxico com a finalidade de restabelecer a homeostasia e a resposta fisiológica de um tecido (ZANARDI et al., 2016).

Adicionalmente, a capacidade do ozônio de inibir a amplificação da inflamação e a cronificação do processo tem sido demonstrada em muitas condições patológicas da pele, como herpes zoster, dermatite atópica e “pé de atleta” (ZANARDI et al., 2016). Sagai e Bocci, 2011 defendem que o estresse oxidativo agudo e moderado gerado pela ozonioterapia atua em nível molecular, reduzindo as fases de inflamação e promovendo o reparo precoce de feridas. Além disso, a terapia com ozônio também pode suprimir a atividade do NF- κ B, atenuando as respostas inflamatórias (BOCCI et al., 2015). Estudos anteriores mostraram que o O₃ pode reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , assim como mediadores da resposta inflamatória, incluindo ciclooxigenase-2 (COX-2) (KIM et al., 2009). Ao reduzir a inflamação, o ozônio pode favorecer o recrutamento de células epiteliais e fibroblastos, assim como a produção de MEC, contribuindo para a melhora do reparo tecidual (JOHNSON et al., 2008).

A ozonioterapia também demonstra impacto benéfico da terapia com ozônio na estimulação de novos vasos sanguíneos em feridas cutâneas (MARTÍNEZ-SÁNCHEZ 2005; KOÇYIĞIT et al., 2018), características essenciais para o reparo bem-sucedido de feridas, visto que a terapia estimula proteínas que estão envolvidas no processo de neoangiogênese, especial atenção tem sido direcionada ao VEGF (KARGOZAR et al., 2020).

Ainda, a ação antimicrobiana do ozônio tem sido referenciada na literatura desde o início de sua utilização em soldados alemães que sofriam de gangrena gasosa durante a Primeira Guerra Mundial devido ao seu forte efeito bacteriano sobre *Clostridium anaeróbico* (DI PAOLO, BOCCI & GAGGIOTTI, 2004; TRAVAGLI et al., 2010). A justificativa de sua utilização é devido ao fato do gás gerar os radicais livres

de oxigênio liberados pelo ozônio atuando como um forte oxidante para matar diretamente micro-organismos (SUH et al., 2019; AZARPAZHOOH et al., 2008; SMITH et al., 2017; POLYDOUROU et al., 2012; THANOMSUB et al., 2002; GULMEN et al., 2013). A literatura mostra que a terapia possui eficácia antimicrobiana sem induzir resistência aos medicamentos, como a exemplo da *Candida albicans* (KHARTRI, MOGER, KUMAR, 2015; POLYDOROU et al., 2012), *Escherichia coli* (*E.Coli*) (PATIL et al, 2011) e *S. aureus* (AL-SAADY et al., 2016). Ainda, é relatado que o ozônio é capaz ocasionar a inibição da atividade metabólica, mudanças na cápsula e destruição do material genético do micro-organismo, sugerindo uma grande promessa terapêutica em uma variedade de infecções de pele e mucosas (SUH et al., 2019; ZANARDI et al., 2013; TRAVAGLI et al., 2010).

Diversos grupos de pesquisas confirmaram os resultados positivos da ozonioterapia no tratamento de feridas cutâneas (detalhes descritos na tabela 1). Uma recente revisão sistemática realizada por Wen et al. (2021) destacou os efeitos positivos em termos de redução do tamanho da ferida (úlceras de pé diabéticos) e reduziu a taxa de amputação sem eventos adversos relacionado ao tratamento. Entretanto, os autores relatam que a eficácia da ozonioterapia para outros tipos de feridas ainda é incerta, pois não há estudos suficientes e recomendam que mais ensaios controlados randomizados de alta qualidade são necessários para confirmar a eficácia e segurança da terapia com ozônio para feridas crônicas.

Em suma, os relatos supracitados sugerem que a ozonioterapia possui um potencial terapêutico promissor em reduzir complicações encontradas durante o processo de reparo de feridas cutâneas. No entanto, é possível verificar que a técnica ainda tem sido utilizada empiricamente devido a uma grande variabilidade entre os protocolos de aplicação de ozônio para esta finalidade, como por exemplo, diferentes tipos de equipamentos geradores de ozônio, doses adequadas, estado físico do ozônio, tempo e técnica de aplicação. Portanto, neste trabalho, abordamos algumas dessas questões não resolvidas. Em primeiro lugar, avaliar a influência de diferentes concentrações de ozônio na viabilidade de células epidérmicas (queratinócitos) e dérmicas (fibroblastos). Em segundo lugar, verificar se as mesmas concentrações poderiam inativar micro-organismos mais prevalentes e responsáveis por ocasionar o insucesso no reparo tecidual.

Tabela 1 – Síntese de dados obtidos em publicações referente ao uso do ozônio em feridas cutâneas

Autor/Ano	Tipo de estudo	Doença/Modelo	Via de administração/ Parâmetros/ Periodicidade	Resultados encontrados
Turčić J. 1995	Experimento in vivo (homens e mulheres)	Enxerto de pele (ferimentos de guerra)	Inicial - Bag / 50 µg/mL /mL por 6 minutos/ Dias alternados 3 sessões; Final - Bag/ 50 µg/mL /mL por 6 minutos/ Dias alternados 5 sessões	Aumentou a viabilidade do enxerto.
Martínez-Sánchez G. et al. 2005	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Ferida crônica (pé diabético)	Bag / 60 µg/mL por 1 hora + Insuflação retal / 50 µg/mL+ Óleo de girassol ozonizado/ concentração não especificada / diário por 20 dias.	Aumentou da taxa de reparo das feridas, níveis de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e controle glicêmico.
Kim, H. S. et al. 2009	Experimento in vivo – modelo animal (porquinho da índia)	Ferida cutânea	Óleo de oliva ozonizado / Concentração não especificada/ diário por 11 dias.	Acelerou o reparo das fêrias cutâneas e aumentou a expressão dos fatores de crescimento PDGF, TGF-β e VEGF
Shah, P., Shyam, A.K. & Shah, S. 2011	Ensaio clínico – relato de caso (mulher)	Ferida extensa após cirurgia de fratura por estresse da tibia proximal	Bag/ 70 µg/mL /mL por 30 minutos/ 2x/dia + Auto-hemoterapia ozonizada/ 50 mL de sangue e 50 mL de ozônio a 70mcg/mL de ozônio reinjetados por via endovenosa/ 4 dias consecutivos. Após cirurgia – Bag/ 60 µg/mL por 30 min/ 5 dias	Acelerou o retalho cutâneo e reparo ósseo.
Valacchi G et al. 2011	Experimento in vivo – modelo animal (camundongo SKH1)	Ferida cutânea	Óleo ozonizado de gergelim a 45µg/mL / 2x/dia por 14 dias.	Aumentou a taxa de fechamento da ferida, maior angiogênese e aumento dos VEGF e ciclina D1.
Wainstein J et al. 2011	Ensaio clínico - (homens e mulheres)	Úlceras crônicas (pé diabético)	Bag / 80 µg/mL por 26. min/ 5 x por semana por 4 semanas Bag / 40 µg/mL por 26. min/ 5 x por semana por 4 semanas	Aumentou significativamente a taxa de fechamento das feridas
Uzun, G. et al. 2012	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Gangrena úmida	Intralesional (não foram especificados concentrações e volumes)	Aumentou a dor e o paciente desenvolveu ferida necrótica e edematosa
Fathi, A. M., Mawsouf, M. N., & Viebahn-Hänsler, R. 2012	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Pé diabético e ferida crônica	Bag/70 a 80 µg/mL por 25 minutos/ 2x/dia/ após granulação 60 a 40 µg/mL por 25 minutos + água ozonizada/ 18 a 24 µg/mL + subcutânea / 1 µg/mL a 2 ml por ponto na borda da lesão + óleo de oliva ozonizado / não especificado/ 40 µg/mL a 100 mL/ Inicialmente diário evoluindo para 3 a 1x por semana	Aumentou a taxa de reparo em 87% dos pacientes e cura completa em 46%.
Zhang J et al. 2014	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Úlcera crônica (pé diabético)	Bag diário a 52 µg/mL, volume total de 20 a 50 mL por 30 minutos em um tempo de 20 dias.	Aumentou a expressões das proteínas VEGF, TGF-β e PDGF e reduziu o tamanho da ferida
Solovăstru LG et al. 2015	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Feridas crônicas (úlceras venosas)	Óleo ozonizado de girassol (15%) associado à alfa bisabolol/ Não especificado/ Diário por 30 dias.	Redução significativa da lesão e cura completa em 25% dos casos.

Degli Agosti <i>et al.</i> 2016	Ensaio clínico (homem) – relato de caso	Ferida crônica	Subcutâneo ao redor da lesão/Primeira semana: 8 µg/mL; Segunda semana: 18 µg/mL; Terceira semana: 24 µg/mL, Quarta semana: 14 µg/mL; Quinta semana: 6 µg/mL,	Acelerou cicatrização e reduziu dor.
Rosul MV, Patskan BM. 2016	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Lesão purulonecrótica (pé diabético)	Óleo ozonizado a 4000µg/L + Solução salina ozonizada a 1300 µg/L a 200mL, via endovenosa/ 1x/dia por 14 dias.	Promoveu a melhora dos índices de peroxidação lipídica e de proteção antioxidante, reduziu o tempo de internação e o tempo de reparo.
Kesik, V., et al. 2016	Experimento in vivo (ratos machos WistarAlbino)	Necrose de pele	Azeite ozonizado com 100 µg/mL de ozônio até ficar incolor/ 45 dias	Os tamanhos das úlceras diminuíram no grupo em que foi usado óleo ozonizado.
Zhou YT et al. 2016	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Úlceras diabéticas	Bag / 60 µg/mL por 1 hora + laser sistêmico/ 1x/dia até que a área de necrose e infecção das úlceras fossem melhoradas.	Aumentou a proporção de cicatrização e os pacientes mostraram melhor satisfação e menor taxa de recorrência.
Song, M. et al. 2017	Experimento in vitro e ensaio clínico (homens e mulheres)	Feridas contaminadas por Staphylococcus e Streptococcus sp.	Óleo ozonizado de camélia / valor de peróxido de 2000 a 2200mmol-equiv/Kg + Água ozonizada/ não definiu concentração/ Tempo de exposição: 24 horas	Na análise in vitro - 100% dos Staphylococcus foram eliminados por óleo ozonizado após 5 minutos; 100% dos Streptococcus foram eliminados após 15 minutos de contato com óleo ozonizado e 100% de ambos foram eliminados após 15 minutos de contato com a água ozonizada. Na análise in vivo, houve redução do tempo de tratamento de infecções cutâneas causadas por Staphylococcus e Strapetococcus sp.
Izadi, M. et al. 2018	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Úlcera de pé diabético	Bag por 30 minutos + óleo ozonizado de girassol + subcutâneas peri lesionais + auto-hemoterapia menor e maior ozonizadas/ Concentrações não especificadas/ 2x/semana até fechamento completo da ferida.	Fechamento completo da ferida mais rápido que o grupo controle.
Izadi, M et al. 2018	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Ferida crônica	óleo ozonizado de girassol + auto-hemoterapia maior + auto-hemoterapia menor/ não especificado/	Melhora significativa na cicatrização das feridas crônicas, bem como melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes.
Hassanien M, et al. 2018	Ensaio clínico (homens e mulheres)	Úlceras digitais na esclerose sistêmica	Bag / 52 µg/mL por 30 minutos/ 20 dias	Reduziu significativamente o tamanho das feridas e aumentou VEGF.
Aghaei M et al. 2019	Experimento in vivo – modelo animal (cães)	Ferida cutânea (Leishmaniose)	Óleo ozonizado (azeite de oliva) com glucantima/ de 0,5 ml / mm2/ duas vezes ao dia por 8 semanas	Reduziu significativamente o tamanho da lesão em comparação ao grupo controle.

4 METODOLOGIA

O estudo foi realizado em 2 etapas. A etapa 1 verificou-se a viabilidade de queratinócitos (NOK) e fibroblastos (L929) e a etapa 2 foi avaliado o potencial antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*), ambas etapas utilizando diferentes de concentrações de ozonioterapia.

4.1 ETAPA 1

A avaliação da resposta biológica induzida pelo ozônio em diferentes concentrações foi realizada através do estudo *in vitro*, no qual se analisou a viabilidade em culturas de células de queratinócitos da linhagem NOK (queratinócitos humanos) e fibroblásticas da linhagem L929 (fibroblastos murinos). Estas linhagens foram escolhidas por serem amplamente utilizadas em análises de viabilidade *in vitro* e apresentarem um importante papel durante o processo de reparo de pele (BORGES et al., 2017).

4.1.1 Linhagens celulares e condições de cultura

As linhagens de células NOK (queratinócitos) e L929 (fibroblastos), ambas provenientes do banco de células do Rio de Janeiro e gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Roberto Labat Marcos, foram cultivados em garrafas de cultura, utilizando meio *Eagle* modificado por Dulbecco-DMEM (com uma alta concentração de glicose de 4500 mg/L para as células NOK), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (penicilina-estreptomicina) a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. O meio de cultura suplementado foi removido a cada 2-3 dias e as células foram mantidas em densidade subconfluentes até a sua utilização. Para todos os experimentos, as células foram destacadas com solução de tripsina (0,25%)/ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; 1 mM). Os reagentes da cultura celular foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os

procedimentos relacionados com a manutenção das células foram realizados em capela de fluxo laminar vertical, mantendo, assim, a esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular

4.1.2 Delineamento Experimental

Para a realização das análises *in vitro*, as células foram semeadas em placa de cultivo de 96 poços (em triplicata) em uma concentração de 1×10^4 células por poço para a linhagem NOK e 1×10^4 por poço para as células da linhagem L929. Cada linhagem celular foi dividida em 7 grupos:

o *Controle (G0)*: as células foram cultivadas rotineiramente com os seus respectivos meios de cultura.

o *Grupo 5 (G5)*: as células foram cultivadas e receberam ozônio na concentração de $5 \mu\text{g/mL}$;

o *Grupo 10 (G10)*: as células foram cultivadas e receberam ozônio na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$;

o *Grupo 20 (G20)*: as células foram cultivadas e receberam ozônio na concentração de $20 \mu\text{g/mL}$;

o *Grupo 30 (G30)*: as células foram cultivadas e receberam ozônio na concentração de $30 \mu\text{g/mL}$;

o *Grupo 40 (G40)*: as células foram cultivadas e receberam ozônio na concentração de $40 \mu\text{g/mL}$;

o *Grupo 50 (G50)*: as células foram cultivadas e receberam ozônio na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$;

Para cada experimento as células foram cultivadas previamente nas placas de cultura por 24 h. Após esse período, as células NOK e L929 receberam ozônio de acordo com cada grupo experimental e foram avaliados nos períodos de 24 e 72 horas.

4.1.3 Protocolo de Ozonioterapia

A ozonioterapia foi realizada utilizando um gerador de ozônio portátil da marca Ozônio Line (São Paulo - SP). O ozônio foi realizado 24 horas após a semeadura, adicionado ao meio de cultura com auxílio de uma ponta injetora, nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$, com um fluxo de oxigênio de 1/4 L/min e volume de 0,5 ml por poço. As avaliações foram realizadas no período de 24 e 72 horas após aplicação do ozônio.

4.1.4 Ensaio com *AlamarBlue*®

Para determinar a viabilidade foi utilizado o reagente *AlamarBlue*®. Após 24 horas e 72 h de tratamento foi adicionado 100 μL da solução de *AlamarBlue*® a 10% em cada poço. A placa foi colocada novamente na estufa por 3h para incubação no escuro. Ao término desse tempo foi retirado 50 μl da solução e transferido para uma nova placa de 96 poços para medir a absorbância em 570 e 600nm em um espectrofotômetro de placas (Bio-Tek Instruments, Inc). Os valores ganhos foram calculados como uma porcentagem da redução do *AlamarBlue*® seguindo as instruções prévias do fabricante.

4.1.5 Ensaio de *Live/Dead*®

O ensaio de *Live/Dead*® consiste em um ensaio de fluorescência e neste é possível visualizar células vivas (coloração verde) e células mortas (coloração vermelha). Os fibroblastos e os queratinócitos foram lavados com 200 μL de PBS e tratadas com uma solução de calceína AM e homodímero de etídio-1 (EthD-1) de acordo com as instruções do fabricante (*Kit Live/Dead*® Viability cytotoxicity Molecular Probes TM). As células foram incubadas a 37°C durante 45 minutos e, em seguida, lavadas com meio de cultura sem PBS. Para a obtenção de imagens por microscopia

óptica as células foram analisadas em microscópio óptico invertido equipado com lâmpada de fluorescência (Nikon E800) com um programa de imagem específico (*software Image Pro-Plus*).

Na sequência, as imagens foram carregadas no *software Matlab* e separada em seus dois canais de cor (Vermelho - R, Verde - G). Foram geradas duas máscaras a partir do limiar de 15 % da maior intensidade observada no canal vermelho. Em seguida, o número de pixels vermelho em cada imagem foi usado para calcular a porcentagem da área da imagem que correspondia às células mortas e os pixels em verde a porcentagem da área da imagem que correspondia às células vivas. O número de pixels foi determinado e expresso em porcentagem total de células vivas e células mortas.

4.2 ETAPA 2

4.2.1 Cepas

As cepas de bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 foram disponibilizadas pelo Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil, Campus de São Paulo.

4.2.2 Preparação do inóculo

Utilizando tubos de ensaio contendo meio Infusão Cérebro-Coração (*Brain Heart Infusion - BHI - Kasvi®*, Paraná, Brasil), preparado conforme recomendação do fabricante foram inoculados *E. coli* e *S. aureus* e incubadas, em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por 24 horas. Seguindo as Normas Internacionais de Biossegurança em todo o procedimento.

A concentração inicial de 8×10^8 UFC/mL, fornecida através da escala nefelométrica de *Mc Farland* onde por turvação e intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquido se manifesta por um aumento do número das bactérias.

4.2.3 Delineamento Experimental

Para a realização das análises microbiológicas, foram utilizadas placas de petri estéreis com dimensões 90 x15 mm contendo com Agar Infusão Cérebro - Coração (*Brain Heart Infusion Agar* - BHI Agar– Kasvi®, Paraná, Brasil). Uma alíquota de 50 µl do inóculo foi devidamente distribuída por toda placa em uma concentração final de 1×10^8 UFC/mL, tanto das cepas *E. coli* e *S. aureus*. Cada linhagem de cepa bacteriológica foi dividida em 7 grupos, como descrito na ítem 4.1.2 e, para cada dia de experimento o inóculo foi replicado com um intervalo de 24 h.

Após o processo de preparação das placas com a cepas de *E. coli* e *S. aureus* receberam ozônio de acordo com cada grupo experimental por um período determinado e foram incubadas por 24h em estufa bacteriológica (Quimis®, São Paulo, Brasil) à temperatura de 37°C por 24 h e assim foi realizada a contagem padrão (método manual) do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por placa no período de 24h e 72h.

4.2.4 Protocolo de Ozonioterapia

A ozonioterapia foi realizado após a semeadura em placa, através do método de Bag (bolsa hermética onde foram colocadas as placas abertas já com os microrganismos recebendo o gás ozônio), nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, com um fluxo de oxigênio de 1/4 L/min e por um período de 30 min por placa. As avaliações foram realizadas no período de 24 e 72 horas após aplicação do ozônio.

4.3 Análise estatística

Os dados foram impostos estatisticamente por meio de técnicas descritivas, na forma de médias e desvios-padrão. O teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para todas as variáveis. Nos casos em que houve distribuição normal da

amostra, as comparações entre os grupos foram feitas utilizando ANOVA One Way com *post hoc* de *Tukey*. Nos casos não paramétricos, o teste de *Kruskall-Wallis* com *post hoc* de *Dunn* foi adotado. As análises foram realizadas no software *GraphPad Prism*, versão 6.01 (*GraphPad Software*, San Diego CA, EUA). Para as estatísticas das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

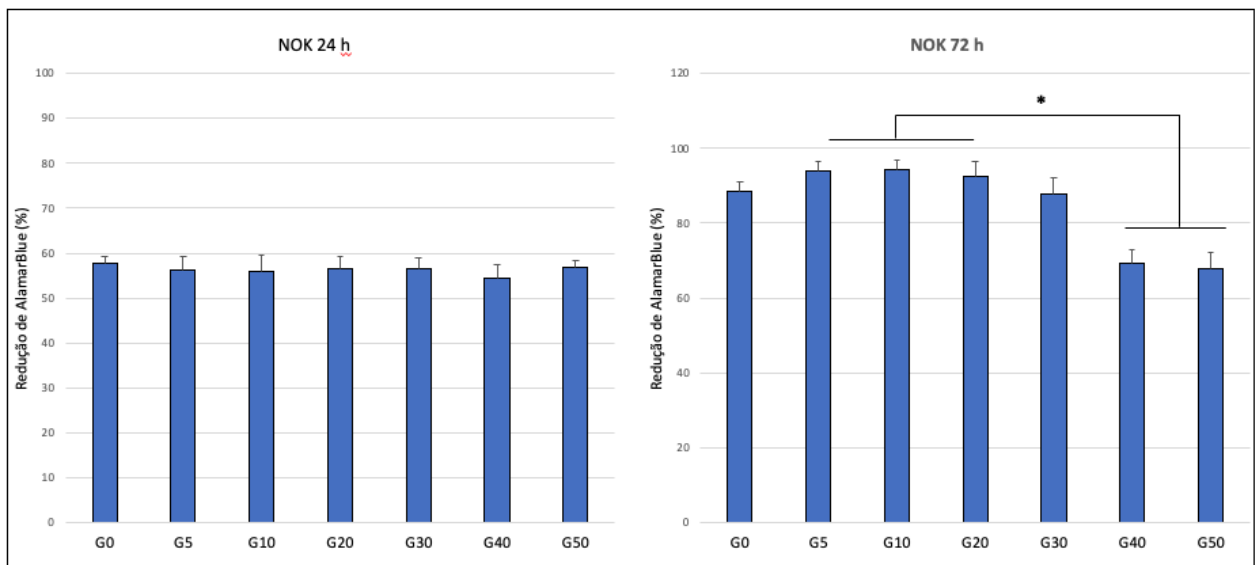
5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular pelo ensaio de *AlamarBlue*[®]

A figura 1 representa o ensaio de viabilidade celular após o período de cultivo de 24 e 72 horas de células NOK em contato com as diferentes concentrações de ozônio.

Após 24 horas de cultivo, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos estudados. Entretanto, após 72 horas de cultivo celular, os grupos G40 e G50 apresentaram valores menores estatisticamente quando comparados com os demais grupos G5 ($p = 0,0003$; $p = 0,0002$, respectivamente), G10 ($p = 0,0002$; $p = 0,0001$, respectivamente) e G20 ($p = 0,0063$; $p = 0,0044$, respectivamente).

Figura 1 – Gráfico de redução de *AlamarBlue*[®] de células NOK no período de 24 e 72 horas



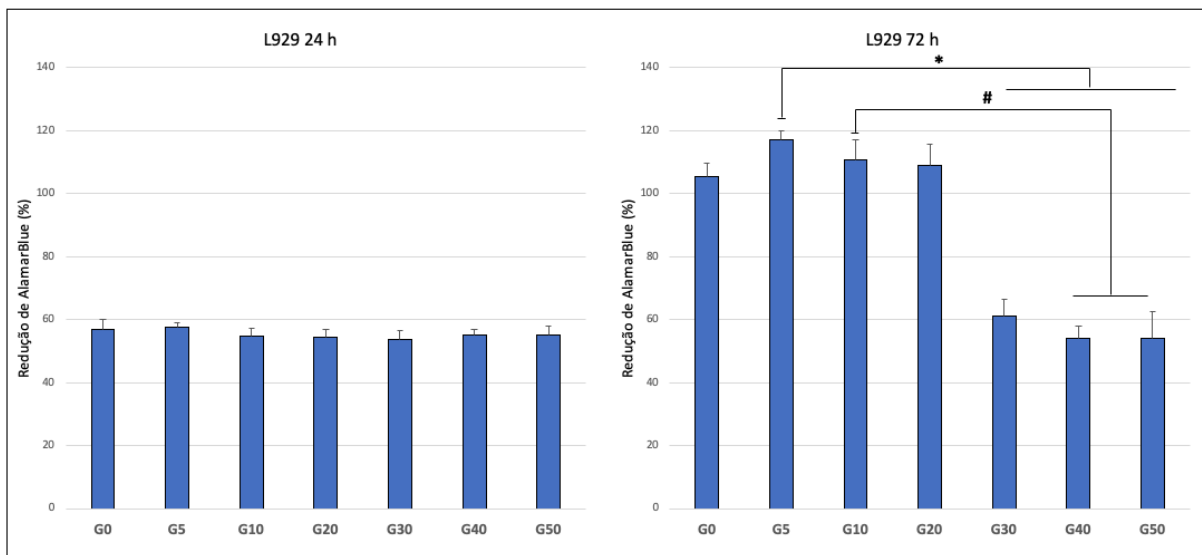
Fonte: Autoria própria

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

A figura 2 mostra o ensaio de viabilidade celular após o período de cultivo de 24 e 72 horas de células L929 em contato com as diferentes concentrações de ozônio.

Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos estudados no período de 24 horas de cultivo. Entretanto, os grupos G30, G40 e G50 apresentaram valores menores estatisticamente comparados ao G5 ($p = 0,0017$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$, respectivamente) no experimentais após 72 horas de cultivo celular. Ainda, os grupos G40 e G50 tiveram valores reduzidos comparado ao G10 ($p = 0,0033$; $p = 0,008$, respectivamente) e G20 ($p = 0,005$; $p = 0,019$, respectivamente).

Figura 2 – Gráfico de redução de *AlamarBlue*[®] de células L929 no período de 24 e 72 horas



Fonte: Autoria própria

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

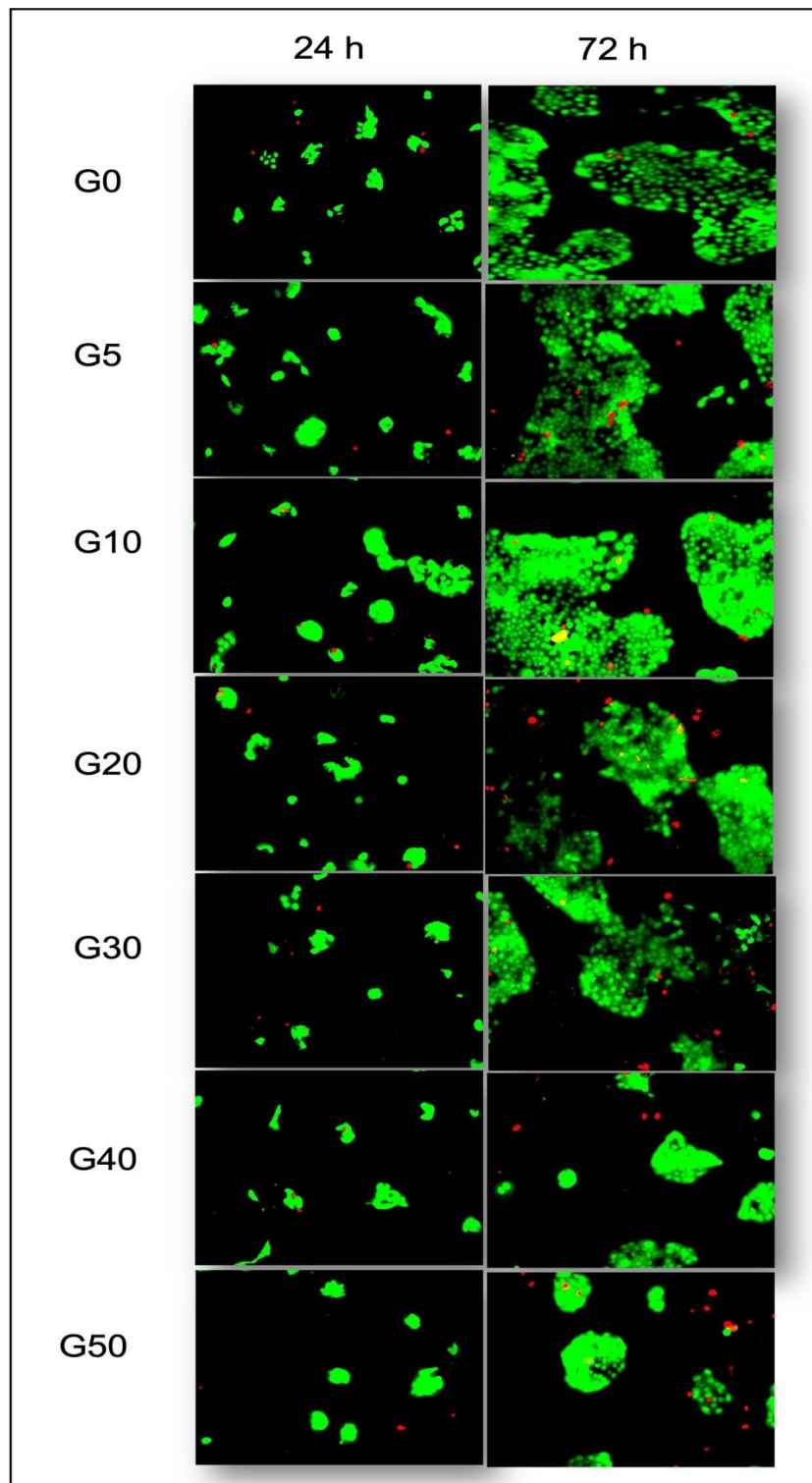
5.2 Viabilidade e Citotoxicidade - Kit LIVE/DEAD[®]

A figura 3 e 4 mostram as imagens representativas do ensaio de viabilidade/citotoxicidade celular pelo kit LIVE/DEAD após o período de cultivo de 24 e 72 horas de cultivo das células NOK e L929, respectivamente, com diferentes concentrações de ozônio.

Para as células NOK (figura 3) foi verificado a presença de células vivas (coradas em verde) e células mortas (coradas em vermelho) em todos os grupos avaliados no período de 24 horas. Entretanto foi observado uma maior densidade de células vivas e uma pequena quantidade de células mortas em todos os grupos experimentais. Nenhuma outra diferença foi observada entre os grupos experimentais.

Após 72 horas, uma maior densidade de células vivas pode ser evidenciada em todos os grupos quando comparado ao período anterior. Além disso, poucas células mortas foram observadas neste período nos grupos avaliados. O grupo G0, G5, G10, G20 e G30 tiveram uma maior presença de células vivas em relação aos demais grupos G40 e G50. Nenhuma diferença das células mortas foi observada nos grupos experimentais.

Figura 3 – Imagens de fluorescência do ensaio de viabilidade/citotoxicidade de células NOK



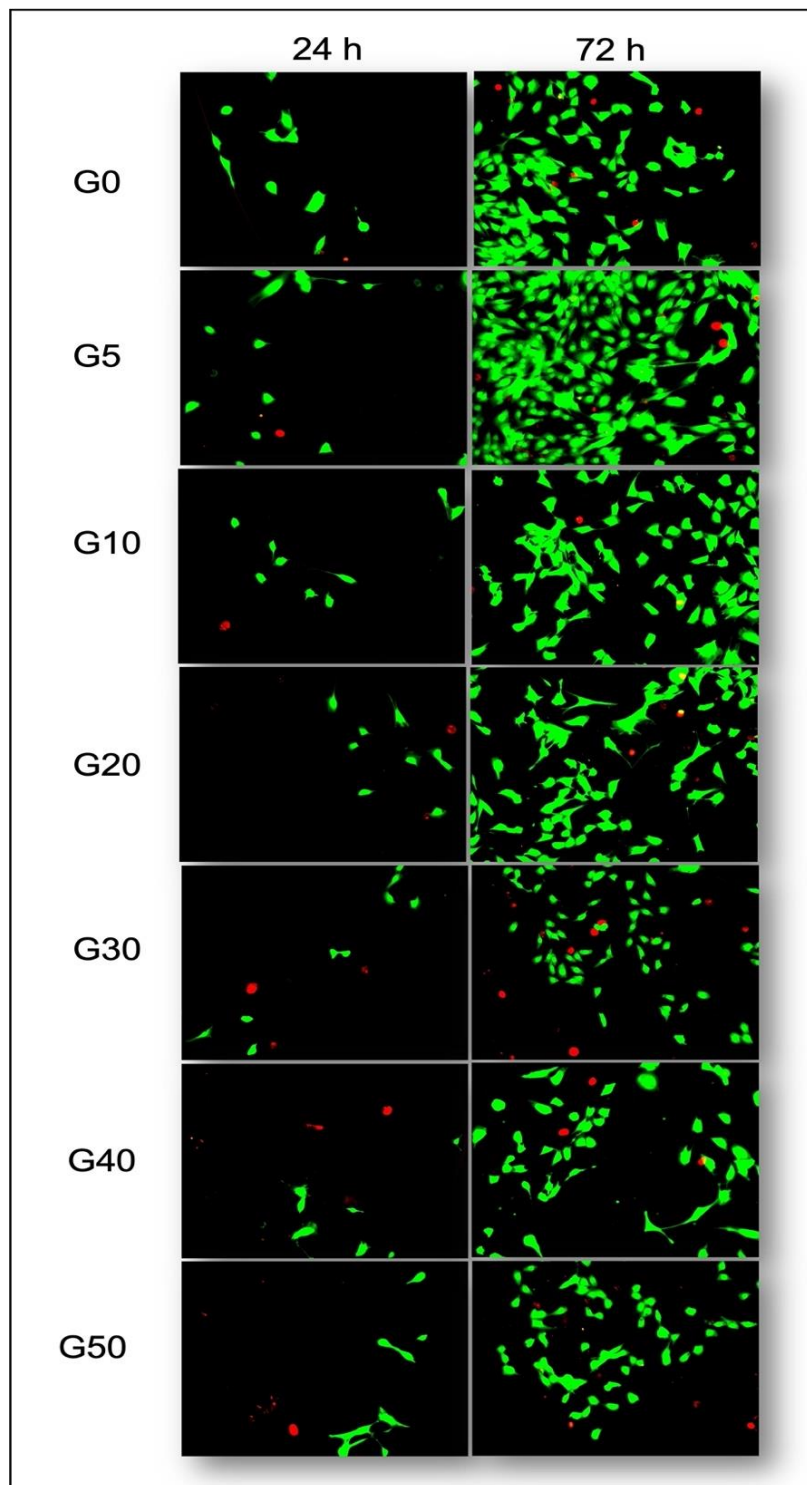
Fonte: Autoria própria

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50). Fluorescência verde indica células vivas e fluorescência vermelha indica células mortas

Para as células L929 (figura 4), no período de 24 horas, foi possível verificar uma maior densidade de células vivas (coradas em verde) e uma pequena densidade de células mortas (coradas em vermelho) em todos os grupos experimentais.

No período de 72 horas, foi possível verificar uma maior densidade de células vivas, quando comparado ao período anterior, com destaque para os grupos G5, G10 e G20. Ainda, foi observado uma pequena quantidade de células mortas em todos os grupos avaliados.

Figura 4 – Imagens de fluorescência do ensaio de viabilidade/citotoxicidade de células L929



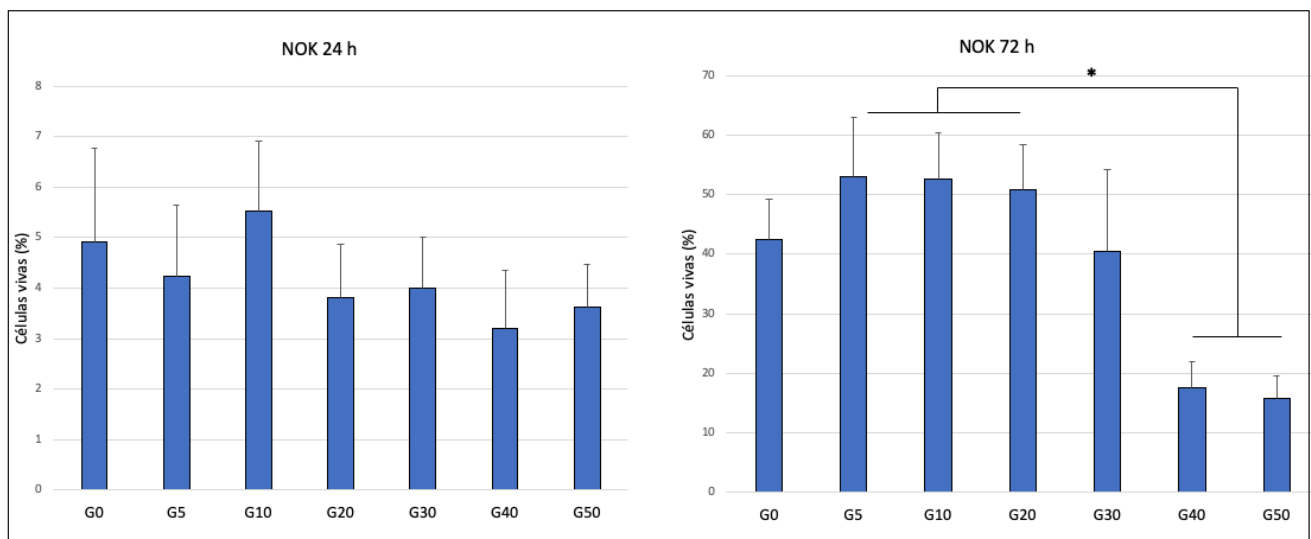
Fonte: Autoria própria

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 µg/mL (G5); 10 µg/mL (G10); 20 µg/mL (G20); 30 µg/mL (G30); 40 µg/mL (G40); 50 µg/mL (G50). Fluorescência verde indica células vivas e fluorescência vermelha indica células mortas

5.3 Análise da porcentagem de células vivas

Os resultados da análise referente à porcentagem de células vivas da linhagem NOK estão demonstrados na Figura 5. Nenhuma diferença foi observada no período de 24 horas. Já, no período de 72 horas foi observado um aumento significativamente da porcentagem de células vivas nos grupos G5, G10 e G20 quando comparado aos grupos G40 ($p = 0,0285$; $p < 0,0292$; $p < 0,0285$, respectivamente) e G50 ($p = 0,00101$; $p < 0,00101$; $p < 0,001$, respectivamente).

Figura 5 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células vivas NOK no período de 24 e 72 horas



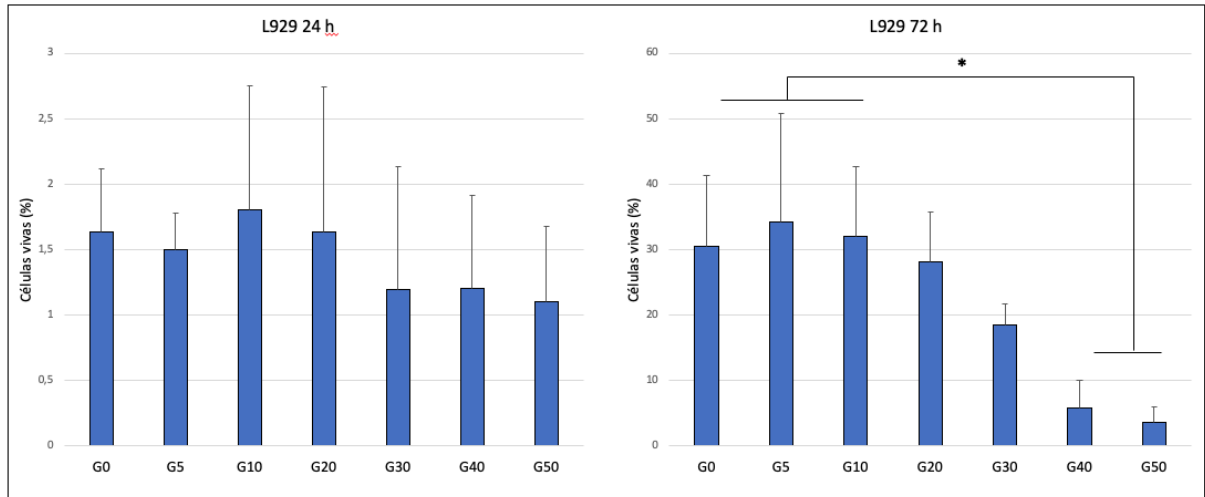
Fonte: Autoria própria

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

Com relação às células L929 os valores da porcentagem de células vivas estão representados na figura 6. Não foi possível nenhuma diferença entre os grupos no período experimental de 24 horas. Entretanto, no período de 72 horas pode-se observar um aumento no percentual nos grupos G0, G5, G10 e G20 quando

comparado aos grupos G40 ($p = 0,028$; $p < 0,0393$; $p < 0,0236$, respectivamente). e G50 ($p = 0,0116$; $p < 0,0166$; $p < 0,0285$; $p < 0,00096$, respectivamente).

Figura 6 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células vivas L929 no período de 24 e 72 horas



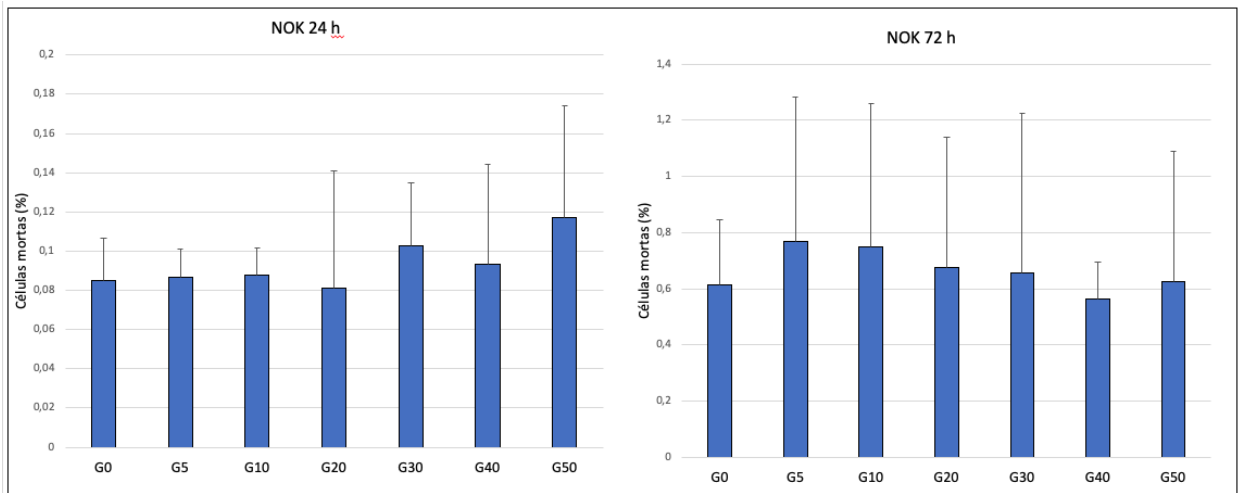
Fonte: Autoria própria

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

5.4 Análise da porcentagem de células mortas

A porcentagem de células mortas da linhagem NOK, representado na figura 7, mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais em nenhum período experimental.

Figura 7 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células mortas NOK no período de 24 e 72 horas

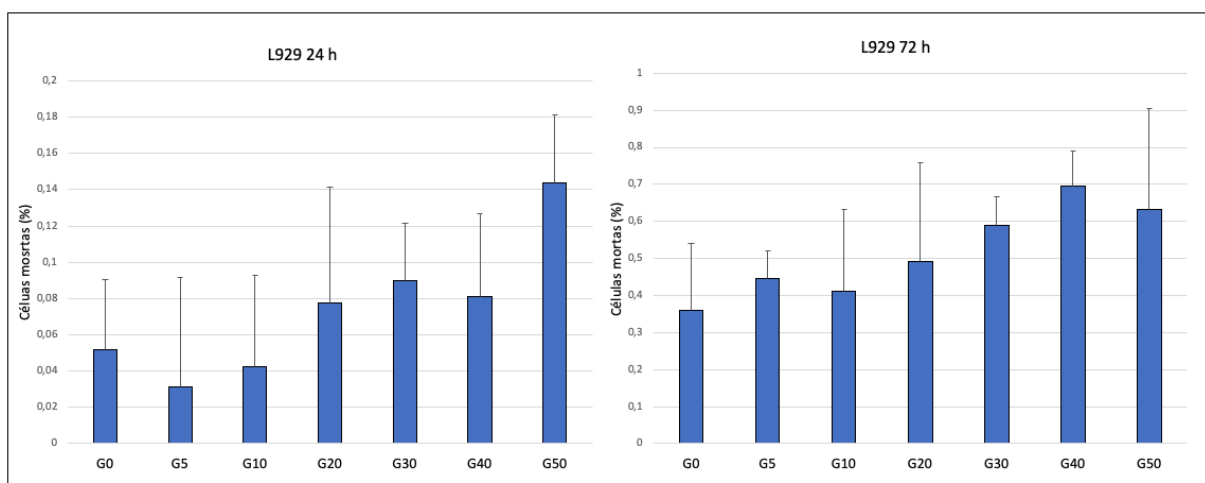


Fonte: Autoria própria

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

Os valores médios referente à porcentagem de células mortas da linhagem L929 observado na figura 8, mostram nenhuma diferença entre os grupos experimentais nos períodos estudados. Entretanto, no período de 72 h observa-se uma maior densidade de células mortas em todos os grupos quando comparado ao período anterior.

Figura 8 – Gráfico representativo dos valores da porcentagem de células mortas L929 no período de 24 e 72 horas



Fonte: Autoria própria

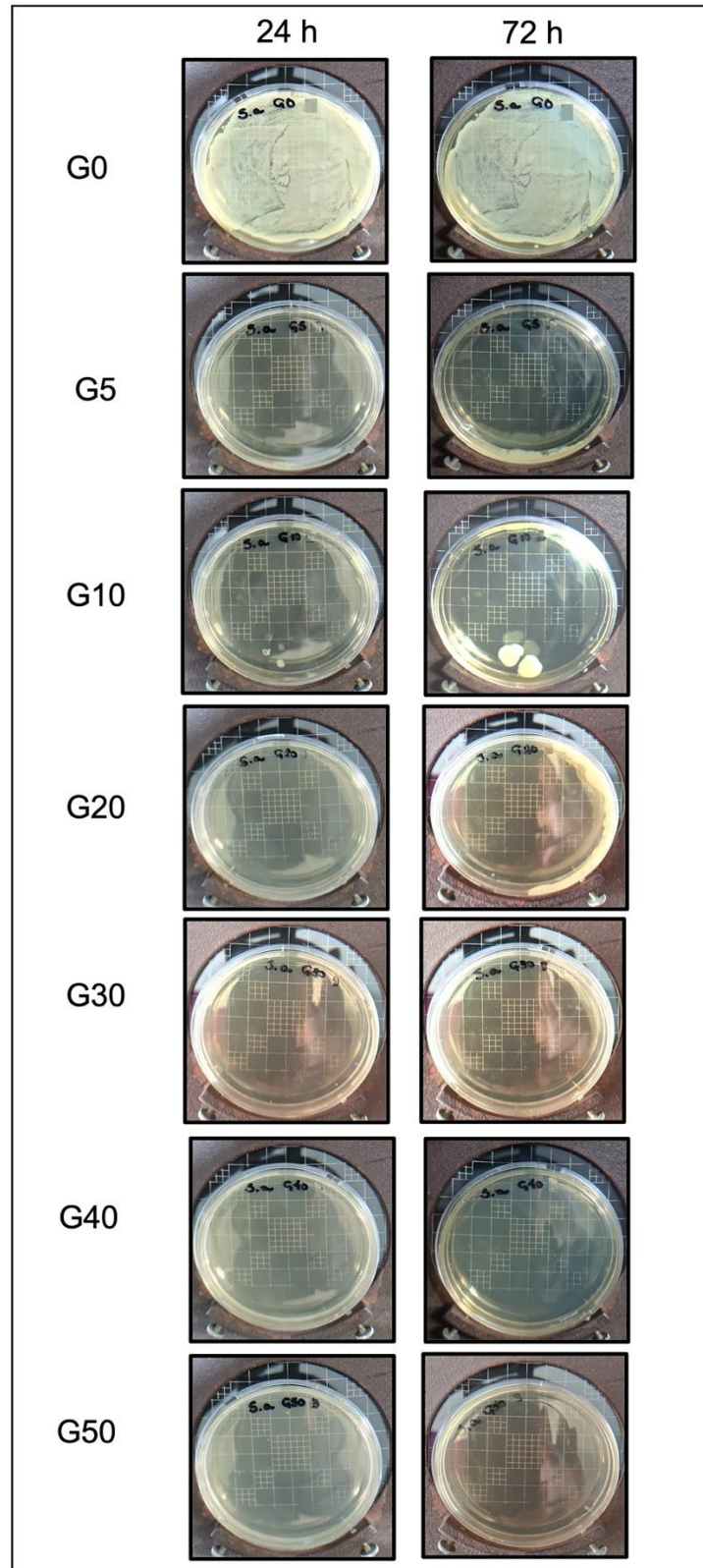
Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

5.5 Análise da UFC

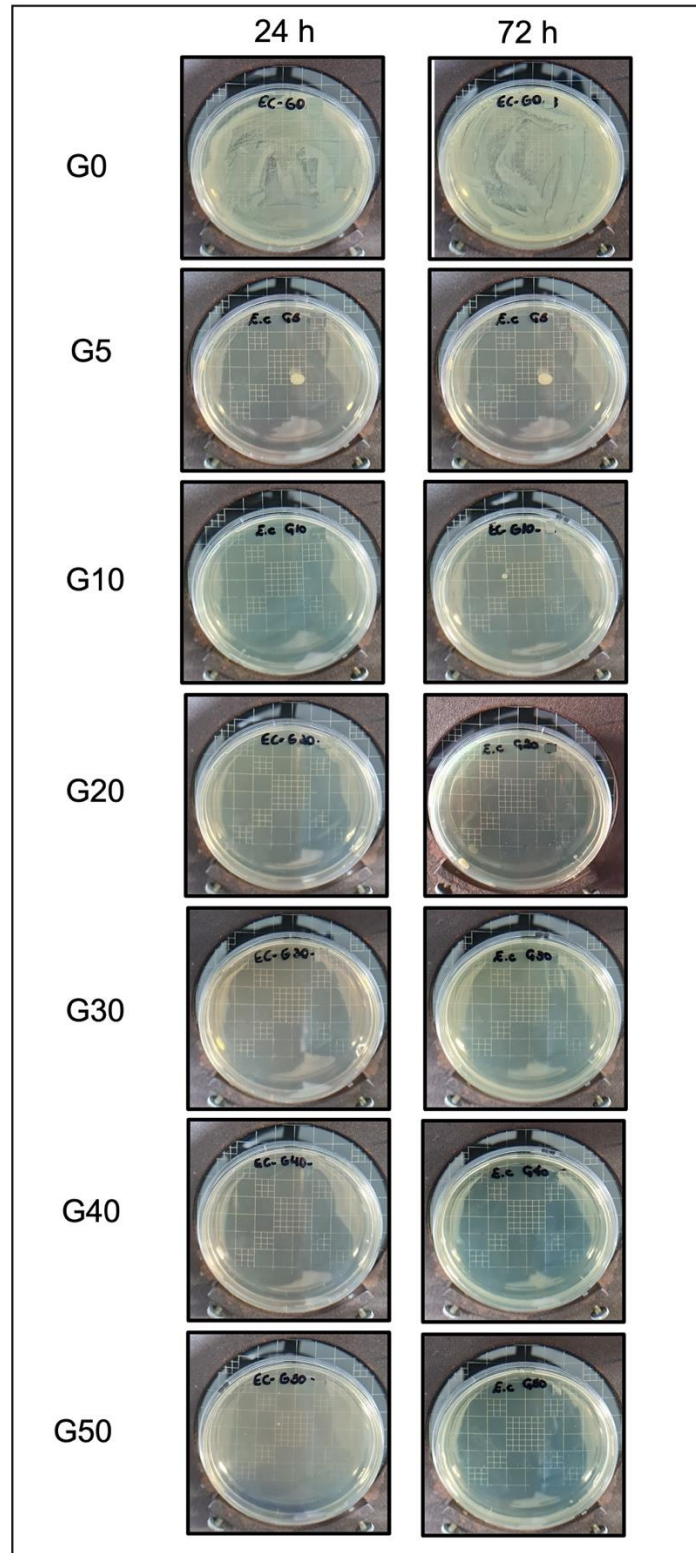
A figura 10 e 11 mostram as imagens representativas do ensaio microbiológico de 24 e 72 horas de cultivo de *S.aureus* e *E. coli*, respectivamente, com diferentes concentrações de ozônio.

Tanto para o micro-organismo *S. aureus* como para o *E. coli* foi possível verificar um aumento na UFC no grupo G0 quando comparado aos demais grupos experimentais em ambos os períodos avaliados. Ainda, foi observado uma pequena quantidade de UFC nos grupos G5 e G10 e G20 e ausência de UFC nos grupos G30, G40 e G50.

Figura 9 – Imagens representativa da UFC de *S.aureus*



Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

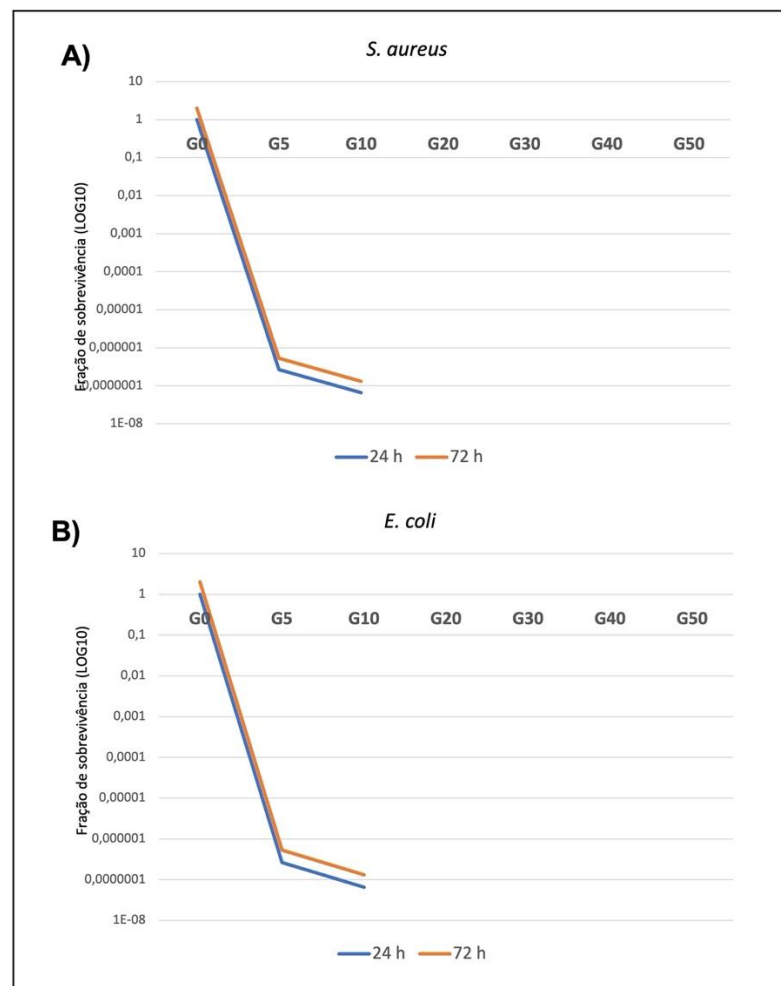
Figura 10 – Imagens representativa da UFC de *E. coli*

Controle (G0); Ozônio na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ (G5); 10 $\mu\text{g/mL}$ (G10); 20 $\mu\text{g/mL}$ (G20); 30 $\mu\text{g/mL}$ (G30); 40 $\mu\text{g/mL}$ (G40); 50 $\mu\text{g/mL}$ (G50).

5.6 Análise da fração de sobrevivência

A fração de sobrevivência, representado na figura 12 referente à *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). A análise estatística mostrou que houve redução da fração de sobrevivência em todos os grupos tratados com O₃ em ambos os micro-organismos.

Figura 11 – Gráfico representativo da fração de sobrevivência de *S.aureus* (A) e *E. coli* (B).



6 DISCUSSÃO

Embora a ozonioterapia seja amplamente aplicada no reparo de feridas e como agente antimicrobiano, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares relacionados a esse processo. A presente estudo investigou a influência da ozonioterapia em diferentes concentrações sob a citotoxicidade de células NOK (queratinócitos) e L929 (fibroblastos). Os principais resultados mostram a ozonioterapia nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL apresentaram os maiores valores de viabilidade de células NOK e L929, assim como uma maior densidade e porcentagem de células vivas no período experimental de 72 horas quando comparado às demais concentrações avaliadas. No entanto, não foi possível avaliar a diferença entre a porcentagem de células mortas entre os grupos experimentais. Ademais, todas as concentrações avaliadas exerceram redução da UFC na fração de sobrevivência de *S. aureus* e *E. coli*, mostrando efeito antimicrobiano.

A elevada incidência de feridas cutâneas observadas atualmente impacta na importância de desenvolvermos estratégias terapêuticas que otimizem o reparo tecidual. Embora exista o uso disseminado da ozonioterapia no tratamento de distúrbios dermatológicos, há uma carência na literatura de estudos que verifiquem efeitos adversos agudos provenientes de diferentes concentrações de ozônio a fim de encontrar parâmetros seguros e efetivos desta modalidade terapêutica para a prática clínica.

Como citado anteriormente, o fechamento de feridas cutâneas envolve eventos moleculares e celulares ordenados e complexos, como a inflamação, proliferação (reepitelização e formação de tecido de granulação) e a fase tardia de remodelamento do reparo (WOODLEY et al., 2017; GOODARZI et al., 2018). Esses eventos envolvem a coordenação de dezenas de tipos de células e proteínas da MEC, que são importantes para controlar os estágios do processo de reparo. Com relação às células, destaca-se os neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, essenciais para o reparo de feridas (RIPPA et al., 2019). Assim, é de extrema importância a utilização de terapias que influenciem positivamente a viabilidade dessas células e não prejudique sua função.

A ozonioterapia é frequentemente utilizada no tratamento de feridas cutâneas (ZENG et al. 2014; FITZPATRICK et al. 2018; IZADI et al. 2018). Apesar dos seus

efeitos antimicrobianos e reparadores bem descritos na literatura, a toxicidade também foi relatada (Valacchi et al. 2011; UZUN et al., 2012). Thiele et al 1997 descrevem que o ozônio (10 ppm) causou modificação e/ou oxidação dos constituintes lipídicos e proteicos da epiderme de camundongos. Estudo de Uzun, 2012 observaram que a ozonioterapia intralesional aumentou a dor e a ferida evoluiu para a necrose tecidual. Entretanto, os autores não citam os parâmetros utilizados na terapia dos estudos.

No presente estudo, as análises de citotoxicidade celular foram realizadas pelos métodos de redução de *AlamarBlue*[®] e pelo método kit *Live/Dead*[®]. Ambos objetivaram avaliar a viabilidade celular (células da epiderme e derme metabolicamente ativas) mimetizando as circunstâncias e condições *in vivo* de um tratamento de ozonioterapia em diferentes concentrações.

No ensaio de viabilidade pelo método de redução de *AlamarBlue*[®], foi verificado uma diminuição na viabilidade das células NOK e L929 quando expostas ao ozônio da concentração de 40 e 50 µg/mL em 72 horas de cultivo. Entretanto, quando os diferentes grupos foram avaliados pelo método de viabilidade/citotoxicidade celular pelo kit *Live/Dead*[®], foi observado que os todos os grupos apresentaram uma grande presença de células vivas e poucas células mortas (semelhante ao grupo controle), indicando que o ozônio em todas as concentrações não apresentou citotoxicidade, sendo assim, compatíveis com as células da linhagem NOK e L929. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Borges et al. (2018), nos quais avaliaram o ozônio nas concentrações de 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25µg/mL de ozônio em células L929 (fibroblastos) HaCat (queratinócitos), e não observaram citotoxicidade para essa linhagem celular. Ainda, Costanzo et al. (2015) avaliaram o ozônio a uma concentração de 20µg/mL em células HeLa (linhagem de células de câncer cervical) por 24h e 48h, e não observaram citotoxicidade significativa nem apoptose para essa linhagem celular. Nosso estudo também não resultou em efeitos citotóxicos do ozônio em concentrações de até 50µg/mL para queratinócitos ou fibroblastos, conforme demonstrado pelos resultados de células mortas.

Ainda, um aumento considerável da viabilidade e porcentagem de fibroblastos e queratinócitos foram observados nas células tratadas com 5, 10 e 20 µg/mL de ozônio quando comparadas às demais doses. A proliferação celular é um evento chave no processo de reparo de feridas, sendo a proliferação dos fibroblastos e queratinócitos especialmente importantes durante a segunda fase, quando há a

necessidade de formação do tecido de granulação e contração da ferida. Com o aumento na proliferação de fibroblastos e queratinócitos como o observado no presente estudo, é possível sugerir que a ozonioterapia pode exercer uma melhor eficiência no processo de reparo de uma ferida cutânea, visto que potencializa a formação do tecido de granulação e reepitelização, acelerando o fechamento da ferida, conforme previamente descrito em estudos clínicos e experimentais (HASSANIEN, et al. 2018; SONG et al. 2017; ZHOU et al. 2016). Outrossim, foi demonstrado que a exposição ao ozônio aumentou a expressão de proteína proliferação celular (PCNA) e K10, uma queratina expressa em queratinócitos suprabasais bem diferenciados em tecidos epitelial (PARAMIO et al., 1999). Esses achados sugerem que a ozonioterapia pode induzir a proliferação e diferenciação dos queratinócitos, contribuindo para o reparo da pele.

Como citado anteriormente, é possível evidenciar os efeitos antimicrobianos do ozônio na inativação de bactérias, fungos, protozoários e vírus relatados por vários autores em diferentes situações clínicas, assim como na desinfecção de ambientes e superfícies (SUH et al., 2019; AZARPAZHOOH et al., 2008; SMITH et al., 2017; POLYDOUROU et al., 2012; THANOMSUB et al., 2002; GULMEN et al., 2013). Entretanto, devido a alta dissociação do O₃ torna-se difícil a padronização de doses e a o tempo de tratamento ideal para desinfecção de micro-organismos presentes em feridas cutâneas. Estudos que utilizaram a ozonioterapia para essa finalidade, não deixam claro as concentração e tempo de ozonização, e, muitas vezes produzem resultados dúbios e passíveis de questionamentos, dificultando a desmistificação e consolidação da ozonioterapia, como terapia integrativa na prática clínica.

No presente estudo, a ozonioterapia em todas as concentrações foi capaz de reduzir e/ou erradicar a UFC e reduzir a fração de sobrevivência de *S. aureus* e *E. coli*, inferindo a ação antimicrobiana da técnica. Cabe enfatizar que ozonioterapia nas concentrações acima de 30µg/mL proporcionaram erradicação completa de ambas as bactérias (gram-positiva e gram-negativa) nos períodos experimentais avaliados. Existem hipóteses para esclarecer o mecanismo antimicrobiano da ação do ozônio. Um deles descreve que, devido o fato do gás ser um potente oxidante, o mesmo interage com glicolipídeos, glicoproteínas ou certos aminoácidos que estão presentes da parede da célula bacteriana e ocasiona o rompimento da estrutura e a morte imediata do micro-organismo. Especificamente, alguns estudos mostraram o potencial da ozonioterapia em eliminar *E. coli* e *S. aureus* resistente à antibióticos (SILVA et al.,

2009; GULMEM et al., 2013; ALSAADI et al., 2024; GULMEM et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015; FONTES et al., 2012). Como é conhecido que *S. aureus* e *E. coli* são bactérias prevalentes em infecções de pele, as concentrações de O₃ avaliadas no presente estudo mostram-se promissoras para a aplicação clínica.

Desta forma, o presente estudo fornece importantes dados sobre o efeito da ozonioterapia no tratamento de feridas cutâneas crônicas infectadas. Destaca-se que é o primeiro ensaio *in vitro* investigando diferentes concentrações de ozonioterapia tanto na citotoxicidade de queratinócitos (NOK) e fibroblastos (L929) e assim como a efetividade em *S.aureus* e *E. coli*. Embora nos resultados microbiológicos as concentrações de ozônio acima de 30µg/mL foram capazes de gerar erradicação completa dos micro-organismos, as concentrações de 5,10 e 20µg/mL foram as que mostraram os melhores resultados de viabilidade celular, além de promoverem ação antimicrobiana adequada.

Assim, como parte do esforço contínuo em obter dosimetrias clínicas promissoras de ozonioterapia, o presente estudo recomenda que as doses de 5,10 e 20 µg/mL poderiam ser impostas como modalidades terapêuticas segura para o tratamento de feridas cutâneas, visto que não mostram citotoxicidade celular, promoveram ação antimicrobiana, além de ser bastante econômico, podendo levar à uma redução acentuada de adversidades e custos médicos.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo apresentamos evidências de que a ozonioterapia não apresentou efeito citotóxico para as células da linhagem NOK e L929 e que as concentrações de 5,10 e 20 μ g/mL apresentam os melhores potenciais reparadores, apresentando uma resposta dose-dependente da ozonioterapia, assim como seu potencial antimicrobiano. Este tipo de evidência experimental é necessário para o desenho de outros ensaios clínicos envolvendo o uso de ozonioterapia em distúrbios dermatológicos que visem potencial reparador.

REFERÊNCIAS

AGHAEI, M., et al. The therapeutic effect of ozonated olive oil plus glucantime on human cutaneous leishmaniasis. **Iran J Basic Med Sci**, v. 22, n. 1, p. 25-30, 2019.

AL-SAADY, H. et al. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus* in vitro: a potential irrigant for infected wounds. **International wound journal**, v. 13, n. 5, p. 936–942, 2016.

AZARPAZHOOH, A. & LIMEBACK, H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. **J Dent.**, v. 36, p. 104- 116, 2008.

BOCCI, V., ZAZARDI, I. & TRAVAGLI, V. Ozonation of human HIV-infected plasmas for producing a global vaccine: How HIV-patients may help fight the HIV pandemia[J]. **Virulence**, v. 1, n. 3, p. 215-217, 2010.

DECLARAÇÃO DE MADRID SOBRE TERAPIA OZÔNICA. **Comitê Científico Internacional de Ozonioterapia – ISCO3**, v. 3., n. 3.

DEGLI, A. et al. Effectiveness of a Short-Term Treatment of Oxygen-Ozone Therapy into Healing in a Posttraumatic Wound. **Case Rep Med.**, v. 22, n. 5, p. 1-5, 2016.

AL-SAADY, H. et al. Ozonated saline shows activity against planktonic and biofilm growing *Staphylococcus aureus* in vitro: a potential irrigant for infected wounds. **Int Wound J.**, v. 13, n. 5, p. 936-942, 2016.

BARONI, A., et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol.**, v. 30, n. 3, p. 257-262, 2012.

BOCCI, V; LARINI, A; MICHELI, V. Restoration of Normoxia by Ozone Therapy May Control Neoplastic Growth: a review and a working hypothesis. **The Journal Of Alternative And Complementary Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 257-265, abr. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/acm.2005.11.257>>. Acesso em 15 out.

BOCCI, V. *et al.* Reliable and effective oxygen-ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion and ozone rectal insufflation. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, [s.l.], v. 64, n. 4, p. 482-489, dez. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01427.x>>. Acesso em 19 out.

BOCCI, V. *et al.* Validity of Oxygen-Ozone Therapy as Integrated Medication Form in Chronic Inflammatory Diseases. **Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 127-138, dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/1871529x1502151209114642>>. Acesso em 19 out.

BOCCI, V. *et al.* The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal Research Reviews*, v. 29, n. 4, p. 646-682, 2009.

BOCCI, V.; ZANARDI, L.; TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **Journal Of Translational Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 2-11, 17 maio 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-9-66>>. Acesso em 15 out.

BOCCI, V.A. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. **Archives Of Medical Research**, [s.l.], v. 37, n. 4, p. 425-435, maio 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>>. Acesso em 19 out. 2021.

BONIFANT, H; HOLLOWAY, S. A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. **British Journal Of Community Nursing**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 28-33, mar. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12968/bjcn.2019.24.sup3.s28>>. Acesso em 19 out. 2021.

BORENA, B.M. *et al.* Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: state-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. **Cellular Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 1-23, 2015. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/374049>>. Acesso em 21 out. 2021.

BORGES, G.Á. *et al.* In vitro evaluation of wound healing and antimicrobial potential of ozone therapy. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 45, n. 3, p. 364-370, 2017.

BOWER, S; FRANCO, E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. **Am Fam Physician**. [s.l.], v. 101, n. 3, p. 159-166, fev. 2020. Disponível em: <<https://www.aafp.org/afp/2020/0201/p159.html>>. Acesso em 21 out. 2021.

CHIRUMBOLO, S. et al. Insights on the mechanisms of action of ozone in the medical therapy against COVID-19. **Int Immunopharmacol.** v. 96, n. 10777, 2021.

DEGLI AGOSTI, I. et al. Effectiveness of a Short-Term Treatment of Oxygen-Ozone Therapy into Healing in a Posttraumatic Wound. **Case Rep Med.**, v. 10, n. 1155, p.1-5, 2016.

DI PAOLO, N., BOCCI, V., GAGGIOTTI, E. Ozone Therapy. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 27, n. 3, p. 168-175, 2004.

ELVIS, AM; EKTA, JS. Ozone therapy: a clinical review. **Journal Of Natural Science, Biology And Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 66, jun. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/0976-9668.82319>>. Acesso em 15 out.

FATHI, A. M., MAWSOUF, M. N. & VIEBAHN-HÄNSLER, R. Ozone Therapy in Diabetic Foot and Chronic, Nonhealing Wounds. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, n. 6, p. 438-450, 2012.

FITZPATRICK, E; HOLLAND, O.J; VANDERLELIE, J.J. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. **Int Wound J.** [s.l.], v. 15, n. 4, p. 633-644, ago. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7949634/>>. Acesso em 21 out. 2021.

GOODARZI, P. *et al.* Tissue Engineered Skin Substitutes. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [s.l.], p. 143-188, jun. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/5584_2018_226>. Acesso em 19 out. 2021.

GULMEN, S. et al. Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis. **J Surg Res.**, v. 185, p. 64-69, 2013.

GURTNER, C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, [s.l.], v. 453, n. 7193, p. 314-321, mai. 2008. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nature07039> >. Acesso em 21 out. 2021.

HASSANIEN, M. et al. Non-invasive Oxygen-Ozone therapy in treating digital ulcers of patients with systemic sclerosis. **Acta reumatologica portuguesa**, v. 43, n. 3, p. 210-216, 2018.

IZADI, M. et al. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. **Diabetes Metab Syndr.** [s.l.], v.13, n. 1, p. 822-825, fev. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871402118305496?via%3Dihub>>. Acesso em 21 out. 2021.

IZADI, M. et al. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone. **Medicine**, Iran, v. 97, n. 48, p.12505, ago. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6283103/>>. Acesso em 11 out.

JOHNSON, J.A. et al. The Nrf2-ARE Pathway. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1147, n. 1, p. 61-69, dez. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1196/annals.1427.036>>. Acesso em 15 out.

KARGOZAR, S. et al. Nanotechnology for angiogenesis: opportunities and challenges. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 49, n. 14, p. 5008-5057, out. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/c8cs01021h>>. Acesso em 11 out.

KESIK V. et al. Ozone Ameliorates Doxorubicine-Induced Skin Necrosis - results from an animal model. **The International Journal Of Lower Extremity Wounds**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 248-254, jul. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1534734615597863>>. Acesso em 11 out.

KHATRI, I., MOGER, G. & KUMAR, N. A. Evaluation of effect of topical ozone therapy on salivary Candidal carriage in oral candidiasis. **Indian J Dent Res.**, v. 26, n. 2, p. 158-162, 2015.

KHAVKIN, J; ELLIS, D.A. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plast Surg Clin North Am.** [s.l.], v. 19, n. 2, p. 229-234, mai. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsc.2011.04.003/>>. Acesso em 21 out. 2021.

KIM H.S. et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal Of Korean Medical Science**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 368, jun.

2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2009.24.3.368>>. Acesso em 15 out.

KIRSNER, R.S. The wound healing society chronic wound ulcer healing guidelines update of the 2006 guidelines-blending old with new. **Wound Repair And Regeneration**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 110-111, jan. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/wrr.12393>>. Acesso em 19 out. 2021.

KOÇYIĞIT, A. *et al.* The effect of ozone treatment on remote organ myocardial injury in an aortic ischemia-reperfusion model. **The Turkish Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 207-213, abr. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5606/tgkdc.dergisi.2018.15484>>. Acesso em 11 out.

LEDGER, L. *et al.* Patient involvement in pressure ulcer prevention and adherence to prevention strategies: an integrative review. **International Journal Of Nursing Studies**, [s.l.], v. 101, p. 103449, jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2019.103449>>. Acesso em 19 out. 2021.

LEONG, H. N. *et al.* Management of complicated skin and soft tissue infections with a special focus on the role of newer antibiotics. **Infect Drug Resist.**, v. 11, p. 1959-1974, 2018.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. *et al.* Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 523, n. 1-3, p. 151-161, out. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.08.020>>. Acesso em 11 out.

NIGAM, Y; KNIGHT J. Exploring the anatomy and physiology of ageing: part 11--The skin. **Nurs Times**. [s.l.], v. 104, n. 49, p. 24-25, dez. 2008. Disponível em: <<https://www.nursingtimes.net/roles/older-people-nurses-roles/exploring-the-anatomy-and-physiology-of-ageing-part-11-the-skin-08-12-2008/>>. Acesso em 19 out. 2021.

ORTINES, R. V *et al.* Neutralizing Alpha-Toxin Accelerates Healing of Staphylococcus aureus-Infected Wounds in Nondiabetic and Diabetic Mice. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 62, n. 3, p. 2288, 2018.

PATIL, S *et al.* Assessing the microbial oxidative stress mechanism of ozone treatment through the responses of Escherichia coli mutants. **J Appl Microbiol.**, v. 111, n. 1, p. 136-144, 2011.

PARAMIO, J. M et al. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. **Mol Cell Biol.**, v. 19, p. 3086–3094, 1999.

POLYDOROU, O. et al. The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of in vitro evaluation[J]. **Clin Oral Investig**, v. 16, n. 2, p. 545-550, 2012.

RE, L. et al. Ozone Therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. **Archives Of Medical Research**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 17-26, jan. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.07.005>>. Acesso em 15 out.

REZAI, F; MOMENI-MOGHADDAM, M; NADERI-MESHKIN, H. Regeneration and Repair of Skin Wounds: various strategies for treatment. **The International Journal Of Lower Extremity Wounds**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 247-261, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1534734619859214?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed&>. Acesso em 21 out. 2021.

RIPPA, A.L; KALABUSHEVA, E.P; VOROTELYAK, E.A. Regeneration of Dermis: scarring and cells involved. **Cells**, [s.l.], v. 8, n. 6, p. 607, jun. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/cells8060607>>. Acesso em 19 out. 2021.

RODRIGUES, K. L. et al. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 261–270, 2004.

ROSUL, M. V., PATSKAN, B. M. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus. **Wiad Lek.**, v. 69, n. 1, p. 7-9, 2016.

SAGAI, M.; BOCCI, V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: is healing induced via a mild oxidative stress?. **Medical Gas Research**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 29, dez. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/2045-9912-1-29>>. Acesso em 15 out.

SCHWATZ, A.; SÁNCHEZ, M. Ozono therapy and its scientific foundations. **Revista Española de Ozonoterapia**, v.2, n.1, p. 199-23, 2012.

SEN C.K. *et al.* Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair Regen.** [s.l.], v. 17, n. 6, p. 763-771, nov. 2009.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810192/>>. Acesso em 21 out. 2021.

SHAH, P., SHYAM, A. K., SHAH, S. Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia. **Indian J Orthop.** v. 45, n. 4, p. 376-379, 2011.

SILVA, R. A. et al. Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum, **Acta Cir. Bras.**, v. 24, p. 124–127, 2009.

SMITH, N. L. et al. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Med Gas Res.**, v. 7, n. 3, p. 212-219, 2017.

SOLOVASTRU, L. G et al. Randomized, Controlled Study of Innovative Spray Formulation Containing Ozonated Oil and alfa-Bisabolol in the Topical Treatment of Chronic Venous Leg Ulcers. **Advances in Skin & Wound Care.**, v. 28, n. 9, p. 406-409, 2015.

SONG, M et al. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. **Mol Med Rep**, v. 17, p. 2449-2455, 2018.

SUH, Y. *et al.* Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. **Medical Gas Research**, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 163-167, set. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4103/2045-9912.266997>>. Acesso em 15 out.

THANOMSUB, B. et al. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria[J]. **J Gen Appl. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 193-199, 2002.

TRAVAGLI, V. *et al.* Ozone and Ozonated Oils in Skin Diseases: a review. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2010, p. 1-9, mai.2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2010/610418>>. Acesso em 19 out.

TURCIC, J et al. Effects of ozone on how well split-thickness skin grafts according to Thiersch take in war wounds. Results of prospective study. **Langenbecks Archiv fur Chirurgie.**, v. 380, n. 3, p. 144-148, 1995.

THIELE, J. J et al. In vivo exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. **Free Radic Biol Med.**, v. 23, n. 3, p. 385-391, 1997.

UZUN, G et al. Pitfalls of intralesional ozone injection in diabetic foot ulcers: a case study. **J Am Coll Clin Wound Spec.**, v. 4, p. 81-83, 2012.

VALACHI, G et al. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair Regen.**, v. 19, n. 1, p. 107-15, 2011.

WAINSTEIN, J et al. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. **Diabetes Technol Ther.**, v. 13, n. 12, p. 1255-1260, 2011.

WEN, Q. et al. A systematic review of ozone therapy for treating chronically refractory wounds and ulcers. **Int Wound J.**, v. 10, n. 5, 2021.

WONG, R. *et al.* The dynamic anatomy and patterning of skin. **Exp Dermatol.** [s.l.], v. 25, n. 2, p. 92-98, out. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/exd.12832>>. Acesso em 21 out. 2021.

WOODLEY, D.T. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis. **Dermatologic Clinics**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 95-100, jan. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2016.07.004>>. Acesso em 19 out. 2021.

ZANARDI, I. *et al.* Ozone: a multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 304-314, fev. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666151221150420>>. Acesso em 15 out.

ZANARDI, I. et al. Ozone: a multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity. **Curr Med Chem.**, v. 23, p. 304-314, 2016.

ZENG J; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **Int Immunopharmacol.** [s.l.], v.56, p. 235-241, mar. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576918300407?via%3Dihub/>>. Acesso em 21 out. 2021.

ZHANG, J. *et al.* Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2014, p. 1-8, jun. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/273475>>. Acesso em 11 out.

ZHOU, Y. T *et al.* Ozone Gas Bath Combined with Endovenous Laser Therapy for Lower Limb Venous Ulcers: A Randomized Clinical Trial. **J Invest Surg.**, v. 29, n. 5, p. 254-259, 2016.

ANEXO A – Comprovantes de participação em eventos e estudos publicados

Comitê de Ética e Pesquisa 1

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios parciais e final da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciadas no CEP, conforme Norma Operacional CNS nº 001/13, item XI.2.d.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1596934.pdf	12/01/2021 14:38:55		Aceito
Outros	Lattes_Karina_Volpe.pdf	12/01/2021 14:07:08	Livia Assis	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	Carta_resposta_CEP3.pdf	12/01/2021 14:05:55	Livia Assis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Revisado_3.docx	11/01/2021 18:02:57	Jynani Pichara Morais	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Revisado_3.docx	11/01/2021 18:02:10	Jynani Pichara Morais	Aceito
Outros	lattesJynani.pdf	20/07/2020 23:14:17	Jynani Pichara Morais	Aceito
Outros	lattesLivia.pdf	20/07/2020 23:13:23	Jynani Pichara Morais	Aceito
Outros	DeclaracaoDeAnuencia.jpeg	20/07/2020 23:01:06	Jynani Pichara Morais	Aceito
Outros	CartaDeAnuencia.jpeg	20/07/2020 23:00:48	Jynani Pichara Morais	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoass.pdf	20/07/2020 22:54:17	Jynani Pichara Morais	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Comitê de Ética e Pesquisa 2



UNIVERSIDADE BRASIL



Continuação do Parecer: 4.788.453

Justificativa de Ausência	TCLE_Revisado_Endometriose_2_LA.docx	17/05/2021 09:46:33	Jynani Pichara Morais	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Revisado_Endometriose_2_LA.docx	17/05/2021 09:46:17	Jynani Pichara Morais	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_participacao_Jynani.pdf	09/04/2021 11:01:05	Jynani Pichara Morais	Aceito
Outros	LattesKarina.pdf	09/04/2021 10:59:15	Jynani Pichara Morais	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	16/02/2021 12:30:52	Jynani Pichara Morais	Aceito
Outros	lattesLivia.pdf	11/02/2021 15:45:59	Jynani Pichara Morais	Aceito
Outros	lattesJynani.pdf	11/02/2021 15:45:35	Jynani Pichara Morais	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

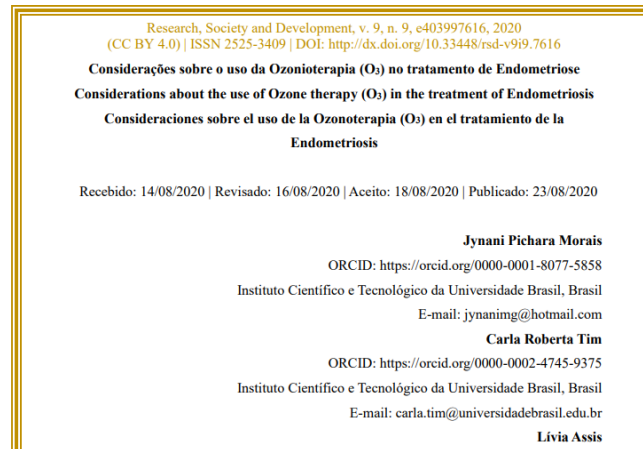
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

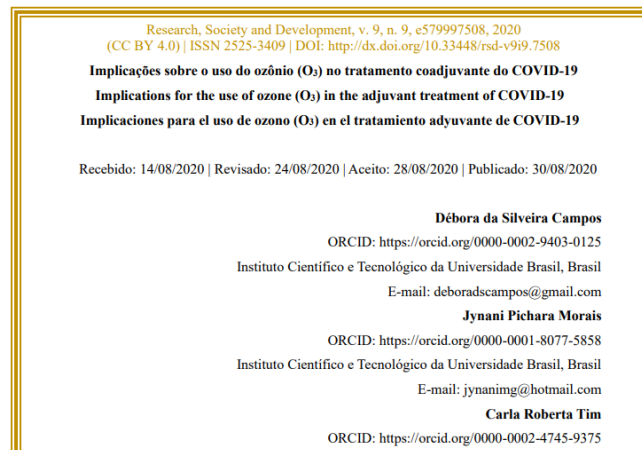
SAO PAULO, 17 de Junho de 2021

Assinado por:
SILVIA CRISTINA NUNEZ
(Coordenador(a))

Artigo publicado 1



Artigo publicado 2



Artigo publicado 3

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, eXX, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.XXXXX>

Potencial terapêutico da ozonioterapia como adjuvante na reabilitação da dor lombar crônica

Therapeutic potential of ozone therapy as an adjuvant in the rehabilitation of chronic low back pain

Potencial terapêutico de la ozonioterapia como coadyuvante en la rehabilitación del dolor lumbar

Recebido: 00/01/2022 | Revisado: 00/01/2022 | Aceito: 00/01/2022 | Publicado: 00/01/2022


Rafael Bastos Silva
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6042-9544>
Universidade Brasil, Brasil
E-mail: rafaelbastosilva@yahoo.com.br

Carla Roberta Tim
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4745-9375>
Universidade Brasil, Brasil
E-mail: carla.tim@universidadebrasil.edu.br

Thiago Rezzo
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5568-7688>
Universidade Brasil, Brasil
E-mail: thiasorezzo@gmail.com

Participação no Congresso Acadêmico e Tecnológico da Universidade Brasil 1

I CONTECBRASIL
I CONGRESSO ACADÊMICO E TECNOLÓGICO DA UNIVERSIDADE BRASIL
XIV Encontro de Iniciação Científica
VIII Encontro de Pós-Graduação
04 e 05 de Dezembro de 2020



UTILIZAÇÃO DO GÁS OZÔNIO NA INATIVAÇÃO DOS VÍRUS H1N1 E CORONAVÍRUS/MHV

Jynani Pichara Morais^{*,} Carla Roberta Tim, Livia Assis^{1,2}
Universidade Brasil, Instituto Científico e Tecnológico, Engenharia Biomédica, São Paulo, SP
clebermansano@yahoo.com.br

Resumo: O vírus influenza H1N1 causador da "gripe espanhola" e o coronavírus causador são responsáveis por milhões de mortes em todo o mundo, representando uma emergência pública e internacional. Desta forma, existe a necessidade imediata de buscar alternativas com potencial de promover a sanitização de superfícies e ambientes mitigando a propagação e disseminação destes vírus. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de sanitização ambiental do gás ozônio. Trata-se de um estudo laboratorial, descritivo e qualitativo. No trabalho apresentado, em todas as diluições o vírus foi inativado e as células cresceram, considerando assim que houve inibição de 99,99% da contaminação/infecção. Dessa maneira, observa-se que o contato do gás ozônio foi eficaz para a inativação/destruição de partículas virais do Coronavirus-strain MHV-3 e do Vírus da Influenza/H1N1.

Palavras-chave: Ozônio, Coronavírus, H1N1.

Participação no Congresso Acadêmico e Tecnológico da Universidade Brasil 2

II CONTECBRASIL
II CONGRESSO ACADÊMICO E TECNOLÓGICO DA UNIVERSIDADE BRASIL
XX Encontro de Iniciação Científica
XII Encontro de Pós-Graduação
V Seminário de Inovação e Empreendedorismo Acadêmico
IX Encontro Científico da Área de Saúde
19 a 20 de Novembro 2021



OZONIOTERAPIA: EFICIÊNCIA BIOLÓGICA NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Jynani Pichara Morais, Carla Tim, Livia Assis
¹ filiação dos autores (Instituição, Departamento, Cidade, UF)

¹ Jynani Pichara Morais

Descalvado, 20/11/2021

Participação como banca de graduação



DECLARAÇÃO

Declaro para fins acadêmicos que **Alexandre Sancho** orientou o (s) a (s) discente(s) **Cristina da Silva Lira** no desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “*Mecanismo de ação da ozonioterapia no tratamento para endometriose.*”, apresentado como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina pela Universidade do Grande Rio Prof. José de Souza Herdy – UNIGRANRIO. Tendo como membros da banca os professores **Jynani Pichara Morais** e **Wallace Pacienza Lima**.