

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

PRISCILA CRISTINA OLIVEIRA ZIGNANI PIMENTEL

**ABORDAGENS INOVADORAS NO REPARO DE FERIDAS COM
ÓLEO OZONIZADO E TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO**

**INNOVATIVE APPROACHES TO WOUND REPAIR WITH OZONATED
OIL AND PHOTOBIMODULATION THERAPY**

São Paulo – SP
2024

PRISCILA CRISTINA OLIVEIRA ZIGNANI PIMENTEL

**ABORDAGENS INOVADORAS NO REPARO DE FERIDAS COM
ÓLEO OZONIZADO E TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO**

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

Profa. Dra. Carla Roberta Tim
Orientadora

São Paulo – SP
2024

Inserir aqui a ficha catalográfica gerada pela Biblioteca da Universidade Brasil
(Solicitar a Ficha Catalográfica junto à Biblioteca da Universidade após a correção
da versão final realizada posteriormente a defesa).



TERMO DE APROVAÇÃO

PRISCILA CRISTINA OLIVEIRA ZIGNANI PIMENTEL

“ABORDAGENS INOVADORAS NO REPARO DE FERIDAS COM ÓLEO OZONIZADO E TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO”.

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

Documento assinado digitalmente
gov.br CARLA ROBERTA TIM
Data: 25/10/2024 16:22:07-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Dr.(a) Carla Roberta Tim (Presidente-Orientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br PATRICIA MICHELASSI CARRINHO AURELIANO
Data: 13/11/2024 10:54:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr.(a) Patrícia M. Carrinho Aureliano (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br NICEZIA VILELA JUNQUEIRA FRANQUEIRO
Data: 06/11/2024 20:33:27-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Dr.(a) Nicézia Vilela Junqueira (Membro Interno)

Documento assinado digitalmente
gov.br DENISE MIVANNI FERREIRA DEL CASTILLO
Data: 30/10/2024 21:23:43-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Dr.(a) Denise Viviane Ferreira Del Castillo (Membro Externo)

Documento assinado digitalmente
gov.br SABRINA PICCINELLI ZANCHETTIN SILVA
Data: 30/10/2024 08:25:25-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof(a). Dr.(a) Sabrina Piccinelli Zanchettin Silva (Membro Externo)

São Paulo, 29 de outubro de 20234

Presidente da Banca Prof(a). Dr.(a) Carla Roberta Tim (Presidente-Orientadora)

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

[Digite aqui]



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWWdo Respectivo 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 PortariaCAPES 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: "ABORDAGENS INOVADORAS NO REPARO DE FERIDAS COM ÓLEO OZONIZADO E TERAPIA POR FOTBIOMODULAÇÃO"

Autor(es):

Discente: **PRISCILA CRISTINA OLIVEIRA ZIGNANI PIMENTEL**

Assinatura: _____  Documento assinado digitalmente
PRISCILA CRISTINA OLIVEIRA ZIGNANI PIMENTEL
Data: 13/11/2024 16:15:31 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Orientador(a): **Carla Roberta Tim (Presidente-Orientadora)**

Assinatura: _____  Documento assinado digitalmente
CARLA ROBERTA TIM
Data: 29/10/2024 16:22:07 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Coorientador(a):

Assinatura: _____

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

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, pelo amor incondicional, apoio e sacrifícios que fizeram para me permitir perseguir meus sonhos acadêmicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me conceder força, sabedoria e discernimento ao longo desta jornada acadêmica. Sua constante presença foi fundamental para superar os desafios e alcançar este marco em minha vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Carla Roberta Tim, expresso minha mais profunda gratidão. Sua dedicação, orientação e apoio foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Brasil, por me conceder a bolsa de doutorado que tornou possível a realização deste estudo. Agradeço pela oportunidade de estudar em uma instituição de excelência, onde pude crescer academicamente e desenvolver minhas habilidades de pesquisa.

Expresso também minha gratidão a todos os professores, colegas de laboratório e amigos que contribuíram de diversas formas ao longo deste percurso. Seus *insights*, discussões e apoio foram inestimáveis e enriqueceram significativamente este trabalho.

Agradeço especialmente à minha família, pelo amor incondicional, incentivo e compreensão durante os momentos de ausência e dedicação à pesquisa. Suas palavras de encorajamento foram o alicerce que me sustentou nos momentos mais desafiadores.

Por fim, dedico este trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal.

RESUMO

As feridas de difícil reparo apresentam desafios significativos em seu contexto terapêutico devido à presença de microrganismos patogênicos e infecções associadas, resultando em atrasos no processo de reparação tecidual. O presente estudo teve como objetivo realizar um ensaio clínico para identificar o agente microbiano presente em feridas de difícil reparo de membros inferiores, avaliar os efeitos antimicrobianos do óleo ozonizado e investigar os benefícios da fotobiomodulação associada ao óleo ozonizado na terapêutica destas feridas. Em seguida, em um estudo *in vitro* investigar a cinética antimicrobiana do óleo ozonizado nos microrganismos encontrados nas feridas. Para o estudo foi utilizado óleo de girassol ozonizado comercial e a terapia por fotobiomodulação a LED, 660 nm, 30 segundos, pontual a 2 cm de distância no leito da ferida e nas margens pontual em contato com a pele, 120 mW, 3,6 J por ponto. O procedimento foi realizado 3 vezes por semana, por um período de 12 semanas. Os resultados clínicos indicaram uma melhora significativa nas lesões tratadas com óleo ozonizado e fotobiomodulação, evidenciada pela redução nos sinais de infecção, presença de tecido de granulação, diminuição da área da ferida e, em alguns casos, o completo fechamento da ferida. Entre os microrganismos identificados estão *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, todos demonstrando resistência aos antibióticos testados. Os resultados obtidos *in vitro* revelaram que o óleo ozonizado exibiu eficácia na redução e eliminação de unidades formadoras de colônias em todos os microrganismos testados, quando submetidos a concentrações consideradas baixas, variando de 1,6 % a 12,5 %, evidenciando atividade antibacteriana. Em conclusão, o óleo ozonizado, associado à terapia por fotobiomodulação, evidenciou eficácia no tratamento de feridas de difícil reparo. Contudo, são necessários novos ensaios clínicos para estabelecer protocolos de tratamento mais aprimorados.

Palavras-chave: Ferida crônica. Óleo ozonizado. Terapia de fotobiomodulação. Atividade antimicrobiana. Resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Hard-to-heal wounds present significant challenges in their therapeutic context due to the presence of pathogenic microorganisms and associated infections, thus resulting in delays for the tissue-healing process. The present study aimed to carry out a clinical trial to identify the microbial agent present in hard-to-heal wounds on the lower limbs, assess the antimicrobial effects of ozonated oil and examine the benefits of photobiomodulation combined with ozonated oil in the treatment of those wounds. Then we examined the antimicrobial kinetics of ozonated oil on microorganisms found in wounds by an in vitro study. For this study, some commercial ozonated sunflower oil was used as well as the LED photobiomodulation therapy, 660 nm, 30 seconds, punctual 2 cm away on the wound bed and on the margins in contact with the skin, 120 mW, 3.6 J per point. The procedure was performed three times a week, for a period of 12 weeks. The clinical results evidenced a significant healing of injuries treated with ozonated oil and photobiomodulation, evidenced by a reduction in traces of infection, presence of granulation tissue, wound area reduction and, in some cases, full wound closure. Among the microorganisms identified are *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*, all proved resistant to the antibiotics tested. The results obtained in vitro revealed that the ozonated oil was effective in reducing and eliminating colony-forming units in all microorganisms tested when subjected to concentrations deemed low, ranging from 1.6% to 12.5%, demonstrating antibacterial activity. In conclusion, ozonized oil, associated with photobiomodulation therapy, demonstrated efficacy in the treatment of wounds that are difficult to repair. However, new clinical trials are necessary to establish more improved treatment protocols.

Keywords: Chronic wound. Ozonated oil. Photobiomodulation therapy. Antimicrobial activity. Antimicrobial resistance.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

O presente estudo teve como objetivo realizar um ensaio clínico para identificar o agente microbiano presente em feridas de difícil reparo de membros inferiores, avaliar os efeitos antimicrobianos do óleo ozonizado e investigar os benefícios da fotobiomodulação associada ao óleo ozonizado no tratamento destas feridas. Em seguida, em um estudo *in vitro* investigar a cinética antimicrobiana do óleo ozonizado nos microrganismos encontrados nas feridas. Foi utilizado óleo de girassol ozonizado comercial e a terapia por fotobiomodulação. Os resultados clínicos indicaram uma melhora significativa nas lesões tratadas com óleo ozonizado e fotobiomodulação, evidenciada pela redução nos sinais de infecção, presença de tecido de granulação, diminuição da área da ferida e, em alguns casos, o completo fechamento da ferida. Entre os microrganismos identificados nas feridas estão *Klebsiella sp*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, todos demonstrando resistência aos antibióticos testados. Os resultados obtidos *in vitro* revelaram que o óleo ozonizado exibiu eficácia na redução e eliminação de unidades formadoras de colônias em todos os microrganismos testados. Em conclusão, o óleo ozonizado, associado à terapia por fotobiomodulação, representa um recurso promissor para o tratamento de feridas de difícil reparo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da metodologia de microdiluição em caldo.....	24
Figura 2 - Achados macroscópicos das feridas avaliadas.....	29
Figura 3 – Concentração inibitória mínima e bactericida da <i>Klebsiella sp.</i>	34
Figura 4 – Concentração inibitória mínima e bactericida da <i>Escherichia coli.</i>	34
Figura 5 – Concentração inibitória mínima e bactericida da <i>Staphylococcus epidermidis.</i>	34
Figura 6 - Comparação entre os microrganismos cultivados em meio de cultura após 320 minutos de ação do óleo ozonizado e microrganismos cultivados em meio de cultura após 320 minutos de ação do óleo ozonizado e irradiado com LED.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis sociodemográficas dos pacientes entrevistados neste estudo .	26
Tabela 2 - Características das feridas dos pacientes avaliados neste estudo	27
Tabela 3 - Análise do Índice de Reparo	31
Tabela 4 - Microrganismos isolados de feridas de difícil reparo dos pacientes atendidos.....	32
Tabela 5 - Antibióticos testados e frequência dos resultados.....	32
Tabela 6 - Concentração do óleo ozonizado e seus efeitos antimicrobiano.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 FERIDAS DE DIFÍCIL REPARO	16
3.2 ÓLEO OZONIZADO	18
3.3 TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 ESTUDO CLÍNICO	20
4.2 ESTUDO IN VITRO	23
4.3 ANÁLISE DOS DADOS	25
5 RESULTADOS	26
5.1 ESTUDO CLÍNICO	26
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA DOS PACIENTES	26
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FERIDAS	27
5.1.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	28
5.1.4 ÍNDICE DE REPARO DA FERIDA	30
5.1.5 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA	31
5.1.6 ANTIBIOGRAMA	32
5.2 ESTUDO IN VITRO	33
5.2.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	33
5.2.2 CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA	33
5.2.3 POTENCIAL ANTIMICROBIANO	35
5.2.4 INTERFERÊNCIA DO LED NA CINÉTICA BACTERICIDA E FUNGICIDA DO ÓLEO OZONIZADO	36
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	46
APÊNDICE B – Instrumento de Coleta de Dados	47
ANEXO A – Parecer CEP	51

1 INTRODUÇÃO

As feridas de difícil reparo são caracterizadas por lesões que requerem um período de reparo prolongado, excedendo três semanas; e, geralmente, não avançam nas etapas sequenciais do processo de reparo, frequentemente mantendo-se estagnadas na fase inflamatória (Wen, *et al.*, 2022; Martinengo, *et al.*, 2019). Vários fatores contribuem para essa estagnação na fase inflamatória e, conseqüentemente, para o atraso no processo de reparo de feridas de difícil reparo, sendo importante ressaltar que a presença de microrganismos e infecção local é um dos principais fatores que prejudicam significativamente o processo de reparo (Versey, *et al.*, 2021). Ocorrendo a infecção, o organismo desencadeia uma reação inflamatória prolongada, resultante da migração de leucócitos e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias. Ocorre também um aumento na atividade das metaloproteinases e uma diminuição na liberação de fatores de crescimento, prejudicando significativamente o processo de reparo da ferida (Gushiken, *et al.*, 2021).

Um fator adicional em relação à infecção, que torna o cenário ainda mais complexo, diz respeito à capacidade dos microrganismos em formar biofilmes na ferida. Biofilmes são definidos como aglomerados de microrganismos que se encontram imersos em uma matriz autogerada de substâncias poliméricas extracelulares, permitindo sua aderência mútua e/ou a uma superfície, resultando na formação de uma barreira (Wu, Cheng, Cheng, 2018). Esta barreira concede proteção aos microrganismos contra o sistema imunológico do hospedeiro, conferindo-lhes uma resistência de cem a mil vezes maior, aproximadamente, aos agentes antimicrobianos. Como consequência, esse fenômeno ocasiona um notável atraso no processo de reparo, representando um desafio substancial no âmbito do tratamento de feridas de difícil reparo (Patrúlea; Borchard; Jordan, 2020). Esse retardo no processo de reparação, originado pela existência de biofilmes, está intrinsecamente relacionado à contínua resposta inflamatória induzida no sistema imunológico do hospedeiro, podendo conduzir à desregulação da matriz extracelular da ferida, afetando a migração e proliferação celular, bem como a deposição apropriada dos componentes do tecido conjuntivo. Ademais, a liberação desequilibrada de mediadores inflamatórios pode ocasionar a desorganização dos processos de angiogênese e remodelação tecidual, atrasando, assim, a formação de uma matriz

extracelular de qualidade e, por conseguinte, prejudicando o processo adequado de reparo da ferida (Tomic-Canic *et al.*, 2020).

Aproximadamente 60% das feridas de difícil reparo abrigam microrganismos com a capacidade de formar biofilmes, destacando-se o *Staphylococcus aureus* e o *Pseudomonas aeruginosa* como os mais frequentemente associados a essa fenomenologia (Drago, *et al.*, 2019). Contudo pesquisas revelam a presença de uma diversidade de outros microrganismos nesse contexto, enfatizando a complexidade da microbiota em feridas de difícil reparo, abrangendo bactérias, fungos e vírus. Face à resistência manifestada pelas infecções relacionadas a biofilmes, torna-se imperativa a identificação das espécies microbiológicas preponderantes em cada ferida. Para tanto, análises de culturas de tecido ou coletas de *swabs* desempenham um papel crucial, proporcionando informações essenciais para a orientação de terapias apropriadas, considerando a sensibilidade desses microrganismos. Nesse contexto, a exploração de abordagens inovadoras se torna vital para enfrentar o desafio representado pela resistência das infecções relacionadas a biofilmes (Puca *et al.*, 2021; Kaiser; Wächter; Windbergs, 2021).

Diante da necessidade de terapias antimicrobianas para reparo tecidual, o ozônio tem sido estudado e apoiado como um agente terapêutico clínico avançado, para o tratamento de feridas de difícil reparo (Fitzpatrick *et al.*, 2018). A aplicação tópica de óleos ozonizados emerge como uma estratégia eficaz, proporcionando facilidade na manipulação, possibilidade de armazenamento prolongado, prevenção da degradação rápida, viabilização de tratamento extra-hospitalar e mitigação de riscos inerentes à utilização do ozônio em sua forma gasosa. A interação entre o ozônio e as duplas ligações dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais resulta na formação predominante de ozonídeos, particularmente 1,2,4-trioxolanos, e peróxidos, o que justifica a atividade antimicrobiana e estimula as propriedades de reparo do tecido (Anzolin, *et al.*, 2020; Zeng, Lu, 2018).

No contexto de terapias inovadoras, além da demanda por um agente terapêutico antimicrobiano como o óleo ozonizado, a fotobiomodulação tem sido objeto de investigação como uma abordagem terapêutica que otimiza o reparo de feridas cutâneas.

O tratamento com fotobiomodulação (PBM), que utiliza luz não ionizante, oferece benefícios terapêuticos que abrangem a melhora do reparo tecidual, modulação do processo inflamatório, o alívio da dor e a diminuição do estresse

oxidativo. A PBM estimula as mitocôndrias, resultando no aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP) e na liberação de fatores de crescimento. Esses fatores de crescimento se ligam a receptores na superfície celular, ativando vias de sinalização que promovem a proliferação, viabilidade e migração celular, contribuindo no processo de reparo das feridas de difícil reparo (Leyane, Jere, Houreld, 2021).

Nesse cenário, a hipótese do presente estudo é que a fotobiomodulação associada ao óleo ozonizado é benéfica e acelera o processo terapêutico de feridas de difícil reparo de membros inferiores.

2 OBJETIVOS

Investigar a eficácia do óleo ozonizado associado a fotobiomodulação no tratamento de feridas de difícil reparo em membros inferiores.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o agente microbiano envolvido em feridas de difícil reparo de membros inferiores.
- Analisar o perfil de resistência antimicrobiana.
- Investigar os efeitos antimicrobianos do óleo ozonizado.
- Investigar a cinética antimicrobiana do óleo ozonizado nos microrganismos encontrados nas feridas.
- Explorar os benefícios da fotobiomodulação associada ao óleo ozonizado no processo terapêutico de feridas de difícil reparo de membros inferiores.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FERIDAS DE DIFÍCIL REPARO

As feridas de difícil reparo são definidas como qualquer ruptura da integridade e da função fisiológica da pele, em maior ou menor extensão, resultante de traumas ou condições patológicas, que demonstram um processo reparativo prolongado (Gois,

et al.,2021). Consideradas relevantes em termos de saúde pública, acometem de 1 a 2% da população global, sendo o Brasil um país com notável incidência de lesões cutâneas de difícil reparo em membros inferiores (Vogt, *et al.*,2020).

O processo de reparo das feridas ocorre através das fases de inflamação, proliferação e maturação. Em lesões cutâneas de difícil reparo, este processo é caracterizado por uma duração crônica, demandando um período de reparo prolongado, com possíveis recorrências ou até mesmo ausência de cicatrização completa (Wen, *et al.*, 2022). O período de reparo prolongado dessas feridas está associado à manutenção da atividade inflamatória, resultante da infiltração abundante de neutrófilos, da presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e metaloproteinases. Condição essa, que pode ser causada por um processo infeccioso local, que ocorre em mais de 53% das feridas de difícil reparo, bem como pela presença de biofilme bacteriano, detectado em 60% a 90% dos casos (Mehl, *et al.*, 2020).

Os microrganismos associados ao processo infeccioso em feridas de difícil reparo incluem *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, entre outros (Versey et al., 2021). Dentre estes, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são particularmente destacados devido a sua prevalência na formação de biofilmes, embora muitas outras espécies, possam ser formadoras.

A presença de biofilme oferece resistência aos microrganismos, pois a matriz do biofilme protege os microrganismos dos antibióticos, evitando a penetração do medicamento em concentrações bactericidas. Além disso, o biofilme facilita a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos entre as bactérias, aumentando a tolerância antimicrobiana. Esta matriz é composta por uma complexa rede de polímeros extracelulares, incluindo polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que também protegem as bactérias contra a ação do sistema imunológico do hospedeiro (Diban, et al., 2023).

A fisiopatologia do biofilme é centrada na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro, conferindo ao biofilme uma vantagem na obtenção contínua de nutrientes e na sobrevivência a longo prazo. A matriz extracelular do biofilme protege os microrganismos contra a fagocitose e a ação de células do sistema imunológico,

criando um microambiente que favorece a persistência da infecção. A falha do sistema imunológico do hospedeiro em controlar a hiper inflamação e em converter a resposta imune inata em adaptativa resulta na interrupção do processo de reparo na fase inflamatória, impedindo a progressão para as fases proliferativa e de epitelização (Gajula et al., 2020).

A erradicação dos biofilmes é essencial para o tratamento eficaz de feridas de difícil reparo, para tal, é necessário identificar o microrganismo causador e buscar por agentes antimicrobianos que possam enfrentar o desafio representado pela resistência das infecções relacionadas a biofilmes (Wu, Cheng, Cheng, 2018).

3.2 ÓLEO OZONIZADO

A busca por agentes antimicrobianos de amplo espectro, que possam prevenir a resistência bacteriana e, ao mesmo tempo, manter efeitos colaterais mínimos, levou a um crescente interesse científico e clínico pelos óleos ozonizados. Estes óleos têm mostrado potencial significativo na inibição de uma variedade de microrganismos, oferecendo uma alternativa promissora aos antibióticos tradicionais. A capacidade dos óleos ozonizados de combater microrganismos resistentes, aliada ao seu perfil de segurança favorável, tem impulsionado sua aplicação em diversas áreas da saúde, especialmente no tratamento de feridas, onde a resistência aos antibióticos representa um desafio crítico (Ugazio, *et al.*, 2020).

O óleo ozonizado é obtido pela mistura de óleo vegetal, rico em ácidos graxos insaturados, com gás ozônio. O ozônio reage com as duplas ligações dos ácidos graxos e esse processo resulta principalmente na formação de ozonídeos (1,2,4-trioxolano) e peróxidos que são responsáveis pela ação antimicrobiana. Autores afirmam que veículos oleosos são capazes de manter o ozônio ativo por mais tempo, permitindo armazenamento (Zeng; Lu, 2018; Iorio, *et al.*, 2016)

O valor do índice de peróxido (IP) é um parâmetro crucial para determinar a dosagem e a aplicação clínica dos óleos ozonizados. Estima-se que valores baixos de IP, entre 80 mEq O₂/kg e 120 mEq O₂/kg, são principalmente utilizados em cosméticos devido à sua menor reatividade. Valores mais elevados de IP, na faixa de 200 mEq O₂/kg a 400 mEq O₂/kg, são significativamente mais eficazes em processos

de reparo de feridas. Valores de IP superiores a 400 mEq O₂/kg são necessários para obter efeitos antimicrobianos mais acentuados, sendo particularmente eficazes no combate a infecções. A medição precisa do IP deve ser realizada utilizando métodos adequados para garantir a eficácia e segurança do óleo ozonizado em suas diversas aplicações clínicas (Martínez-Sanchez, 2021).

O mecanismo de ação dos óleos ozonizados pode ser explicado por diversos fatores. Primeiramente, a oxidação direta promovida pelo trioxolano e lipoperóxidos destrói microrganismos, enquanto os compostos citotóxicos presentes no óleo, como trioxolano e aldeídos, inativam os mesmos por meio da interrupção de vias enzimáticas essenciais. Além disso, o óleo ozonizado facilita o processo de reparação de feridas por meio da liberação de fatores de crescimento, como PDGF, TGF- β e VEGF, que promovem a regeneração tecidual e finalmente, a oxidação local do tecido pelos componentes do óleo pode estimular a expressão dos mecanismos antioxidantes endógenos, favorecendo a reparação tecidual (Martínez-Sanchez, 2021).

Estudos têm demonstrado que o óleo ozonizado possui propriedades antimicrobianas no tratamento de feridas de difícil reparo, representando uma alternativa terapêutica eficaz e de baixo custo que deve ser implantada nos serviços públicos de saúde (Anzolin, 2020).

3.3 TERAPIA POR FOTOBIMODULAÇÃO

A fotobiomodulação consiste em um recurso terapêutico que tem demonstrado resultados, inclusive no tratamento de feridas de difícil reparo. Esta técnica envolve a aplicação de uma fonte de luz não ionizante sobre a pele, que induz a produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) por meio de um processo fotoquímico atuante principalmente nas mitocôndrias das células. Tal estimulação promove o aumento do metabolismo celular, acelerando, assim, o processo de reparação tecidual e adicionalmente proporcionando analgesia na área tratada (Bacelete, Gama, 2021).

O mecanismo de ação da fotobiomodulação baseia-se na absorção da luz emitida pelo *LASER* ou *LED (Light Emitting Diode)*, por cromóforos mitocondriais, especialmente o Citocromo C Oxidase (CCO). Esta absorção estimula o transporte de

elétrons nas mitocôndrias, desencadeando uma série de reações citoplasmáticas ou na membrana celular. Essas reações resultam em alterações no potencial da membrana, consumo de O₂ e síntese de DNA e RNA. Tais alterações moleculares aceleram a diferenciação e proliferação celular, aumentam a síntese de proteínas, resultando nos efeitos terapêuticos da fotobiomodulação: analgesia, modulação de processos inflamatórios e reparo tecidual (Salman, 2019).

Nos últimos anos, pesquisas sobre o uso da fotobiomodulação com *LASER* e *LED* em diversos comprimentos de onda, doses de aplicação e densidades de energia variadas têm se tornado frequentes na prática clínica de tratamento de feridas. Esses estudos demonstram resultados significativos no reparo tecidual com o uso de *LEDs*, sendo estes, de baixo custo e mais fáceis de manusear em comparação ao *LASER*, tornando-se uma excelente opção terapêutica para otimizar os resultados, contribuindo na redução dos custos e tempo de tratamento das feridas de difícil reparo (Baracho, *et al.*, 2023).

Com base nos benefícios mencionados, a fotobiomodulação com *LED* tem sido amplamente estudada, demonstrando ser eficaz no reparo tecidual de feridas, favorecendo a produção de colágeno, promovendo angiogênese e reduzindo a inflamação e o tamanho das feridas (Baracho, *et al.*, 2023).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um ensaio clínico de série de caso, realizado na Unidade Básica de Saúde Paulo Sano e Unidade Básica de Saúde Dr. Antônio Milton Zambom no município de Fernandópolis, que explorou os benefícios da fotobiomodulação associada ao óleo ozonizado no processo terapêutico de feridas de difícil reparo de membros inferiores. Seguido de um estudo experimental *in vitro* que investigou a cinética antimicrobiana do óleo ozonizado no Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, localizado na cidade de Fernandópolis-SP.

4.1 ESTUDO CLÍNICO

O presente estudo atende aos preceitos éticos contidos na Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 do CONEP. O estudo foi aprovado no comitê de ética em

pesquisa sob número CAAE: 37021620.2.0000.5554. O pesquisador responsável esclareceu e orientou todos os pacientes e/ ou responsáveis, sobre os objetivos e procedimentos aos quais eles foram submetidos, explicitando todos os riscos e benefícios, além da liberdade de poderem desistir de participar da pesquisa a qualquer momento sem penalização ou prejuízo algum. Após todos os esclarecimentos, participaram do presente estudo apenas os pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ainda, faz parte dos instrumentos de pesquisa o termo de Autorização para uso da imagem, declarando que este material será utilizado única e exclusivamente para fins de pesquisa.

Os participantes foram recrutados por meio de busca ativa em todas as Unidades de Saúde do município e divulgação do projeto para a comunidade sobre forma de cartaz informativo nos serviços de saúde e por meio das Enfermeiras responsáveis pela atenção básica do município.

Após o rastreio dos candidatos participantes da pesquisa foi realizado uma avaliação seguindo os critérios de inclusão: pacientes de 30 a 80 anos, portadores de feridas de difícil reparo de etiologia vascular, diabética ou traumática.

Foram adotados como critérios de exclusão: acamados, pessoas com neoplasias, pessoas com *Hanseníase*, pessoas com comprometimento neurológico, gestantes, pessoas vivendo com *HIV/aids*.

Foi realizado em todo participante uma avaliação inicial da lesão, utilizados os seguintes instrumentos para coleta de dados: aplicação do questionário de instrumento de coleta de dados do paciente na qual foi avaliado os fatores relacionados ao aspecto demográfico, como idade, comorbidades, renda familiar, queixa principal, histórico de doenças familiares, principais comorbidades, aspecto clínico das lesões como local da ferida, características do tecido, quantidade do exsudato, características da borda e da pele lesionada.

A análise de presença de microrganismos foi realizada por meio da coleta do *swab* da (s) lesão (ões) no primeiro dia, antes de iniciar o tratamento. A coleta do material foi realizada por profissional apropriado e capacitado para este procedimento, respeitando as técnicas de assepsia e as normas de biossegurança. Após limpeza com soro fisiológico 0,9% o *swab* foi movimentado, no leito da ferida, em forma de zigue zague atingindo pelo menos dez pontos, com o cuidado de não tocar as margens da ferida; evitando, assim, a contaminação da amostra.

Após a coleta do material da ferida, por *swab*, as amostras foram corretamente identificadas com o número do paciente, data, horário, sítio anatômico da ferida e número da ferida quando necessário.

Em seguida, as amostras foram encaminhadas imediatamente ao Instituto de Hematologia e Análises Clínicas de Fernandópolis.

O meio de cultura utilizado para identificar as bactérias foi o *Ágar mac conkey*, é um método empregado no isolamento de bactérias gram-negativas. Neste meio podem-se diferenciar bactérias fermentadoras da lactose, através da formação de colônias róseas e das bactérias não fermentadoras da lactose, com formação de colônias incolores. Foi utilizada também o meio *Ágar sangue*, que atua como um meio seletivo e diferencial, usado para isolar e identificar microrganismos patogênicos. O meio de cultura *Ágar sangue de carneiro* proporciona o crescimento da grande maioria das bactérias gram-positivas e gram-negativas bem como de fungos, a partir de uma base rica e suplementada, oferecendo ótimas condições de desenvolvimento para microrganismos não fastidiosos.

Após a identificação dos microrganismos, foi realizado o antibiograma. O procedimento para antibiograma consistiu no preparo de uma suspensão salina estéril com as bactérias que foram isoladas, utilizando o padrão na escala de *McFarland*, cujo padrão de turvação 0,5 (1/2). Esta suspensão é inoculada na superfície de uma placa de ágar *Mueller-Hinton*, com auxílio de *swab* estéril e em seguida aplica-se os discos de papel contendo antibióticos impregnados a uma concentração padronizada. Foram utilizados 12 diferentes tipos de antibióticos em cada placa de antibiograma. Cada disco possui impresso em uma de suas faces o seu código (abreviação do antibiótico) e o valor numérico de sua concentração.

Após a incubação em estufa microbiológica pelo tempo de 24h em temperatura que varia entre 36 e 37°C , é analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo sensível (S): quando o antibiótico foi efetivo e não houve crescimento bacteriano, assim a infecção pode ser tratada com a dosagem recomendada do antimicrobiano; resistente (R): quando o antibiótico não foi efetivo e houve o crescimento bacteriano, assim concentrações sistêmicas usuais do antimicrobiano, não inibem o microrganismo, gerando ineficácia clínica.

O procedimento de curativo iniciou-se com a limpeza da ferida utilizando solução de soro fisiológico a 0,9%. Em seguida, a ferida foi irradiada com *LED* de 660 nm, com um spot de 2 cm, por 30 segundos, a uma distância de 2 cm do leito da

ferida, e nas margens, de forma pontual e em contato com a pele, com intensidade de 120 mW, totalizando 3,6 J por ponto. Após a fotobiomodulação, foi aplicada uma camada de óleo de girassol ozonizado (Blustratum®) em todo o leito da ferida. O curativo foi finalizado com a aplicação de gaze estéril seca, coberta com atadura e fixada com fita crepe.

Os pacientes receberam o mesmo procedimento três vezes por semana, durante um período máximo de 12 semanas, com a orientação de não substituir o curativo em casa e de não utilizar nenhum outro tratamento. Caso a ferida fechasse antes das 12 semanas ou conforme decisão do paciente, o tratamento seria interrompido.

O acompanhamento das feridas foi realizado por meio de registros fotográficos semanais para monitorar a evolução da reparação tecidual. As imagens foram capturadas com a câmera de 12 MP de um iPhone 11, mantendo-se uma distância padronizada por meio de um suporte.

4.2 ESTUDO *IN VITRO*

Para determinar a dosagem e o tempo de administração ideais do óleo ozonizado no tratamento de infecções bacterianas, foi realizado um estudo *in vitro*. Foram utilizadas as cepas *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Brasil, campus Fernandópolis. Os ensaios para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) seguiram os procedimentos recomendados pelo CLSI (2018).

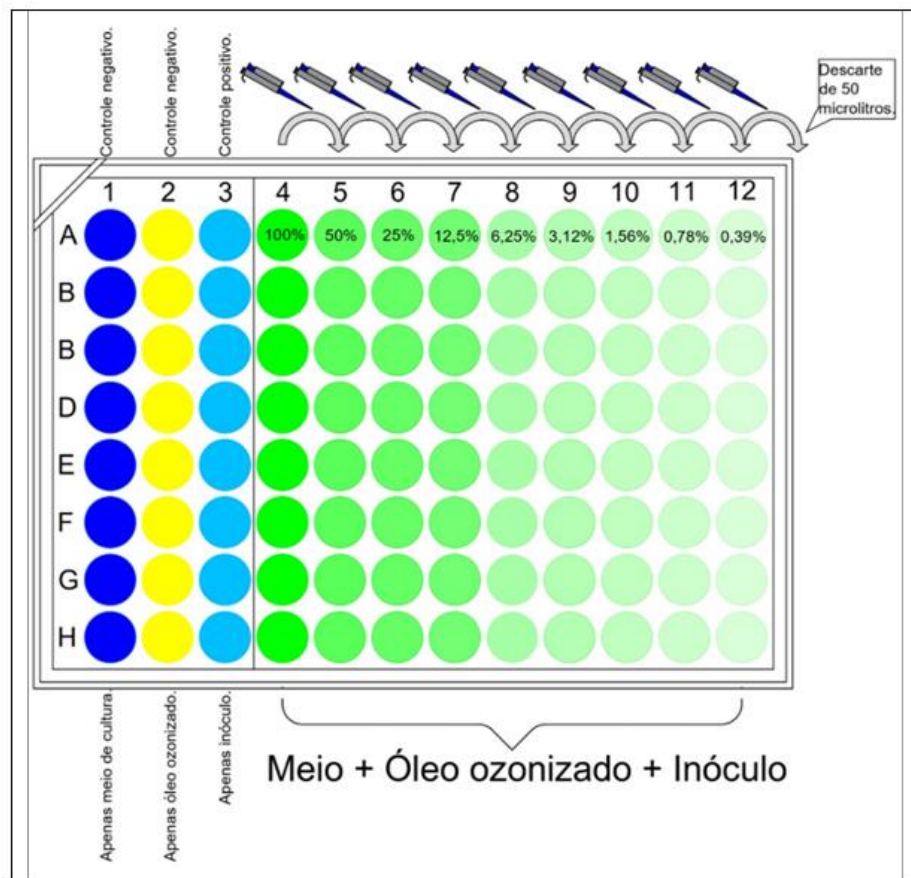
As linhagens dos microrganismos foram suspensas em meios apropriados.

O ensaio de concentração inibitória mínima é uma técnica utilizada para determinar a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um determinado microrganismo. A CIM foi realizada em placa de 96 poços. Para o ensaio empregou-se diluição seriada e a densidade celular bacteriana da suspensão foi de 10^6 /mL.

Na figura 1, as colunas 1, 2 e 3 foram designadas para controles, sendo que a coluna 1 recebeu apenas meio de cultura; coluna 2 recebeu óleo ozonizado; coluna 3 recebeu apenas suspensão de microrganismo. A diluição seriada iniciou a partir da

quarta coluna, sendo representada pela concentração de óleo ozonizado 100%. O procedimento foi repetido até a última coluna, representando as diluições 50%, 25%, 12,50%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78% e 0,39%. Por último, foi adicionado em todos os poços a suspensão com os microrganismos $10^6/\text{mL}$, com exceção dos controles negativo (coluna 1 e 2 - figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo da metodologia de microdiluição



Fonte: autoria própria

As placas foram incubadas em estufa microbiológica a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas. Decorrido o tempo de incubação foi adicionado $50\mu\text{L}$ do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) em cada poço, que é um indicador de viabilidade células bacterianas. Neste método é realizado a avaliação colorimétrica, quando as bactérias metabolicamente ativas entram em contato com o TTC, elas reduzem o composto a 1,3,5-trifenilformazan de cor avermelhada e pode ser visualmente observado. Nos poços em que as bactérias estão sem crescimento

permanecem incolores. Dessa maneira, a CIM foi determinada para cada microrganismo como a concentração mais baixa do agente antibacteriano (óleo ozonizado), expressa em mg/L ($\mu\text{g/ml}$), que, sob condições rigorosamente controladas *in vitro*, impede integralmente o crescimento bacteriano (Kowalska-Krochmal; Dudek-Wicher, 2021).

Para determinar a concentração bactericida mínima uma alíquota (20 μl) dos poços em que não foi observado o crescimento bacteriano foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) para as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* e *Staphylococcus epidermidis*. As placas foram incubadas a 28°C por 72h. Após esse período foi observado os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a CBM que é definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura (Aiensaard, Punareewattana, 2017).

Para avaliar, por meio de observação visual, a variação da concentração do óleo ozonizado ao longo do tempo e seu impacto na viabilidade bacteriana, foi realizado o ensaio de cinética bactericida, também conhecido como "time kill" (Allahghadri, 2010).

Para isso, os microrganismos foram cultivados em meio apropriado, então foi utilizado 950 μL de cada microrganismo, na concentração de $10^6/\text{mL}$, adicionados 50 μL de óleo ozonizado na diluição determinada por CBM. Em seguida as amostras foram incubadas a 28°C e coletadas, 100 μL , em intervalos de tempos pré-determinado e plaqueadas em meio Ágar Triptona de Soja (TSA) para *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e *Staphylococcus epidermidis* com o auxílio de alça de Drigalski. O plaqueamento ocorreu nos tempos de 0', 5', 10', 20', 40', 80', 160' e 320' e incubadas 24/48h a 37°C. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata. Após a incubação as colônias foram contadas manualmente.

Para identificar a interferência do LED na cinética bactericida do óleo ozonizado, utilizou-se a mesma metodologia empregada, porém as amostras de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* e *Staphylococcus epidermidis* foram irradiadas com o LED antes de serem espalhadas em cultura. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

4.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados por meio da estatística descritiva. A abordagem dos dados de contagem microbiana, foi realizada por meio de gráfico, a fim de observar a evolução da variação da contagem microbiana com o tempo.

Para avaliar a regressão da área da ferida foram considerados os valores de área inicial ($A_{inicial}$) e área final (A_{final}) medidas pelo Image J®, versão 1.3.1. software (EUA National Institutes of Health, Bethesda, MD). O percentual de redução (A_r) foi obtido pela equação:

$$A_r = \left| \frac{A_{final} - A_{inicial}}{A_{inicial}} \right| * 100$$

A obtenção da taxa de redução (cm^2) foi representada pelo coeficiente angular da reta do ajuste linear dos dados a partir da equação $y=a+bx$.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO CLÍNICO

5.1.1 Caracterização Sociodemográfica dos Pacientes

Dez pacientes portadores de feridas de difícil reparo em membros inferiores foram submetidos a avaliação clínica ao procurarem, espontaneamente, atendimento nas Unidades Básicas de Saúde e satisfazerem os critérios de inclusão estabelecidos. Do total de dez pacientes, dois não compareceram para iniciar o tratamento, resultando em oito pacientes que foram acompanhados ao longo do estudo. Durante o curso da pesquisa, três pacientes optaram por interromper o tratamento, enquanto dois apresentaram reparo tecidual completo antes do período de 12 semanas, e três pacientes concluíram o tratamento seguindo o protocolo estabelecido ao longo de 12 semanas. As informações sociodemográficas destes pacientes constam na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis sociodemográficas dos pacientes entrevistados neste estudo

Variáveis	N = 8	%
Sexo		
Homens	6	75
Mulheres	2	25
Faixa Etária		
41 a 45 anos	1	12,5

46 a 50 anos	1	12,5
56 a 60 anos	1	12,5
61 a 65 anos	3	37,5
71 a 80 anos	2	25
Cor		
Branco	5	62,5
Preto	2	25
Pardo	1	12,5
Escolaridade		
Ensino Fundamental Incompleto	5	62,5
Ensino Médio Completo	3	37,5
Situação Ocupacional		
Ativo	2	25
Desempregado	1	12,5
Afastado	2	25
Aposentado	3	37,5
Renda Familiar		
Menor ou igual a um salário mínimo	3	37,5
Entre 1 e 2 salários mínimos	3	37,5
Entre 2 e 3 salários mínimos	2	25

Fonte: autoria própria

5.1.2 Caracterização das Feridas

As características das feridas dos pacientes avaliados neste estudo, segundo as variáveis tempo, tipo, local da lesão e número de feridas estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Características das feridas dos pacientes avaliados neste estudo

Variáveis	N=8	%
Tempo de ferida (meses)		
Menos de 6 meses	1	12,5
6 — 12	4	50
13 — 36	1	12,5
37 — 60	1	12,5
Mais que 60 meses	1	12,5
Tipo de ferida		
Mista	4	50
Venosa	4	50
Local da lesão		
Terço inferior da perna	6	75
Maléolo	2	25
Número de feridas		
Ferida única	5	62,5
Duas feridas	3	37,5









Fonte: autoria própria

5.1.3 Avaliação Macroscópica

Após o período de acompanhamento, independente do tipo de lesão, idade e comorbidades associadas, foi observada uma melhora significativa das lesões, como redução nos sinais de infecção, presença de tecido de granulação, redução da área de ferida e, em alguns casos, o fechamento da ferida por completo.

Figura 2 - Achados macroscópicos das feridas avaliadas

	Inicial	Final	Semanas de tratamento
1			3
2			6
3			6
4			8

5			10
6			12
7			12
8			12

Fonte: autoria própria.

5.1.4 Índice de Reparo da Ferida

De oito pacientes submetidos ao acompanhamento (Tabela 3), cinco indivíduos concluíram integralmente o regime terapêutico, sendo que os pacientes 6, 7 e 8 realizaram 12 semanas de tratamento, e os pacientes 4 e 5 obtiveram reparo completo da ferida antes do período estipulado de 12 semanas. Três participantes (Pacientes

1, 2 e 3) interromperam o tratamento, fundamentando suas decisões na escassez de disponibilidade de tempo ou nas dificuldades associadas ao deslocamento até a unidade de saúde para realizar curativos três vezes por semana. Mesmo recebendo tratamento parcial, os três pacientes demonstraram redução na área inicial da ferida.

Tabela 3 - Análise do Índice de Reparo

Paciente	Tempo existência ferida	Tempo de acompanhamento (semanas)	Área inicial (cm ²)	Área final (cm ²)	Área de redução (cm ²)	Taxa Redução (%)
1	4 meses	3	14,7	13,9	0,8	5,4
2	2 anos	6	9,3	2,4	6,9	74,2
	2 anos	6	5,3	1,3	4,0	75,5
3	6 meses	6	18,2	17,7	0,5	2,7
4	10 anos	8	6,3	0,0	6,3	100,0
5	1 ano	10	1,2	0,0	1,2	100,0
	1 ano	10	4,2	0,0	4,2	100,0
6	3 anos	12	71,2	66,1	5,1	7,2
7	5 anos	12	6,6	0,0	6,6	100,0
8	2 anos	12	12,8	5,1	7,7	60,2
	2 anos	12	10,7	10,5	0,2	1,9

Fonte: autoria própria.

5.1.5 Identificação Microbiológica

Entre os 8 pacientes acompanhados, 1 paciente demonstrou microbiologia negativa, enquanto 6 pacientes apresentaram apenas 1 microrganismo na ferida, e 1 paciente evidenciou a presença de 2 microrganismos em uma única ferida. Em seis culturas realizadas, foram identificadas bactérias gram-negativas, com cinco casos de *Escherichia coli* e um caso de *Klebsiella sp.* Em uma cultura, foi observada a presença de uma bactéria gram-positiva, identificada como *Staphylococcus epidermidis*, enquanto em outra cultura foram identificadas leveduras.

Tabela 4 - Microrganismos isolados de feridas de difícil reparo dos pacientes atendidos

Variáveis	N
Espécie	
Gram-negativas	
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Klebsiella sp</i>	1
Gram-positivas	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
Leveduras	1

Fonte: autoria própria.

5.1.6 Antibiograma

As bactérias identificadas foram avaliadas a partir do antibiograma, sendo divididas em resistente, sensível e pouco sensível (Tabela 5).

A *Klebsiella sp* encontrada em apenas um paciente, apresentou-se resistente à ampicilina, nitrofurantoina, oxofloxacina, amoxicilina, tetraciclina, norfloxacina, gentamicina, ácido nadixílico, fosfomicina, sulfazotrim, ácido clavulânico+amoxicilina.

O *Staphylococcus epidermidis*, encontrado também em um único paciente, apresentou -se resistente à tetraciclina.

A *Escherichia coli* foi encontrada em cinco pacientes e se apresentou resistente à ampicilina, amoxicilina, tetraciclina, gentamicina, sulfazotrim.

Tabela 5 - Antibióticos testados e frequência dos resultados

Antibióticos testados	Resistente-R	Sensível-S	Pouco Sensível-PS
ampicilina	6	0	1
cefazolina	2	3	2
levofloxacina	3	4	0
nitrofurantoina	4	1	2
cefeepima	1	3	3
amoxicilina	6	1	0
ciprofloxacina	3	4	0
tetraciclina	7	0	0
norfloxacina	4	3	0
gentamicina	6	1	0
ácido nadixílico	5	2	0
fosfomicina	4	2	1

meropenem	0	7	0
sulfazotrim	6	0	1
ácido clavulânico +amoxicilina	5	2	0
ceftriaxona	1	4	2

Fonte: autoria própria.

5.2 ESTUDO IN VITRO

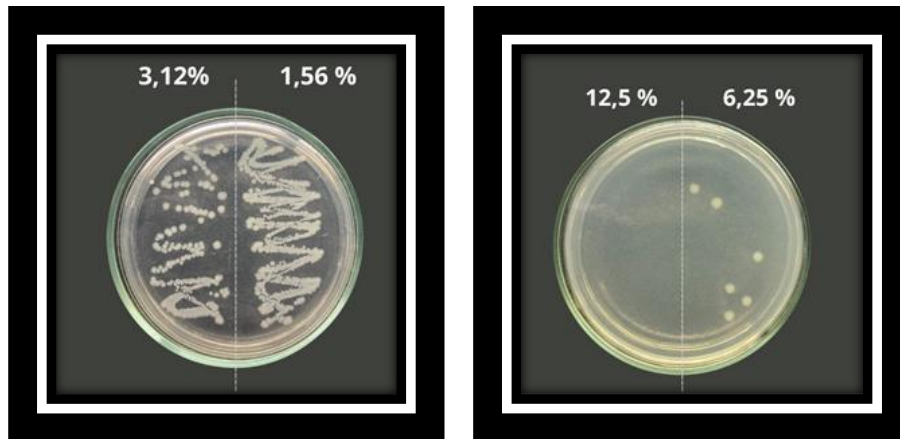
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima

No teste de concentração inibitória mínima, avaliamos a eficácia do óleo ozonizado contra várias cepas bacterianas. Observamos que, para as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.*, uma concentração mínima de 6,25% de óleo ozonizado foi necessária para inibir, visualmente, o crescimento desses microrganismos. Por outro lado, para a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, a inibição ocorreu em uma concentração menor, de 3,12 % de óleo ozonizado (Tabela 6).

5.2.2 Concentração Bactericida

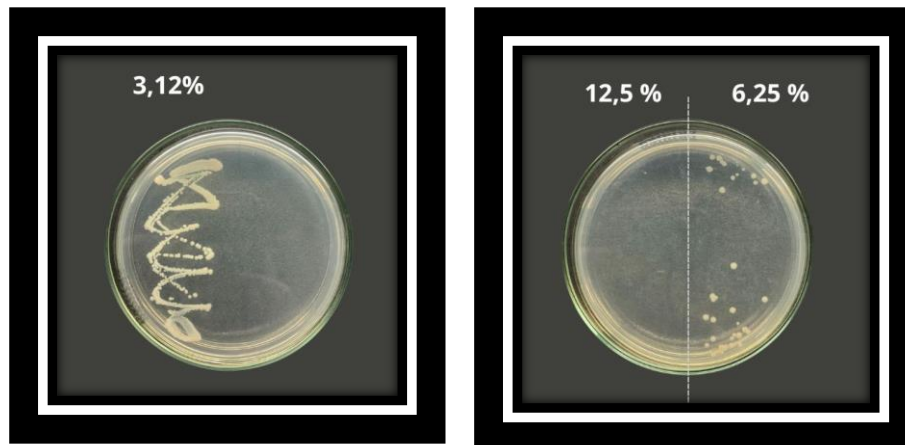
Com base nos resultados do teste que determinou a concentração mínima de óleo ozonizado capaz de inibir o crescimento de cada microrganismo, procedemos aos testes de concentração mínima necessária para promover o efeito bactericida. Para as bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.*, foi necessário alcançar uma concentração de 12,5% de óleo ozonizado para obter o efeito bactericida. No caso da bactéria *Staphylococcus epidermidis*, uma concentração de 6,25% de óleo ozonizado foi suficiente para alcançar o efeito bactericida.

Figura 3 – Concentração inibitória mínima e bactericida da *Klebsiella sp*



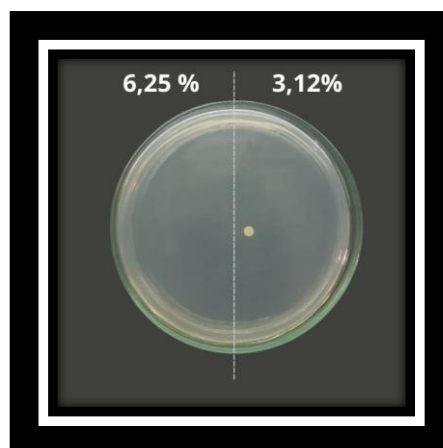
Fonte: autoria própria.

Figura 4 – Concentração inibitória mínima e bactericida da *Escherichia coli*



Fonte: autoria própria.

Figura 5 – Concentração inibitória mínima e bactericida da *Staphylococcus epidermidis*



Fonte: autoria própria.

Tabela 6 - Concentração do óleo ozonizado e seus efeitos antimicrobiano

Microrganismo testado	CIM¹	CBM¹
<i>Escherichia coli</i>	6,25%	12,5%
<i>Klebsiella sp</i>	6,25%	12,5%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,12%	6,25%

¹ Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM).

Fonte: autoria própria.

5.2.3 Potencial Antimicrobiano

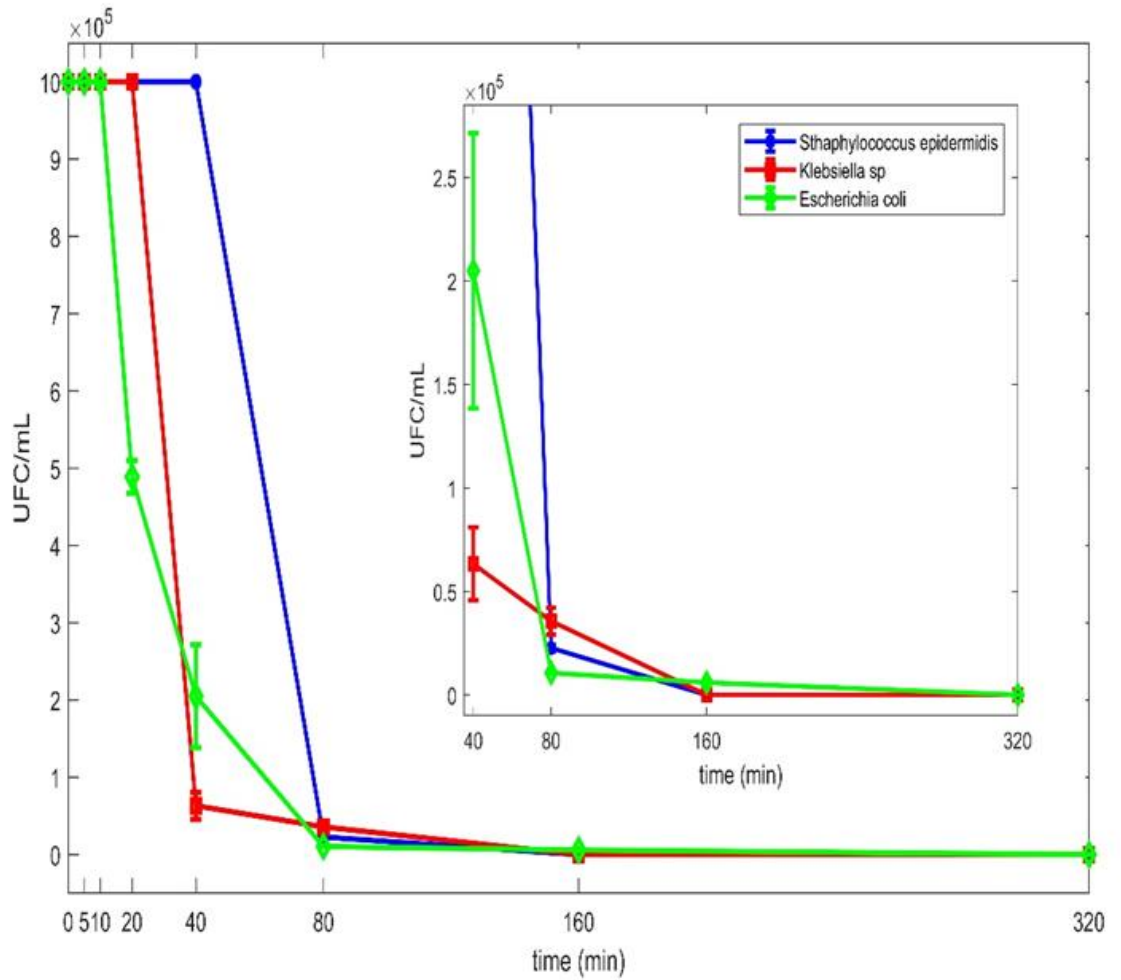
O efeito antimicrobiano do óleo ozonizado foi observado em todos os microrganismos testados, com variações apenas no tempo necessário de exposição para alcançar o efeito bactericida/bacteriostático.

No caso da bactéria *Escherichia coli*, observou-se que após 20 minutos de contato com o óleo ozonizado, o efeito bacteriostático foi evidente. No entanto, para alcançar o efeito bactericida, foram necessários 320 minutos de exposição.

Para a *Klebsiella sp.*, o efeito bacteriostático foi observado após 80 minutos de exposição, enquanto o efeito bactericida foi alcançado após 160 minutos.

Já para a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, ambos os efeitos bacteriostático e bactericida foram observados após 80 minutos de exposição.

Gráfico 1 - Cinética de crescimento dos microrganismos encontrados

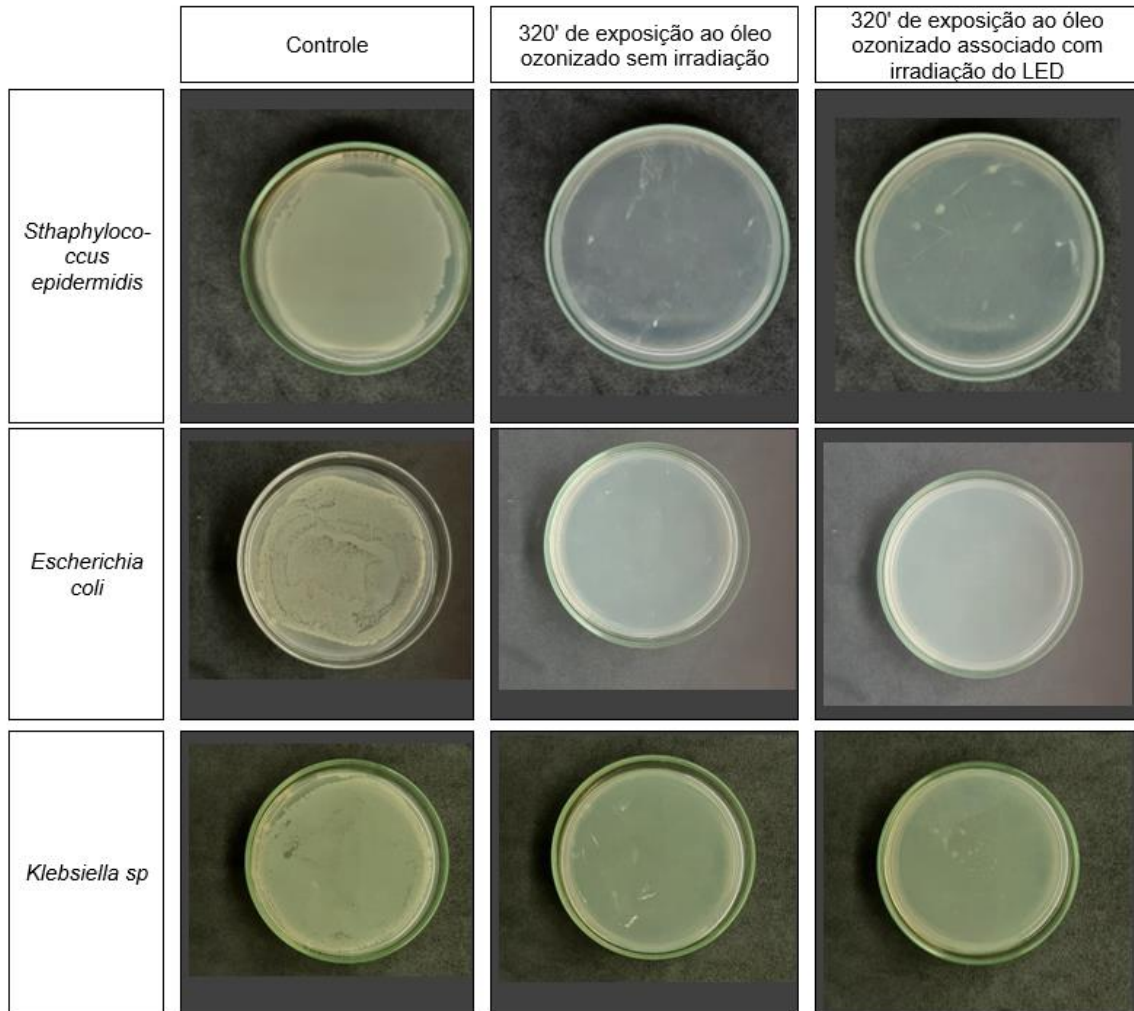


Fonte: autoria própria.

5.2.4 Interferência do LED na cinética bactericida do óleo ozonizado

Verificou-se que a irradiação com LED não interferiu no potencial antimicrobiano do óleo ozonizado.

Figura 6 - Comparação entre os microrganismos cultivados em meio de cultura após 320 minutos de ação do óleo ozonizado e microrganismos cultivados em meio de cultura após 320 minutos de ação do óleo ozonizado e irradiado com LED



Fonte: autoria própria.

6 DISCUSSÃO

A escolha do tratamento ideal para feridas de difícil reparo, com o objetivo de alcançar a completa reparação do tecido afetado, continua a ser um desafio significativo para os profissionais de saúde. Nesse contexto, o óleo ozonizado e a terapia de fotobiomodulação emergem como recursos terapêuticos promissores, destinados a estimular o processo de reparo de feridas de difícil reparo (Fitzpatrick; Holland; Vanderlelie, 2018; Pavlov et al., 2020).

O presente estudo evidenciou que a fotobiomodulação por LED, associada ao uso de óleo ozonizado, demonstrou eficácia na promoção do reparo tecidual e, em alguns casos, possibilitou o fechamento integral da lesão. De maneira congruente, uma revisão sistemática que analisou os benefícios e riscos potenciais da terapia com ozônio no tratamento avançado de feridas revelou resultados consistentes em favor da aplicação de óleo ozonizado como uma terapia viável para feridas de difícil reparo, sugerindo seu potencial para prática clínica convencional (Fitzpatrick; Holland; Vanderlelie, 2018).

Além disso, outro estudo, abrangendo 28 artigos relacionados ao uso de óleo ozonizado no tratamento de feridas, também indicou que a eficácia do óleo ozonizado pode representar uma abordagem terapêutica no tratamento de lesões teciduais, devido as suas propriedades antimicrobianas, imunológicas, antioxidantes e oxigenantes (Anzolin; Silveira-Kaross; Bertol, 2020).

No contexto da fotobiomodulação, investigações histológicas conduzidas revelaram que a implementação dessa terapia acelerou o processo de reparo de feridas durante as fases iniciais da reparação tecidual, facilitando a redução da resposta inflamatória e promovendo uma regeneração mais rápida dos tecidos lesionados (Pavlov et al., 2020). Tais benefícios terapêuticos, associados à terapia, estão relacionados ao estímulo das mitocôndrias, levando ao aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e à liberação de fatores de crescimento. A ligação dos fatores de crescimento a receptores de superfície celular induz a ativação de vias de sinalização que promovem a proliferação, viabilidade e migração celular (Thobekile; Jere; Houreld, 2021).

Neste estudo, os resultados referentes à reparação tecidual, evidenciados pelo uso do óleo ozonizado no tratamento de feridas de difícil reparo, podem estar relacionados ao seu efeito antimicrobiano. Dos pacientes acompanhados, 88% deles, apresentavam microrganismos nas feridas antes de iniciar o tratamento, tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus* e *epidermidis*. Salienta-se que os referidos microrganismos evidenciaram resistência a antibióticos específicos convencionais, conforme identificado no antibiograma. Essa resistência provavelmente se origina por mutações nas bactérias, que induzem alterações nas proteínas da membrana celular, conferindo-lhes uma configuração não mais suscetível ao reconhecimento por parte dos agentes farmacológicos. Em virtude

desse fenômeno, os óleos ozonizados têm experimentado um incremento no interesse científico e nas aplicações clínicas (Ugazio, *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos *in vitro* evidenciam que o óleo ozonizado exibiu eficácia na redução e eliminação de unidades formadoras de colônias em todos os microrganismos testados quando submetidos a concentrações consideradas baixas, variando de 3,12% a 12,5%. Esse achado possui relevância significativa para a prática clínica, especialmente em contextos nos quais feridas exibem exsudatos suscetíveis à diluição do óleo ozonizado após a aplicação, mantendo, no entanto, sua efetividade antimicrobiana. Além disso, mostrou efeito bactericida em todas as cepas estudadas.

Esses resultados fornecem parâmetros valiosos para o desenvolvimento de protocolos clínicos, orientando a aplicação do óleo ozonizado em feridas de difícil reparo, levando em consideração fatores como concentração do óleo, duração da exposição e frequência da troca de curativos para assegurar o efeito antimicrobiano desejado. Efeito, esse, atribuído principalmente à formação predominante de ozonídeos, aldeídos e peróxidos, os quais reagem com a membrana e o citoplasma bacteriano, induzindo aumento da permeabilidade celular e alterações citoplasmáticas que culminam na interrupção do crescimento bacteriano (Zeng, Lu, 2018; Silva, *et al.*, 2021; Kemal, *et al.*, 2017).

Ressalta-se que a presença de microrganismos nas feridas pode interferir significativamente no processo de reparo tecidual (Versey, *et al.*, 2021). Ocorrendo infecção, o organismo desencadeia uma resposta inflamatória prolongada, caracterizada pela migração de leucócitos e uma significativa produção de citocinas pró-inflamatórias, exercendo efeitos prejudiciais no processo de reparo (Gushiken, *et al.*, 2021). Dessa forma, a identificação precoce de microrganismos nas feridas de difícil reparo é crucial para determinar o tratamento adequado. Na busca por abordagens terapêuticas apropriadas, os achados do presente estudo indicam que a combinação da terapia antimicrobiana com o óleo ozonizado e a fotobiomodulação pode se revelar eficaz no processo de reparo, especialmente quando consideramos que a luz emitida pelo LED não estimulou a proliferação de microrganismos. Esse cenário sugere que a sinergia entre as propriedades antimicrobianas do óleo ozonizado e a fotobiomodulação pode proporcionar benefícios significativos para a promoção do reparo tecidual, mitigando potenciais desafios associados à proliferação microbiana em feridas de difícil reparo.

7 CONCLUSÃO

Este estudo identificou microrganismos em feridas de difícil reparo, como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, e *Staphylococcus epidermidis*, que apresentaram resistência aos antibióticos testados. Além disso, observou-se uma possível resistência ao óleo ozonizado, especialmente a *Escherichia coli*, para a qual foram necessários 320 minutos de contato com o óleo para alcançar o efeito bactericida. Para *Klebsiella sp.* e *Staphylococcus epidermidis*, o efeito bactericida foi obtido após 160 e 80 minutos de exposição, respectivamente.

Não foram registrados efeitos adversos relacionados ao uso do óleo ozonizado, o que corrobora a sua segurança no contexto clínico avaliado.

Os resultados deste estudo indicam que o óleo ozonizado possui um efeito antimicrobiano significativo e contribui para o reparo tecidual, especialmente quando associado à terapia por fotobiomodulação, independentemente do tipo de ferida e da sua duração.

No entanto, apesar dos achados promissores, é necessário realizar novos ensaios clínicos randomizados, controlados e duplo-cegos, para otimizar e padronizar os protocolos de tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Aiemsaard J, Punareewattana K. Antifungal activities of essential oils of *Syzygium aromaticum*, *Piper betle*, and *Ocimum sanctum* against clinical isolates of canine Dermatophytes. **Sci. Asia.** v.43, n.5, p: 223-228, 2017. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2017.43.223. Disponível em: [Antifungal activities of essential oils of Syzygium aromaticum, Piper betle, and Ocimum sanctum against clinical isolates of canine dermatophytes | Request PDF \(researchgate.net\)](#). Acesso em 6 de julho de 2023.
2. Allahghadri T, Rasooli I, Owlia P, Nadooshan MJ, Ghazanfari T, Taghizadeh M, Astaneh SD. Antimicrobial property, antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil from cumi.; produced in Iran, **J. Food Sci.** v.75, n.2: H54-H61, 2010. Disponível em: [Antimicrobial property, antioxidant capacity, and cytotoxicity of essential oil from cumi produced in Iran - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 6 de julho de 2023.
3. Anzolin AP, Silveira-Kaross NL, Bertol CD. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? *Med Gas Res.* 2020;10(1):54-59. doi: 10.4103/2045-9912.279985. Disponível em: [Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 5 de julho de 2023.
4. Bacelete, V.S.B; Gama, A. C. C. Therapeutic effects of photobiomodulation in the speech-language-hearing clinic: an integrative literature review. *Rev. CEFAC.* 23(1):e9120; 2021. <https://doi.org/10.1590/1982-0216/20212319120>. Acesso em 10 de maio de 2024.
5. Baracho VS, Silva NC, Peixoto MRD, Sampaio KH, Cordeiro CAF, Lucas TC. Fototerapia com LED no reparo tecidual de feridas crônicas em pessoas com diabetes: revisão sistemática. *Rev Gaúcha Enferm.* 2023;44:e20220274. doi: <https://doi.org/10.1590/1983-1447.2023.20220274.pt>. Acesso em 20 de maio de 2024.
6. Diban, F.; Di Lodovico, S.; Di Fermo, P.; D'Ercole, S.; D'Arcangelo, S.; Di Giulio, M.; Cellini, L. Biofilms in ChronicWound Infections: Innovative Antimicrobial Approaches Using the In Vitro Lubbock ChronicWound Biofilm Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 1004. <https://doi.org/10.3390/ijms2402100>. Acesso em 15 de maio de 2024.
7. Drago F, Gariazzo L, Cioni M, Trave I, Parodi A. The microbiome and its relevance in complex wounds. *Eur J Dermatol* 2019; 29(1): 6-13. doi:10.1684/ejd.2018.3486. Disponível em: [The microbiome and its relevance in complex wounds - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 5 de julho de 2023.

8. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J.* 2018; 15:633–644. <https://doi.org/10.1111/iwj.12907>. Disponível em: [Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 5 de julho de 2023.
9. Gajula, Bhargav MBBS; Munnamgi, Sinduja MBBS, MS; Basu, Somprakas MBBS, MS, MSc, FACS. How bacterial biofilms affect chronic wound healing: a narrative review. *International Journal of Surgery: Global Health* 3(2): p e16, March 2020. | DOI: 10.1097/GH9.000000000000016. Disponível em: [How bacterial biofilms affect chronic wound healing: a narra... : IJS Global Health \(lww.com\)](#). Acesso em: 10 de maio de 2024.
10. Gois, T. da S.; Jesus, C. V. F. de; Santos, R. J. dos; Oliveira, F. S. de; Feitosa, L.; Santana, M. F.; Silva, M. C. da; Silva, R. N. da; Teles, W. de S. Fisiopatologia da cicatrização em pacientes portadores de diabetes mellitus/ Physiopathology of healing in patients with diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 4, p. 14438–14452, 2021. DOI: 10.34119/bjhrv4n4-006. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/32304> Acesso em 16 de maio de 2024.
11. Gushiken LFS, Beserra FP, Bastos JK, Jackson CJ, Pellizzon CH. Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. *Life* 2021, 11, 665. <https://doi.org/10.3390/life11070665>. Disponível em: [Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies \(usp.br\)](#). Acesso em 12 de agosto de 2023.
12. Iorio, F. B. R. D., Liberatore, A. M. A., Koh, I. H. J., Otani, C., & Camilo, F. F. (2016). Ozonated Mineral Oil: Preparation, Characterization and Evaluation of the Microbicidal Activity. *Ozone: Science & Engineering*, 38(4), 253–260. <https://doi.org/10.1080/01919512.2015.1128801>. Acesso em 10 de julho de 2024.
13. Kaiser P, Wächter J, Windbergs M. Therapy of infected wounds: overcoming clinical challenges by advanced drug delivery systems. *Drug Deliv Transl Res.* 2021 Aug;11(4):1545-1567. doi: 10.1007/s13346-021-00932-7. Epub 2021 Feb 20. PMID: 33611768; PMCID: PMC8236057. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8236057/pdf/13346_2021_Article_932.pdf. Acesso em 5 de julho de 2023.
14. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens.* 2021 Feb 4;10(2):165. doi: 10.3390/pathogens10020165. PMID: 33557078; PMCID:

- PMC7913839. Disponível em: [The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 5 de julho de 2023.
15. Leyane TS, Jere SW, Houreld NN. Cellular Signalling and Photobiomodulation in Chronic Wound Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 11223. <https://doi.org/10.3390/ijms222011223>. Disponível em: [Cellular Signalling and Photobiomodulation in Chronic Wound Repair - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 5 de julho de 2023.
16. Martinengo L, Olsson M, Bajpai R, Soljak M, Upton Z, Schmidtchen A, Car J, Järbrink K. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol.* 2019 Jan; 29:8-15. doi: 10.1016/j.annepidem.2018.10.005. Disponível em: [Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies - PubMed \(nih.gov\)](#) . Acesso em 12 de agosto de 2023.
17. Martínez Sánchez. G. Scientific rational for the medical application of ozonized oils, an up-date. *Ozone Therapy Global Journal* Vol. 11, nº 1, pp 239-272, 2021. Disponível em: [Scientific rational for the medical application of ozonized oils, an up-date | Ozone Therapy Global Journal](#). Acesso em 20 de maio de 2024.
18. Mehl AA, Schneider Jr B, Schneider FK, Carvalho BHK. Measurement of wound area for early analysis of the scar predictive factor. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 2020;28: e3299. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1518-8345.3708.3299>. Acesso em 20 de maio de 2024.
19. Patrulea V, Borchard G, Jordan O. An update on antimicrobial peptides (Amps) and their delivery strategies for wound infections. *Pharmaceutics*, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1–39, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090840. Disponível em: [An Update on Antimicrobial Peptides \(AMPs\) and Their Delivery Strategies for Wound Infections - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 12 de agosto de 2023.
20. Pavlov SB, Babenko NM, Kumetchko MV, Litvinova OB, Semko NG, Mikhaylusov R N. The Influence of Photobiomodulation Therapy on Chronic Wound Healing. *Romanian Reports in Physics* 72, 609, 2020. Disponível em <http://www.rrp.infim.ro/2020/AN72609.pdf>. Acesso em: 06 de setembro de 2021.

21. Puca V, Marulli R Z, Grande R, Vitale I, Niro A, Molinaro G, Prezioso S, Muraro R, Di Giovanni P. Microbial Species Isolated from Infected Wounds and Antimicrobial Resistance Analysis: Data Emerging from a Three-Years Retrospective Study. *Antibiotics* 2021, 10, 1162. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101162>. Disponível em: [Microbial Species Isolated from Infected Wounds and Antimicrobial Resistance Analysis: Data Emerging from a Three-Years Retrospective Study \(nih.gov\)](#) Acesso em 5 de julho de 2023.
22. Salman, S. Efeitos da terapia por fotobiomodulação a LED (Diodo Emissor de Luz) em condrócitos: estudo in vitro / Soraia Salman. São Paulo, 2019. Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil. Disponível em: [20200316195314.pdf \(universidadebrasil.edu.br\)](#). Acesso em 22 de maio de 2024.
23. Silva V, Peirone C, Capita R, Alonso-Calleja C, Marques-Magallanes JA, Pires I, Maltez L, Pereira JE, Igrejas G, Poeta P. Topical Application of Ozonated Oils for the Treatment of MRSA Skin Infection in an Animal Model of Infected Ulcer. *Biology (Basel)*. 2021 Apr 26;10(5):372. doi: 10.3390/biology10050372. Disponível em: [Topical Application of Ozonated Oils for the Treatment of MRSA Skin Infection in an Animal Model of Infected Ulcer - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 6 de julho de 2023.
24. Tomic-Canic M, Burgess JL, O'Neill KE, Strbo N, Pastar I. Skin Microbiota and its Interplay with Wound Healing. *Am J Clin Dermatol* 21 (Suppl 1), 36–43 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00536-w>. Disponível em: [Microbiota da Pele e sua Interação com a Cicatrização de Feridas | SpringerLink](#). Acesso em 5 de julho de 2023.
25. Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapietra S, Dosio F. Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques. *Molecules*. 2020;25(2):334. Published 2020 Jan 14. doi:10.3390/molecules25020334. Disponível em: [Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 6 de julho de 2023.
26. Varol K, Koc AN, Atalay MA, Keles, I. (2017). Antifungal Activity of Olive Oil and Ozonated Olive Oil Against *Candida* Spp. and *Saprochaete* Spp. *Ozone: Science & Engineering*, 39(6), 462–470. <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1322490>. Disponível em: [Antifungal Activity of Olive Oil and Ozonated Olive Oil Against Candida Spp. and Saprochaete Spp.: Ozone: Science & Engineering: Vol 39 , No 6 - Get Access \(tandfonline.com\)](#). Acesso em 6 de julho de 2023.
27. Versey Z, da Cruz Nizer WS, Russell E, Zigic S, DeZeeuw KG, Marek JE, Overhage J and Cassol E (2021). Biofilm-Innate Immune. Interface: Contribution to Chronic Wound Formation. *Front. Immunol.* 12:648554. doi: 10.3389/fimmu.2021.648554.

Disponível em: [Biofilm-Innate Immune Interface: Contribution to Chronic Wound Formation - PubMed \(nih.gov\)](#) . Acesso em 15 de agosto de 2023.

28. Vogt TV, Koller FJ, Santos PMD, Lenhani BE, Guimarães PRB, Kalinke LP. Quality of life assessment in chronic wound patients using the Wound-QoL and FLQA-Wk instruments. *Invest. Educ. Enferm.* 2020; 38(3):e11. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.iee.v38n3e11>. Disponível em: [Quality of life assessment in chronic wound patients using the Wound-QoL and FLQA-Wk instruments | Investigación y Educación en Enfermería \(udea.edu.co\)](#). Acesso em 15 de maio de 2024.
29. Wen Q, Liu D, Wang X, Zhang Y, Fang S, Qiu X, Chen, Q. A systematic review of ozone therapy for treating chronically refractory wounds and ulcers. *Int Wound J.* 2022;19(4):853-870. doi:10.1111/iwj.13687. Disponível em: [A systematic review of ozone therapy for treating chronically refractory wounds and ulcers - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 12 de agosto de 2023.
30. Wu YK, Cheng NC, Cheng CM. Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis. *Trends Biotechnol.* 2019;37(5):505-517. doi:10.1016/j.tibtech.2018.10.011. Disponível em: [Biofilms in Chronic Wounds: Pathogenesis and Diagnosis - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 10 de agosto de 2023.
31. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol.* 2018; 56:235-241. doi:10.1016/j.intimp.2018.01.040. Disponível em: [Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases - PubMed \(nih.gov\)](#). Acesso em 5 de julho de 2023.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Sr(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa **EFICÁCIA DA OZONOTERAPIA ASSOCIADA A FOTOBIMODULAÇÃO NO REPARO DE FERIDAS CRÔNICAS**, cujo pesquisador responsável é Priscila Cristina Oliveira Zignani Pimentel. O objetivo do projeto é avaliar os efeitos da ozonoterapia associado a fotobiomodulação em feridas crônicas comparado com o tratamento convencional. O(A) Sr(a) está sendo convidado por que possui ferida crônica de membros inferiores.

O(A) Sr(a) tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma para o tratamento que recebe neste serviço.

Caso aceite participar da pesquisa, sua participação consiste em comparecer na Unidade Básica de Saúde três vezes por semana, durante 12 semanas consecutivas, para realização do curativo com aplicação do LED e óleo ozonizado, quando haverá nova avaliação e tomada a decisão cabível.

A pesquisa não oferece risco para o (a) Sr(a). Quanto aos benefícios do projeto, o (a) Sr(a) será submetido à avaliação clínica a partir da anamnese. Também será avaliado quanto a presença de microrganismos no leito da ferida. Receberá a administração de óleo ozonizado no leito da ferida associado a fotobiomodulação. O entendimento das respostas dessas avaliações somados à possível influência positiva do uso das terapias poderá trazer restauração e estimulação de múltiplos processos fisiológicos como migração celular, incremento do fluxo sanguíneo, liberação de fatores de crescimento e citocinas, que estimulam o recrutamento, a diferenciação e a comunicação das células, bem como benefícios para o estabelecimento de novos protocolos de reabilitação ao paciente acometido pelas feridas crônicas, desde sua eficácia à viabilidade.

Garantimos ao(à) Sr(a) a manutenção do sigilo e da privacidade de sua participação e de seus dados durante todas as fases da pesquisa e posteriormente na divulgação científica.

O(A) Sr(a) pode entrar em contato com o pesquisador responsável Priscila Cristina Oliveira Zignani Pimentel a qualquer tempo para informação adicional no telefone (17) 997771579.

Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término pelo(a) Sr(a) e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

Li e concordo em participar da pesquisa.

Fernandópolis, ____/____/____

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B – Instrumento de Coleta de Dados

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

IDADE: () 30 a 35 anos () 36 a 40 anos () 41 a 45 anos () 46 a 50 anos
() 51 a 55 anos () 56 a 60 anos () 61 a 65 anos () 66 a 70 anos () 71 a
75 anos () 76 a 80 anos

SEXO: () masculino () feminino

COR DA PELE: () branca () parda () amarela () negra

SITUAÇÃO CONJUGAL: () solteiro () casado () separado () divorciado ()
viúvo

ESCOLARIDADE: () analfabeto () ensino fundamental incompleto () ensino
fundamental completo () ensino médio incompleto () ensino médio completo
() ensino superior incompleto () ensino superior completo

RENDA FAMILIAR:

- () < ou = 1 salário mínimo (R\$ 1.212,00)
() entre 1 (R\$ 1.212,00) e 2 salários mínimos (R\$2.224,00)
() entre 2 (R\$2.224,00) e 3 salários mínimos (R\$3.636,00)
() entre 3 (R\$3.636,00) e 4 salários mínimos (R\$4.848,00)
() > que 4 salários mínimos (R\$4.848,00)

RESIDE COM QUANTAS PESSOAS _____

EXERCE ATIVIDADE LABORAL: _____

MORADIA: ÁGUA TRATADA: () sim () não. De onde vem? _____

CONDIÇÕES DE HIGIENE: _____

ESGOTO ENCANADO () sim () não

ANAMNESE

QUEIXA PRINCIPAL RELACIONADO A FERIDA:

HISTÓRICO DE DOENÇA FAMILIARES:

PRINCIPAIS COMORBIDADES:

() HAS. há quanto tempo? _____Medicação/quantidade:_____

() DM. há quanto tempo?
_____Medicação/quantidade:_____

() IRC. há quanto tempo? _____Medicação/quantidade: _____

() CÂNCER. há quanto tempo? _____

() OUTRAS DOENÇAS E MEDICAÇÕES

ORIENTAÇÃO NO TEMPO E ESPAÇO/COMUNICAÇÃO/ATENÇÃO:

() orientado; () alerta; () sonolento; () agitado; () torporoso; () confuso;
memória prejudicada: () sim () não;

comunica-se: () oralmente () por gesto () escrita () dislalia

REALIZA ATIVIDADE FISICA? SIM () NÃO (). SE SIM, qual atividade,
periodicidade e quanto tempo?

TABAGISMO: () NÃO () SIM. nº cigarros/dia _____há quanto tempo?

() ex tabagista há quanto tempo? _____

ETILISTA () NÃO () SIM; DROGAS ILÍCITAS: () NÃO () SIM QUAL(IS)?

CARACTERÍSTICA DA PERNA/PÉ

TEMPERATURA () quente ou morno () frio

COLORAÇÃO () normal () pálido com elevação ou cianótico com declive

ASPECTO DA PELE () pele seca e fissurada () pele fina e brilhante

DEFORMIDADE () dedo em garra dedo em martelo, pé de charcot ou outro
() deformidades ausentes

SENSIBILIDADE () diminuída ou alterada () sensação dolorosa, aliviada quando
as pernas estão pendentes

EDEMA () presente () ausente

AMPUTAÇÃO () NÃO () SIM, local _____tempo _____

AValiação DA FERIDA

TIPO: () úlcera venosa; () úlcera arterial; () lesão por pressão; () úlcera mista;
() úlcera oncológica; () pé diabético

LOCAL DA LESÃO: _____

NÚMERO DE FERIDAS _____

HISTÓRIA PREGRESSA DA FERIDA: _____

QUANTO AO TEMPO (MESES/ANOS): _____

JÁ FEZ TRATAMENTO DE FERIDA:

() NÃO () SIM QUANTO TEMPO _____

MEDICAÇÃO _____

LEITO DA FERIDA

NECROSE () não () sim quantidade _____ desbridamento () não () sim

CROSTA () não () sim quantidade _____

GRANULAÇÃO () não () sim quantidade _____

EPITELIZAÇÃO () não () sim quantidade _____

ESFACELOS () não () sim quantidade _____

FERIDA APRESENTANDO TÚNEL E INFECÇÃO TECIDUAL PROFUNDA

() não () sim, quantidade _____

MACERAÇÃO DA PELE () não () sim quantidade _____

EXSUDATO () seca – sem exsudato () leve () moderado () intenso

TIPO EXSUDATO () seroso () sanguíneo () serossanguíneo () purulento

PROFUNDIDADE

() perda parcial da espessura da pele envolvendo epiderme e/ou derme

() perda total da espessura da pele envolvendo dano ou necrose do tecido subcutâneo

() perda total da espessura da pele com destruição extensa, dano muscular, ósseo ou das estruturas de apoio

BORDAS

() indefinidas, não visíveis claramente

() definidas, contorno claramente visível, aderidas, niveladas com a base da ferida

() bem definidas, não aderidas a base da ferida

() bem definidas, não aderidas a base, enrolada, espessada

() bem definida, fibrótica, com crostas e/ou hiperqueratose

SINAIS E SINTOMAS DE INFECÇÃO

ausente

aumento da dor

odor fétido

eritema

calor local

outros _____

NÍVEL DE DOR

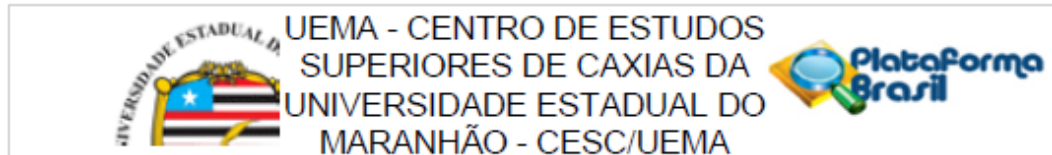
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

NECESSITA DE AUXÍLIO PARA CUIDADOS COM A FERIDA?

NÃO SIM

QUAL A FREQUÊNCIA DO ACOMPANHAMENTO MÉDICO?

ANEXO A – Parecer CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Eficácia da ozonioterapia associada a fotobiomodulação no reparo de feridas crônicas

Pesquisador: Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra

Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País;

Versão: 1

CAAE: 37021620.2.0000.5554

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.246.236

Apresentação do Projeto:

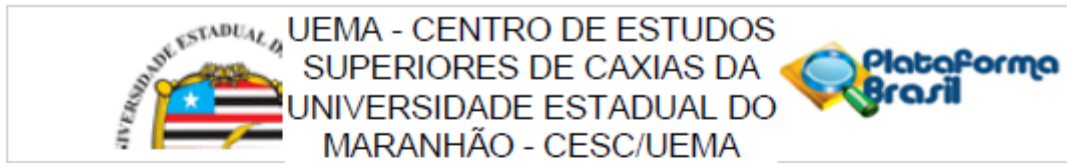
O projeto de pesquisa cujo título Eficácia da ozonioterapia associada a fotobiomodulação no reparo de feridas crônicas, nº de CAAE 37021620.2.0000.5554 e Pesquisador(a) responsável Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra. Trata-se de um estudo ensaio clínico randomizado controlado, pois os grupos serão parecidos diferenciando somente pela técnica aplicada, o que possibilita avaliar o impacto do desfecho de um grupo sobre o outro, e duplo-cego, pois os participantes não terão conhecimento da intervenção a ser aplicada, assim como o avaliador não saberá a qual grupo pertence o participante.

O cenário da realização desse estudo será composto pela na Unidade Básica de Saúde Maioba do Mocajituba com o conhecimento da Diretora da Unidade Básica De Saúde Enª Santana Castro Santana.

Os participantes desta pesquisa serão 150 pacientes com idade entre 30 e 70 anos. Os participantes serão recrutados através de busca ativa em todas Unidades de Saúdes do município e divulgação do projeto para a comunidade sobre forma de cartaz informativo nos prontos atendimento com direcionamento para a UBS eleita para acolhimento e desenvolvimento da pesquisa; sendo organizados em 6 grupos, conforme o tipo de terapia utilizada, se tradicional ou ozonioterapia.

Os critérios de inclusão serão - Pacientes de 30 a 70 anos, portadores de feridas crônicas, de

Endereço: Rua Quinhinha Pires, 743
 Bairro: Centro CEP: 70.255-010
 UF: MA Município: CAXIAS
 Telefone: (99)3251-3938 Fax: (99)3251-3938 E-mail: cepe@cesc.uema.br



Continuação do Parecer: 4.246.236

etiologia vascular. Podendo ser venosa, arterial ou mista. Em tempo, serão excluídos Pacientes Acamados, Pacientes portadores de diabetes, neoplasias, hanseníase, pacientes com problema neurológico, pacientes gestantes, pacientes com HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana).

Para tanto, após o recrutamento dos pacientes, será feita uma avaliação clínica criteriosa e, em seguida, a Intervenção propriamente dita, durante um período de 12 semanas, quando haverá nova avaliação e comparação entre a terapia desenvolvida e tomada a decisão cabível.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos da ozonioterapia associado ou não a fotobiomodulação em feridas crônicas comparado com o tratamento convencional.

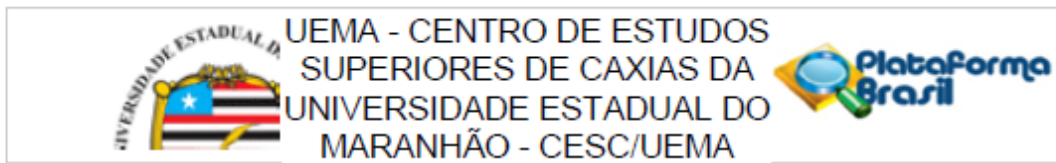
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos informados são para os pacientes e estão adequadamente informados, tanto na Metodologia do projeto de pesquisa, quanto no TCLE, como; No presente estudo não será realizado a administração de fármacos via

sistêmicos. Os pesquisadores do estudo utilizarão questionários validados internacionalmente. Todo profissional envolvido na pesquisa que tiver acesso aos dados dos prontuários dos pacientes tem conhecimento e acerca da RESOLUÇÃO CFM Nº 999/80 de 23 de maio de 1980, mantendo sempre o sigilo e o compromisso de não divulgação de dados de identificação. Os pesquisadores irão avaliar os pacientes por meio de avaliação macroscópica da lesão, a qual avalia a localização e aspectos da ferida. Essa avaliação não promove nenhum risco ao paciente, pois não é invasiva e a equipe. Como minimização dos riscos propuseram como por exemplo, o paciente e o terapeuta irão fazer o uso obrigatório de óculo protetor para barrar a penetração da luz laser, região do vermelho e infravermelho, a todo o momento em que o aparelho estiver emitindo luz. Ainda, a TFBM com doses de baixa intensidade de luz é bem tolerada pelo ser humano, e não promove efeitos adversos sistêmicos ou local para áreas onde ocorre aplicação. Ainda, a probe do equipamento TFBM será recoberta com filme PVC para evitar a contaminação cruzada entre os pacientes, assim a cada aplicação a troca de filme PVC e higienização da probe serão realizadas.

Quanto aos benefícios do projeto foram informados - Todos os pacientes serão submetidos à avaliação clínica a partir da anamnese. Também serão avaliados quanto a presença de

Endereço: Rua Quinhinha Pires, 743
 Bairro: Centro CEP: 70.255-010
 UF: MA Município: CAXIAS
 Telefone: (99)3251-3938 Fax: (99)3251-3938 E-mail: cepe@cesc.uema.br



Continuação do Parecer: 4.246.236

microrganismos no leito da ferida e as alterações morfológicas induzidas no tecido. Então, os pacientes receberão a administração de óleo ozonizado no leito da ferida associado ou não a fotobiomodulação. O entendimento das respostas dessas avaliações somados à possível influência positiva do uso das terapias poderá trazer restauração e estimulação de múltiplos processos fisiológicos como migração celular, incremento do fluxo sanguíneo, liberação de fatores de crescimento e citocinas, que estimulam o recrutamento, a diferenciação e a comunicação das células, bem como benefícios para o estabelecimento de novos protocolos de reabilitação ao paciente diabético acometido pelas feridas crônicas, desde sua eficácia à viabilidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e apresenta interesse público e o(a) pesquisador(a) responsável tem experiências adequadas para a realização do projeto, como atestado pelo currículo Lattes apresentado. A metodologia é consistente e descreve os procedimentos para realização da coleta e análise dos dados. O protocolo de pesquisa não apresenta conflitos éticos estabelecidos na Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de Apresentação obrigatória tais como Termos de Consentimento, Ofício de Encaminhamento ao CEP, Autorização Institucional, bem como os Riscos e Benefícios da pesquisa estão claramente expostos e coerentes com a natureza e formato da pesquisa em questão.

Recomendações:

Nenhuma.

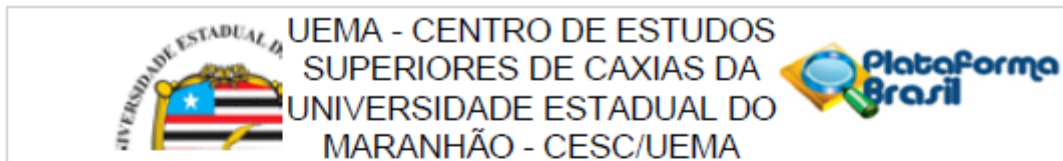
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está APROVADO e pronto para iniciar a coleta de dados e todas as demais etapas referentes ao mesmo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este Comitê de Ética em Pesquisa, órgão devidamente integrado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tem o prazer de avaliar o projeto de pesquisa cujo título Eficácia da ozonioterapia associada a fotobiomodulação no reparo de feridas crônicas, com nº de CAAE 37021620.2.0000.5554 e Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra. Assim, clarificamos que o parecer aqui exposto foi fruto de um trabalho coletivo, cuja decisão final ocorreu mediante reunião de colegiado. Portanto, parabenizamos a iniciativa do(s) pesquisador(es) em efetuar o Cadastro do Projeto de pesquisa junto à Plataforma Brasil, uma vez que a pesquisa envolvendo seres humanos é algo extremamente importante e que deve ser analisada com o máximo esmero e respeito.

Endereço: Rua Quinhina Pires, 743
 Bairro: Centro CEP: 70.255-010
 UF: MA Município: CAXIAS
 Telefone: (99)3251-3938 Fax: (99)3251-3938 E-mail: cepe@cesc.uema.br



Continuação do Parecer: 4.246.236

Desejamos uma pesquisa grandiosa e que os resultados sirvam para a melhoria da sociedade.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

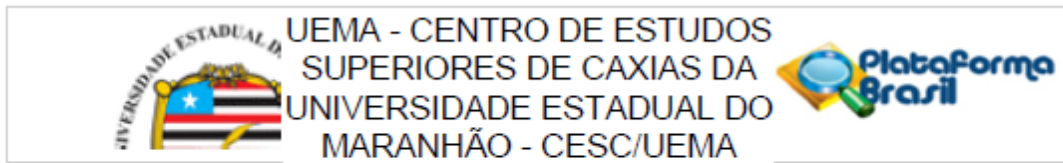
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1615879.pdf	20/08/2020 22:11:07		Aceito
Outros	instrumento.pdf	20/08/2020 21:53:46	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Outros	cep.pdf	20/08/2020 21:51:45	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Outros	CARTA.pdf	20/08/2020 21:47:23	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Outros	conflito.pdf	20/08/2020 21:42:51	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Declaração de Pesquisadores	dec.pdf	20/08/2020 21:29:13	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	20/08/2020 18:29:34	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Orçamento	custeio.pdf	20/08/2020 18:24:42	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	20/08/2020 18:19:04	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/08/2020 18:06:17	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	20/08/2020 18:02:12	Thallita Karollaine de Queiroz Pereira Serra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Quinhinha Pires, 743
 Bairro: Centro CEP: 70.255-010
 UF: MA Município: CAXIAS
 Telefone: (99)3251-3938 Fax: (99)3251-3938 E-mail: cepe@cesc.uema.br



Continuação do Parecer: 4.246.236

Sim

CAXIAS, 30 de Agosto de 2020

Assinado por:
FRANCIALMA SOARES SOUSA CARVALHO FILHA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Quinhinha Pires, 743
Bairro: Centro CEP: 70.255-010
UF: MA Município: CAXIAS
Telefone: (99)3251-3938 Fax: (99)3251-3938 E-mail: cepe@cesc.uema.br