

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

JULIANA CAROLINA TAROCCO

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE OZONÓLISE NO PROCESSO DE
OZONIZAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL UTILIZADO PARA O REPARO
DE PELE**

**INFLUENCE OF OZONOLYSIS TIME ON THE PROCESS OF
OZONIZATION OF VEGETABLE OIL USED FOR SKIN REPAIR**

São Paulo – SP

2023

JULIANA CAROLINA TAROCCO

**INFLUÊNCIA DO TEMPO DE OZONÓLISE NO PROCESSO DE
OZONIZAÇÃO DE ÓLEO VEGETAL UTILIZADO PARA O REPARO
DE PELE**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Roberta Tim.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Laurita Santos.

São Paulo – SP

2023

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

T195i TAROCCO, Juliana Carolina.

Influência do tempo de ozonólise no processo de ozonização de óleo vegetal utilizado para o reparo de pele / Juliana Carolina Tarocco
-- São Paulo: Universidade Brasil, 2023.
52 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.
Orientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.
Coorientação: Profa. Dra. Laurita dos Santos.

1. Ozônio. 2. Reparo tecidual. 3. Feridas. I. Tim, Carla Roberta. II. Santos, Laurita dos. III. Título.

CDD 610.28




**UNIVERSIDADE
BRASIL**

TERMO DE APROVAÇÃO


JULIANA CAROLINA TAROCCO

"Influência do tempo de ozonólise no processo de ozonização do óleo vegetal utilizado para reparo de pele"


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:

Documento assinado digitalmente
 **CARLA ROBERTA TIM**
Data: 04/09/2023 13:09:02 -0500
Verifique em: <https://validar.ub.gov.br>

Profa. Dra. Carla Roberta Tim (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
 **RODRIGO SAVIO PESSOA**
Data: 11/09/2023 09:46:31 -0500
Verifique em: <https://validar.ub.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo Savio Pessoa (UNIVERSIDADE BRASIL)

Documento assinado digitalmente
 **CINTIA CRISTINA SANTI MARTIGNAGO**
Data: 05/09/2023 10:43:14 -0500
Verifique em: <https://validar.ub.gov.br>

Profa. Dra. Cintia Cristina Santi Martignago (Universidade Federal de São Paulo)

São Paulo, 31 de agosto de 2023.
Presidente da Banca Prof.(a) Dr.(a) Carla Roberta Tim

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



**UNIVERSIDADE
BRASIL**

Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do 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 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: "Influência do tempo de ozonólise no processo de ozonização do óleo vegetal utilizado para reparo de pele"

Autor(es):

Discente: JULIANA CAROLINA TAROCCO

Assinatura: _____



Documento assinado digitalmente
JULIANA CAROLINA TAROCCO
Data: 20/05/2023 10:40:29 BRT
Verifique em: <https://validar.dig.br>

Orientador(a): Profa. Dra. Carla Roberta Tim

Assinatura: _____



Documento assinado digitalmente
CARLA ROBERTA TIM
Data: 11/05/2023 14:58:07 -0300
Verifique em: <https://validar.dig.br>

Coorientador(a): Prof.(a) Dr.(a)

Assinatura: _____

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

Data: 31/08/2023

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, fundação que apoiou este projeto.

Não poderia terminar esta dissertação de mestrado sem agradecer o grande e precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer a minha orientadora, Prof. Dra. Carla Roberta Tim, por acreditar e me apoiar desde o início desta jornada científica, por toda a paciência e empenho com que sempre me orientou neste trabalho e em todos os que realizei antes e durante o mestrado. Muito obrigada por me corrigir quando necessário sem nunca me desmotivar, você é minha fonte de admiração.

Agradeço imensamente a minha família, primeiramente aos meus pais Devanir Tarocco e Claudia Guerini Tarocco, por serem meus exemplos de determinação e honestidade. Foram os primeiros a acreditar que eu pudesse realizar algo importante na vida, agradeço por nunca me deixarem desistir, pelo suporte e amparo nos momentos difíceis e por todo o amor ao longo de toda minha vida. As minhas irmãs, Camila Cristina Tarocco e Daniela Angelica Tarocco por estarem sempre ao meu lado me mostrando que nunca estarei sozinha e que tenho um grande apoio para seguir lutando. Agradeço ainda mais à Camila por me proporcionar vivenciar o maior amor que eu poderia sentir, meus sobrinhos Vinicius, Pedro Henrique e Heloisa, que me dão motivos para sorrir e me mostram o quanto a vida pode ser linda.

As minhas irmãs de alma, Camila Ayarroyo de Oliveira e Carolina Guerra da Mota e Silva por todo suporte e amor em todos os momentos difíceis e maravilhosos, vocês sempre estiveram abertas e dispostas a me acolher quando precisei e eu sou imensamente grata.

Sou grata a cada pessoa que esteve comigo, mesmo que brevemente, nesta trajetória, sem vocês, teria sido muito difícil enfrentar os obstáculos e devo a todos vocês os momentos maravilhosos que pude vivenciar. Não conseguirei colocar aqui todas as pessoas incríveis que tenho a sorte de conhecer, mas quero deixar registrado algumas pessoas essenciais como, Felipe Braccialli, Beatriz Dombrovsk, Marcela Rosalem, Nyanne Resende, Izabela Eduarda, Ana Carolina Nishimoto, Paula Sumie, Claudio Camacho, Bruno Ribeiro.

Gratidão a todos os Orixás e Mensageiros que me protegeram e abriram todos os caminhos espirituais para que eu pudesse chegar até aqui, por todo o amparo nos dias difíceis e a por toda a força para continuar.

Gostaria, ainda, de agradecer a todos os professores do Programa de Pós-Graduação da Universidade Brasil, por todo ensinamento transmitido dentro e fora das aulas e por toda paciência durante este período, em especial minha coorientadora Professora Doutora Laurita Santos e a Professora Doutora Livia Assis. Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação, que estavam juntos nas viagens e estudos, especialmente a Carla Zordan, Rafael Guerra, Fabrício Silva, Carla Camargo, Luciana Ribeiro e Elvira Luz, por todo apoio e companheirismo nesta trajetória.

A vocês, todo o meu amor e gratidão.

RESUMO

Lesões cutâneas, que são interrupções na continuidade das camadas da pele, afetam significativamente a qualidade de vida tanto de humanos quanto de animais. Essas lesões também implicam em altos custos para a rede de saúde pública e gastos consideráveis em clínicas e hospitais veterinários. Dado esse contexto, este estudo objetivou avaliar a influência do tempo de ozonólise durante o processo de ozonização do óleo de girassol com fluxo de O_2 de 3L/min em uma concentração de $O_3 = 41,6$ g/m³ no estímulo do reparo de feridas dérmicas em animais. Foram utilizados 35 ratos Wistar machos, que tiveram feridas induzidas por um punch de 10 mm. Estes foram distribuídos em grupos: controle (sem tratamento), e grupos tratados com óleo de girassol ozonizado por 30, 60, 90 e 120 minutos. Em cada lesão, foram administrados 80 uL do óleo ozonizado topicamente por 10 dias consecutivos. Na avaliação macroscópica, nenhum animal apresentou sinais de odor, necrose, fibrose ou presença de líquido na lesão. A análise do índice de reparo indicou que todos os grupos tiveram a mesma redução percentual da área lesionada. Similarmente, a análise histológica não mostrou diferenças no processo de reparo entre os grupos. A espectroscopia Raman diferenciou com sucesso a pele lesionada da pele saudável, mas não conseguiu distinguir entre o grupo controle e os grupos tratados com óleo ozonizado. Conclui-se que o tempo de ozonização do óleo, até 120 minutos, não alterou de forma significativa as estruturas químicas da pele nem estimulou seu reparo.

Palavras-chave: Ozônio; Reparo tecidual; Feridas.

ABSTRACT

Background: Cutaneous injuries disrupt skin layer continuity, affecting the quality of life in humans and animals and leading to healthcare costs. This study examined the influence of ozonolysis duration during sunflower oil with an O₂ flow of 3L/min at a concentration of O₃ = 41.6 g/m³ ozonation on tissue repair in animal dermal wounds. **Methods:** 35 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*: var. albinus) were wounded using a 10mm punch. They were grouped based on the ozonated sunflower oil treatment duration: Control (no treatment), 30, 60, 90, and 120 minutes. For ten days, 80 uL of the respective ozonated oil was applied to wounds. **Results:** Macroscopic analysis showed no signs of odor, necrosis, fibrosis, or fluid in wounds for all groups. All exhibited similar wound area reduction percentages. Histological examination found no differences in tissue repair among groups. Raman spectroscopy differentiated between injured and healthy skin but not between control and ozonated oil-treated groups. **Conclusion:** Ozonating sunflower oil for up to 120 minutes does not appear to modify the skin's chemical structure to enhance wound repair.

Keywords: Ozone; Tissue repair; Wounds.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

No presente trabalho, os resultados das análises macroscópicas e histológicas mostraram que nenhum dos tempos (30 minutos; 60 min; 90 min e 120 min) utilizados no processo de ozonização do óleo de girassol conseguiu estimular o processo de reparo cutâneo comparados ao grupo controle que não teve tratamento. A análise por Espectroscopia Raman conseguiu diferenciar os grupos de tecido normal e a área de lesão, porém não conseguiu identificar diferenças entre os grupos. O que pode ser justificada pela intensidade dos aminoácidos prolina/hidroxiprolina e de amida III que na pele lesionada foi maior do que na pele normal, refletindo a formação excessiva de colágeno. Contudo, assim como nas análises histológicas, a avaliação por Espectroscopia Raman demonstrou que todos os tempos utilizados para ozonólise do óleo de girassol neste estudo, não foram suficientes para promover estímulo na produção de colágeno. Assim, além do tempo de processo de ozonólise, a quantidade de insaturação presente no óleo vegetal pode afetar a composição e efeitos terapêuticos de óleos ozonizados. Portanto, os tempos de 30 a 120 minutos utilizados para o processo de ozonólise do óleo de girassol presentes neste trabalho não foram suficientes para estimular o processo de reparo cutâneo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Gerador de ozônio da marca Ozone Solutions.	29
Figura 2- Esquema representativo do modelo experimental de ferida através de punch dermatológico de 10 mm.....	31
Figura 3- Achados macroscópicos das feridas.....	36
Figura 4- Percentual de redução do reparo de ferida.....	37
Figura 5- Fotomicrografias representativas da análise histológica.....	38
Figura 6- Representação da quantidade de colágeno.....	39
Figura 7- Técnica Elbow – para determinar número de Clusters.....	39
Figura 8- Dendrograma apresentando a análise de Cluster.....	40
Figura 9- Técnica K-Means.....	42
Figura 10- Média e desvio padrão, dos Clusters 1 e.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dosagem de Ozônio dos diferentes tempos de Ozonólise.....	29
Tabela 2: Divisão dos Grupos Experimentais.....	31
Tabela 3: Comprimentos de Ondas analisados com suas respectivas bandas referentes a Colágeno.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Associação Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ),

Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA)

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Fator de Crescimento Epidermal (EGF),

Fator de Crescimento Endotélio Vascular (VEGF)

Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (bFGF),

Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β)

Fator de Transcrição Nuclear Derivado de Eritroides tipo 2 (Nrf2)

Glutathione (GSH)

Glutathione Peroxidase (GPx)

Hematoxilina e Eosina (HE)

Matriz Extracelular (MEC)

Oxigênio (O₂)

Ozônio (O₃)

Sem raça definida (SRD)

Trifosfato de Adenosina (ATP)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1. PROCESSO DE REPARO	20
3.2. OZÔNIO	23
3.3. OZONIOTERAPIA NA MEDICINA VETERINÁRIA	25
3.4. ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS	28
3.5. ESPECTROSCOPIA RAMAN	28
4. METODOLOGIA OU MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. PROCESSO DE OZONÓLISE	29
4.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	30
4.3. MODELO EXPERIMENTAL DE FERIDAS.....	30
4.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	31
4.5. PROTOCOLO DE TRATAMENTO.....	32
4.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	32
4.7. ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	32
4.8. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS.....	33
4.9. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	33
4.10. ANÁLISE DE COLÁGENO.....	34
4.11. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	34
4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5. RESULTADOS	36
5.1. ACHADOS MACROSCÓPICOS	36
5.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS.....	37
5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA	37
5.4. ANÁLISE DE COLÁGENO	38
5.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	39
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO.....	47

8. REFERÊNCIAS	48
9. ANEXO I	52

1. INTRODUÇÃO

A lesão cutânea é a interrupção na continuidade das camadas constituídas da pele, sendo estas, a epiderme, derme e tecido conjuntivo subcutâneo (Iacopetti et al., 2020). Casos de lesões cutâneas em animais são rotineiros na clínica veterinária há muitos anos. Suas técnicas de tratamento mudam constantemente a partir do melhor entendimento do processo fisiológico do reparo tecidual e dos mecanismos de ação de cada fármaco ou técnica utilizada. Visto que as lesões cutâneas são multifatoriais e entendendo que o processo de reparo tecidual é o mesmo, independente da causa desta, devemos considerar o estado geral, alguma comorbidade e a individualidade de cada paciente, para assim poder escolher um melhor tratamento para o caso. Dentre as diversas causas de lesões cutâneas, podemos citar como principais lacerações cutâneas por brigas entre animais, traumas automobilísticos, traumas por projétil de armas de fogo; lesões cirúrgicas; térmicas e secundárias às patologias (Balsa & Culp, 2015; Hamilton & Kožár, 2017). Ainda, Bohling & Henderson, (2006), apresentam as diferenças existentes em cada espécie animal, em que suas divergências anatômicas diferem no processo de reparo cutâneo, afirmando a importância de repensar meios eficazes para cada espécie tratada.

O reparo tecidual total de uma área lesada ocorre quando o tecido que foi anteriormente lesionado volte a sua normalidade anatômica. Devido às complicações decorrentes das lesões, o reparo tecidual pode se tornar mais lento e de difícil reparo. Para isso, buscamos métodos que auxiliem no processo de reparo, como a redução da quantidade de medicamentos, menor tempo de reparo, menor estresse do animal com manipulação de curativos, que em muitas vezes necessitam de anestésias repetidas, aumentando os custos do tratamento. Afirmando a importância da busca por uma qualidade do reparo tecidual, proporcionando qualidade de vida, menor tempo e custo no tratamento para o tutor e paciente (Balsa & Culp, 2015; Pitt & Stanley, 2014). Ainda, devem ser considerados vários fatores para determinar que um reparo tecidual esteja completo, como a causa da lesão, tensão da pele lesionada, extensão da ferida, vulnerabilidade à infecção e suporte sanguíneo do tecido (Iacopetti et al., 2020).

Na medicina veterinária a ozonioterapia vem sendo utilizada em várias áreas por sua ampla lista de benefícios e variedades nas aplicações. Algumas patologias podem diferir, comparando pequenos e grandes animais, como, por exemplo, mastites

e afecções reprodutivas em grandes ou leishmaniose e esporotricose em pequenos animais, porém é amplamente utilizada em todas as espécies para o controle de dor, doenças intervertebrais, artropatias, lesões crônicas e agudas de pele (Sumida & Hayashi, 2022). Ainda, como o uso indiscriminado de antibióticos e a resistência bacteriana tem sido um grande problema na atualidade, dificultando o tratamento de diversas patologias, o ozônio entra como fator adjuvante terapêutico por sua eficiência como antimicrobiano sem desencadear resistência (Kozat, 2019).

A associação do ozônio com óleos vegetais tem mostrado benefícios na reparação tecidual, através da liberação de células e citocinas inflamatórias que estimulam o reparo tecidual. Esta associação é utilizada topicamente e tem como função sua ação germicida potente, o aumento da vascularização local, melhora da disponibilidade de oxigênio através do metabolismo celular, além de estimular o crescimento do tecido de granulação e renovação do tecido epitelial. Alguns dos principais óleos associados com o ozônio são, azeite de oliva, óleo de coco e de girassol. Sendo que o óleo de girassol tem demonstrado manter melhor as propriedades do ozônio (KRKL C et al., 2016).

Alguns trabalhos desenvolvidos com ozonioterapia na medicina veterinária foram analisados por Orlandin et al. (2021), nesta revisão os autores mostram as eficácias das aplicações do ozônio em diferentes patologias, tanto na forma de gás, espuma uterina e óleo ozonizado. Porém, em todos os trabalhos foi verificado a insuficiência de informações sobre dosagem, nível de peróxido dos óleos e o tempo de ozonização. Isto nos faz levantar a questão de quanto tempo um óleo deve ser ozonizado para realmente ser eficaz em um reparo tecidual, qual é a quantidade de peróxido contida no óleo que faz com que melhore a reparação tecidual.

Durante o processo de ozonólise do óleo alguns parâmetros são importantes para garantir a eficácia dele, como o tempo e a concentração do ozônio no óleo. Mesmo sendo um fator muito importante, não há na literatura uma padronização destes parâmetros, principalmente o tempo de ozonização e quais as alterações que ocorrem. Pela inexistência destas informações vemos a necessidade de pesquisas voltadas para a produção e dosagens do ozônio em óleos terapêuticos, comprovando, assim, sua eficácia (Orlandin et al., 2021a; Uebele et al., 2022). Este estudo tem como objetivo avaliar o processo de ozonização do óleo de girassol e sua influência no estímulo do reparo tecidual de feridas dérmicas induzidas em animais. Portanto, comprovar se a aplicação tópica do óleo de girassol ozonizado em 30, 60, 90 e 120

minutos, a cada 24 horas, acelerará significativamente o processo de reparo tecidual de feridas induzidas em ratos, promovendo modulação da inflamação, angiogênese, melhora do tecido de granulação e estimulação do colágeno, comparando com o grupo controle que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Ainda, se a análise por Espectroscopia Raman é capaz de identificar as mudanças bioquímicas presentes nos grupos tratados.

2. OBJETIVOS

Avaliar se o tempo de ozonólise do processo de ozonização de óleo de girassol influencia no estímulo do reparo tecidual de feridas dérmicas induzidas em animais.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar qual a dosagem de ozônio produzida em 30, 60, 90 e 120 minutos de ozonização do óleo de girassol.

Avaliar a eficácia do óleo de girassol ozonizado, aplicado a cada 24 horas, nos diferentes tempos de ozonização.

Avaliar se o óleo de girassol ozonizado na dosagem e quantidade de vezes aplicados neste trabalho, estimula a produção de colágeno.

Avaliar se a análise por Espectroscopia Raman consegue detectar diferenças bioquímicas produzidas pelo óleo de girassol ozonizado no estímulo do processo de reparo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. PROCESSO DE REPARO

A pele é o maior órgão do corpo, sendo responsável pela primeira linha de proteção do organismo, evitando a entrada de microrganismos e realizando a termorregulação. Em sua função de barreira física, sendo responsável por controlar a perda de água do organismo para o exterior. A formação da camada externa da pele, denominada epiderme, há a diferenciação e transformação dos queratinócitos. Os queratinócitos são divididos em estratos, sendo o estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e o estrato córneo. Essas diferenciações ocorrem progressivamente levando através da epiderme os queratinócitos até o estrato córneo. Através desta potente organização e destas múltiplas camadas hidrofóbicas em conjunto com os queratinócitos residuais, denominados cornócitos, é formada a barreira impermeável de proteção da pele (Berdyshev *et al.*, 2021; Fernández-Gallego *et al.*, 2021; Goleva *et al.*, 2019; Mittag *et al.*, 2017).

Imediatamente após uma lesão, o organismo desencadeia uma cascata de processos que podem ocorrer sequencialmente ou sobrepostos para que o reparo cutâneo do local lesado comece. A inflamação é um dos principais mecanismos de defesa do organismo, identificado, principalmente, com cinco sinais clínicos, como dor, rubor, edema, calor e perda de função. Inicialmente a úlcera cutânea é superficial, mas pode-se tornar profunda, possui bordas bem definidas e comumente com exsudato amarelado em seu interior. A pele ao seu redor pode ser purpúrica e hiperpigmentada, evidenciada por eritema, descamação e prurido, a dor é frequente de intensidade variável (Corrêa *et al.*, 2003; Iacopetti *et al.*, 2020; Mittag *et al.*, 2017). Com o intuito de acelerar ou melhorar este processo inflamatório, visando uma melhor o reparo tecidual, a ciência tem buscado meios na medicina popular natural ou integrativa, por meio de plantas e óleos (Balsa & Culp, 2015; Bezerra *et al.*, 2015).

Quando o organismo sofre alguma injúria endógena ou exógena, este reage produzindo exageradamente espécies reativas de oxigênio (ROS), durante o processo de inflamação, para o corpo voltar à sua homeostase. ROS é um termo que engloba inúmeros radicais livres, íons e espécies reativas, estas são produzidas por enzimas em vários tipos de células presentes no organismo. As ROS são geradas pelas células imunes ativadas e inflamatórias. Essas ROS são responsáveis pela eliminação de

patógenos invasivos, sendo benéfica para o organismo, porém quando a ROS é produzida cronicamente, começa a desencadear um estresse oxidativo exacerbado, gerando moléstias inflamatórias crônicas. Portanto, em uma lesão inflamada estarão ativas muitas espécies reativas de oxigênio aumentando o estresse oxidativo do organismo (Chatterjee, 2016).

Imediatamente após uma injúria o local lesionado sofre uma vasoconstrição momentânea devido à liberação de adrenalina e norepinefrina. Com o extravasamento de sangue neste local, os trombócitos se unem formando uma rede de fibrina, que, juntamente com as células vermelhas, formam a primeira barreira de proteção do local, impedindo que tenha uma maior hemorragia ou entrada de patógenos, estimulando os fatores de crescimento e quimiorreceptores para início da cascata de coagulação. Sequencialmente, ocorre uma maior permeabilidade dos vasos sanguíneos adjacentes, permitindo a transferência de células, principalmente inflamatórias, dos vasos para o local lesado. Em segundo momento, as células de defesa, principalmente macrófagos, que se deslocam para o local da lesão com a função de fagocitar e decompor detritos e causar a morte de bactérias, proporcionar a secreção dos fatores de crescimento que irão reparar o tecido lesado, além de estimular a angiogênese local (Alhaji M & Goyal A, 2022; Balsa & Culp, 2015).

No processo de reparação do tecido a inflamação é peça fundamental, pois esta desencadeia liberação dos leucócitos que, por vez, são responsáveis por fagocitar os agentes causadores da injúria e necroses do tecido. Porém, o processo inflamatório exacerbado pode ser prejudicial para o reparo tecidual, por seu acúmulo de líquido exsudativo e edema local. Estes fatores atrapalham a proliferação dos fibroblastos e colágeno importantíssimos para um tecido cicatricial de qualidade (Bezerra *et al.*, 2015).

Para uma reparação tecidual é necessário que fibroblastos, células epiteliais e endoteliais se organizem para compor o novo tecido local. Os fibroblastos são responsáveis pela produção de matriz extracelular, constituído, principalmente, de colágeno tipo III. Um local bem oxigenado e com uma boa angiogênese é essencial para a estimulação dos fibroblastos. O colágeno é desenvolvido pelos fibroblastos que, inicialmente, são aleatórios e sem organização, porém com as tensões da pele ao redor da lesão, os fibroblastos são sintetizados em colágenos que, por sua vez, vão se organizando e preenchendo o local (Alhaji M & Goyal A, 2022; Balsa & Culp, 2015).

A partir dos vasos adjacentes já existentes, novos vasos são formados por estímulo das citocinas e fatores de crescimento presentes no local da lesão. Esses novos vasos irão irrigar e proporcionar maior aporte de oxigênio para o novo tecido. Durante o processo de reparo tecidual de feridas tratadas em segunda intenção, que podem ser crônicas ou agudas, ocorre a formação do tecido de granulação, constituído pela presença de fibroblastos, células endoteliais, colágeno, inicialmente tipo III para então, ser posteriormente trocado por colágeno tipo I, matriz extracelular, novos vasos, células inflamatórias e por tecido conjuntivo. Este tecido tem grande importância nas fases de reparo tecidual, por servir de barreira física preenchendo o espaço da lesão e impedir a entrada de patógenos (Alhaji M & Goyal A, 2020).

As características macroscópicas presentes no local da lesão são muito importantes para avaliar o processo de reparo tecidual além do tamanho da lesão. Macroscopicamente é possível avaliar os sinais clássicos da inflamação: rubor, edema, calor e dor, ainda, à presença de crostas ou tecido necrótico. Poucos minutos após uma injúria tecidual ocorre o aumento da permeabilidade vascular, aumentando a quantidade de líquidos, apresentando rubor, calor e dor local. Estes fatores inflamatórios proporcionam a migração das células, citocinas e dos fatores de crescimento que irão iniciar o processo de reparo tecidual. Portanto, inicialmente a presença destas características são consideradas benéficas para o processo de reparo tecidual. Contudo, alguns fatores devem ser considerados durante o período de reparo tecidual de uma lesão. Quando o processo inflamatório gera um acúmulo exagerado de líquido cavitário ocorre à proliferação de microrganismos e a inibição da deposição de colágeno com a proliferação dos fibroblastos. Ainda, no local da lesão o aporte sanguíneo precisa ser suficiente para evitar que o tecido fique sem oxigenação e necrótico (Balsa & Culp, 2015; Batista *et al.*, 2010; Bezerra *et al.*, 2015).

Os cinco sinais clínicos da inflamação são fundamentais na resposta do organismo perante uma injúria. O Rubor, ou vermelhidão, é uma das evidências mais visíveis na inflamação de pele. A ocasionado pelo aumento do fluxo sanguíneo para a área afetada. A vasodilatação dos vasos na região faz com que a pele fique avermelhada, muitas vezes como resultado da liberação de substâncias químicas inflamatórias, como histamina. O Calor é ocasionado, também, com a vasodilatação, pois o aumento do fluxo sanguíneo pode tornar a área inflamada mais quente ao toque do que a pele circundante. O Edema ocorre pelo acúmulo de líquidos, células brancas do sangue e fatores de crescimento das plaquetas e citocinas na área inflamada. Esse

acúmulo é uma resposta natural do corpo para proteger a área afetada e iniciar o processo de cura. O inchaço pode causar desconforto e, em casos graves, pode limitar a função da área. A Dor é frequentemente associada à inflamação da pele devido à pressão exercida pelos componentes inflamatórios acumulados na área. Além disso, substâncias químicas liberadas durante a resposta inflamatória podem estimular terminações nervosas e causar sensações dolorosas. O último sinal clínico presente é a perda de função, o mesmo pode ocorrer quando uma inflamação é grave o suficiente para interferir no funcionamento normal da área afetada. Os sinais fazem parte de uma resposta protetora do corpo. Eles geralmente indicam que o sistema imunológico está ativo e trabalhando para reparar o dano ou fortalecer uma infecção (Balsa & Culp, 2015; Batista *et al.*, 2010).

3.2. OZÔNIO

A utilização do ozônio tem mais de 150 anos, sendo utilizado pela primeira vez como desinfetante de ambientes e para tratamento da água por sua função microbicida. Atualmente, é utilizado amplamente na rotina clínica, principalmente por ser um poderoso oxidante, antimicrobiano, seu alto fator anti-inflamatório e imunoestimulante (Sciorsci *et al.*, 2020).

O gás ozônio (O_3) foi descoberto em 1840 em um experimento envolvendo corrente elétrica realizado por Christian Friedrich Schonbein, notou o surgimento de um gás com odor característico (Kozat & Okman, 2019; Bocci, 2005). Ozônio é composto por 3 moléculas de Oxigênio, denominado Oxigênio Triatômico (O_3). É considerado o oxidante mais poderoso já encontrado na natureza. Por ser muito reativo o gás O_3 tem suas ligações desfeitas com grande facilidade. No organismo o ozônio age se ligando a moléculas com ligações duplas, como os ácidos graxos poli-insaturados, estes ácidos graxos quando são oxidados geram trifosfato de adenosina (ATP), nesta reação os 3 átomos de oxigênio se ligam às moléculas insaturadas gerando os ozonídeos e energia celular. A ozonólise é a reação realizada na quebra de uma ligação dupla ou tripla da molécula, resultando na formação dos compostos oxidativos, sendo estes, os aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos (Bezerra *et al.*, 2015; Bocci, 2011; Peteoacă, *et al.*, 2020).

O ozônio quando introduzido no organismo consegue se dissolver no plasma sanguíneo, com isto ele gera um leve estresse oxidativo. Quando o Ozônio entra em contato com ácidos graxos poli-insaturados ocorre a geração do peróxido de hidrogênio que é uma força reativa de oxigênio. Por ser um potente oxidante, o O₃, mesmo em doses baixas, pode estimular o fator de transcrição nuclear derivado de eritroides tipo 2 (Nrf2). O Nrf2 é responsável pela reprodução e aumento de antioxidantes circulantes, além de proteger as células de fatores endógenos ou exógenos. Ainda, demonstrou que doses baixas de O₃, na forma de gás (10 a 20 µg/ml), tem o potencial de estimular a liberação de Nrf2, produzindo efeitos positivos no controle do estresse oxidativo. Isto se deve pelo fator de reequilíbrio do estado redox desregulado; a redução dos marcadores de oxidação de lipídios e proteínas, redução do acúmulo de lipofuscinas; reparo dos níveis de Glutathione (GSH) e regulação da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx) cardíaca. Provando que houve uma melhora na falha de energia cardíaca e do hipocampo associado ao envelhecimento (Galiè *et al.*, 2018).

Conforme a Associação Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ), o ozônio é bastante reativo e altamente instável, logo retornando a oxigênio, isso justifica o fato do O₃ ser produzido imediatamente antes de ser utilizado com fins terapêuticos. A ozonioterapia pode ser aplicada por via intravenosa, intramuscular, subcutânea, intra-articular, por insuflação vaginal e retal, pode ainda ser aplicada na forma de autohemotransfusão e como tratamento tópico (Bocci, 2011; Nakao *et al.*, 2009).

Por sua atuação como desinfetante, anti-inflamatório e imunoestimulante, os óleos ozonizados são amplamente empregados na medicina veterinária, a fim de diminuir os custos com tratamentos mais convencionais (Chagas & Mira, 2015; De Souza *et al.*, 2022; Kramer & Jaines, 2022). Mesmo com inúmeros recursos naturais disponíveis, o interesse pelos óleos tem aumentado por suas características antimicrobianas, visto que há um grande aumento da resistência de microrganismos atualmente. Ainda, o tratamento prolongado com antimicrobianos convencionais causam alguns efeitos indesejáveis no organismo, podendo até ocorrer alteração do microbioma natural do intestino. A associação dos óleos vegetais com o Ozônio potencializa as propriedades benéficas de ambos os produtos naturais (Ugazio *et al.*, 2020). O óleo ozonizado é uma alternativa interessante na rotina clínica por ter grande facilidade de ser manuseado, por ser uma alternativa de tratamento domiciliar,

redução nos riscos que doses e volumes altos do gás podem causar, além de proporcionar maior durabilidade do ozônio (Anzolin *et al.*, 2020).

A literatura tem mostrado benefícios da utilização da ozonioterapia no processo de reparo do tegumento. Dentre estes, podemos citar um aumento local no número médio de fibroblastos, melhora a capacidade de transporte de oxigênio (O₂) por parte dos eritrócitos, neoangiogênese, além de estimular o sistema imunológico, tornando-se assim essa terapia uma importante ferramenta nesse cenário (Gironi *et al.*, 2021; Gracer & Bocci, 2005). Mediante técnicas histológicas foi possível evidenciar uma ativação e proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno a aumento da expressão de fatores de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (bFGF), Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF-β), os quais estão diretamente relacionados com o processo de reparo tecidual. Além disso, um estudo utilizando óleo ozonizado em úlceras necróticas induzidas por um agente químico em ratos demonstrou redução da área da ferida e melhora do reparo tecidual (Kesik *et al.*, 2016).

3.3. OZONIOTERAPIA NA MEDICINA VETERINÁRIA

A ozonioterapia está ganhando espaço na medicina veterinária como forma complementar de tratamento para inúmeras enfermidades. No entanto, há uma escassez muito grande na literatura de estudos que demonstrem os mecanismos de ação do uso de ozônio tópico através do óleo no processo de reparo tecidual. Ainda, pouco se sabe a respeito da melhor dose e concentração de ozônio a ser utilizada em administração tópica, uma vez que para o sucesso da ozonioterapia depende de doses e concentrações adequadas (Bocci, 2005).

A procura por uma compreensão melhor da medicina complementar tem aumentado para alcançar concepções de tratamentos para as diferentes enfermidades encontradas na rotina clínica veterinária. Uma das terapêuticas utilizadas na medicina complementar, é a ozonioterapia, que vem sendo amplamente utilizada e aprofundada cientificamente, por se mostrar eficaz em diversas enfermidades, com diferentes formas de aplicação, ainda que não possa ser considerado um tratamento sem contraindicações, é uma terapêutica não tóxica quando utilizada em vias de administrações e doses seguras (Ugazio *et al.*, 2020).

No estudo realizado por Bezerra *et al.* (2015), afirma que o tecido de granulação formado durante o reparo tecidual, a angiogênese se torna essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes do novo tecido. Observando que quanto maior a formação destes novos vasos sanguíneos, melhor e mais rápido é o processo de reparação tecidual.

Em equinos, assim como em pequenos animais, as lesões cutâneas possuem diferentes causas. Muitas vezes o processo de reparo cutâneo desses animais pode ser prejudicado dependendo da região anatômica lesada, a falta de irrigação sanguínea local e baixo aporte de oxigênio. Um dos principais desafios no reparo cutâneo em equinos é o processo de reparo tecidual exacerbado, com aumento do tecido de granulação, muito comum em equinos e que muitas vezes pode ser estimulado por algumas medicações convencionais. Com isto, as buscas por acelerar e melhorar o reparo cutâneo tem aumentado nos últimos anos, a fim de melhorar a qualidade de vida dos animais e diminuir tempo de internação e custos com tratamentos (Alencar *et al.*, 2020).

De Souza *et al.* (2022) avaliou a eficácia do óleo de girassol ozonizado, grupo 3, em feridas cirúrgicas de gatas submetidas à ovariosalpingohisterectomia eletiva, comparando com óleo de girassol puro e solução fisiológica 0,9%, grupos 1 e 2, respectivamente. O grupo 3 que foi tratado por 7 dias com óleo de girassol ozonizado, apresentou, a partir do terceiro dia de tratamento, uma redução no tamanho da ferida, comparada com os grupos 1 e 2. Ainda, no sétimo dia, o grupo 1 mantinha edema local e hiperemia, sendo que os grupos 1 e 2 não apresentavam estes sinais de inflamação. Concluindo que o uso do óleo de girassol ozonizado utilizado no reparo tecidual de lesões cirúrgicas em gatas apresentou um tempo menor de reparação tecidual, além de menor tempo de reparo tecidual completo comparados ao grupo controle. Porém, neste estudo, os autores não apresentam o nível de peróxido do óleo de girassol ozonizado, nem descrevem o processo e tempo de ozonização do óleo ou, ainda, qual aparelho foi utilizado, o que nos leva a questionar qual seria a melhor dosagem e tempo de ozonização para apresentar este resultado positivo.

Em retalhos cutâneos feito em 21 ratos, KRKL C *et al.* (2016), avaliou a neovascularização destes retalhos, dividindo os animais em 3 grupos, um sem tratamento, outro somente com azeite de oliva puro e o terceiro com azeite de oliva ozonizado. Os óleos foram aplicados duas vezes por dia em casa animal, dos grupos 2 e 3, por sete dias. Este estudo tinha como objetivo demonstrar a melhor

vascularização dos tecidos utilizados no retalho, além dos níveis de VEGF. Com isto, concluíram que tanto o azeite de oliva puro, quanto o azeite de oliva ozonizado aumentam a microvascularização do retalho, comparados ao grupo sem nenhum tratamento. Ainda, o grupo tratado com o óleo ozonizado demonstrou diferenças estatísticas de maior neovascularização que o grupo de óleo puro, sugerindo que o azeite de oliva ozonizado aumenta o VEGF local e consequentemente a microvascularização dos retalhos, sendo eficaz em reparo tecidual. Porém, não fornecem a quantidade de peróxido e nem tempo de ozonização do óleo utilizado, somente que foi utilizado por via tópica a cada 12 horas.

No relato apresentado por Kramer & Jaines, (2022), uma cadela, sem raça definida (SRD), com lacerações profundas em região cervical de aproximadamente dois anos, foi tratada com a combinação de gás ozônio e óleo ozonizado. A ozonioterapia neste relato complementou com o tratamento alopático. Foram realizadas aplicações tópicas diárias de óleo ozonizado (*Philozon®*) em conjunto com aplicação do gás ozônio local em “Bag” dividido em 6 sessões com concentração de 70 mg/L e 80 mg/L. Após duas sessões de ozonioterapia (bag) e óleo ozonizado, relatam melhora significativa na lesão. O óleo ozonizado foi utilizado durante todo o processo de tratamento da ferida, apresentando sucesso no reparo tecidual, além de baixo custo e um tratamento indolor para o paciente, com a redução da ferida, o animal foi submetido à cirurgia para o fechamento da ferida. Neste caso o reparo tecidual total da ferida durou 50 dias, porém a escassez de informações sobre o óleo ozonizado e a associação com outras técnicas e alopáticas, nos retorna para a incerteza do real beneficiamento dos óleos ozonizados, visto que não é descrito nem qual tipo de óleo vegetal é utiliza.

Orlandin *et al.* (2021) em sua revisão sistemática, reuniu alguns dos artigos veterinários que utilizaram Ozonioterapia. Dentre os tratamentos, oito destes artigos relataram o uso do Óleo Ozonizado, exclusivo ou complementar em seus tratamentos. Nestes artigos, todos os casos demonstraram melhora significativa, porém a insuficiência de informações importantes, como dosagem de ozônio ou o nível de peróxido dos óleos utilizados, nos limita a uma melhor compreensão da real eficiência destes tratamentos. Ainda, em vários artigos o óleo entra somente como uma terapia complementar, visto que outros meios de tratamento, como outras vias de administração do Ozônio, eram utilizadas, nos levando a questionar qual técnica

realmente traz eficiência no tratamento ou se o complemento de outras técnicas que proporciona a resolução da enfermidade.

3.4. ÓLEOS VEGETAIS OZONIZADOS

Uma forma de administração do ozônio em via tópica é através dos óleos vegetais ozonizados. Esta associação, pretende amplificar os benefícios já conhecidos dos óleos vegetais no reparo tecidual, ainda, consegue proporcionar um maior tempo de ação local. A aplicação tópica do Ozônio, através dos óleos ozonizados, desempenha ação antisséptica e estimulante do reparo tecidual promovendo a proliferação e remodelação de células teciduais (López et al., 2003; Bocci, 2005; Girondi et al., 2021).

3.5. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Existem várias técnicas para realizar a caracterização do tempo de ozonização dos óleos. Uma destas técnicas é a Espectroscopia Raman que é um método de análise não invasivo, que utiliza uma emissão de radiação eletromagnética que possibilita a análise das moléculas químicas de amostras orgânicas e inorgânicas, fornecendo informações sobre a composição bioquímica do tecido. Sendo um processo eficiente para acompanhar o processo de oxidação do óleo, transmitindo informações quantitativas e qualitativas da amostra. Ao incidir esta radiação eletromagnética na amostra, as moléculas químicas sofrem um espalhamento inelástico, ocorrendo a vibração e movimentação dos átomos, produzindo fótons que podem conter energia maior ou menor que a propagada pelo espectrômetro. Esta mudança de energia possibilita a quantificação e identificar como os átomos da amostra estão ligados. Cada molécula transmite um sinal específico denominado espectro, sendo assim, possível de classificar e quantificar cada molécula presente na amostra analisada (Rangaraju et al., 2019; Uebele et al., 2022).

As concentrações de colágeno presentes na pele são identificadas pelos aminoácidos prolina e hidroxiprolina identificados na região de onda entre 800 a 1000 cm^{-1} da região espectral (Téllez Soto et al., 2016).

4. METODOLOGIA OU MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PROCESSO DE OZONÓLISE

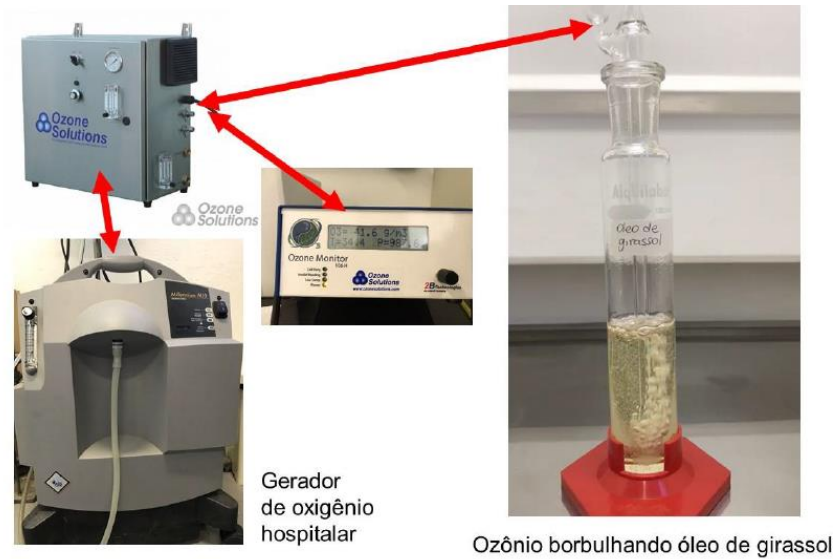
Para a produção do óleo ozonizado foi utilizado o óleo de girassol, de uma marca vendida comercialmente para uso alimentício, utilizando um sistema de borbulhamento acoplado a um gerador de ozônio da marca Ozone Solutions. O volume do óleo produzido em cada grupo foi de 80 mL, com fluxo de O₂ de 3L/min em uma concentração de O₃ = 41,6 g/m³, variando apenas o tempo de ozonólise, assim tivemos os seguintes grupos:

Tabela 1: Dosagem de Ozônio dos diferentes tempos de Ozonólise.

DOSAGEM DE OZÔNIO DO ÓLEO DE GIRASSOL	
Óleo de girassol sem ozonização	
Óleo de girassol com tempo de ozonólise de 30 minutos	dose de O ₃ 46,8 g/L;
Óleo de girassol com tempo de ozonólise de 60 minutos	dose de O ₃ 93,6 g/L;
Óleo de girassol com tempo de ozonólise de 90 minutos	dose de O ₃ 140,4 g/L;
Óleo de girassol com tempo de ozonólise de 120 minutos	dose de O ₃ 187,2 g/L.

Fonte: Autoria Própria

Figura 1- Gerador de ozônio da marca Ozone Solutions.



Fonte: autor

4.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

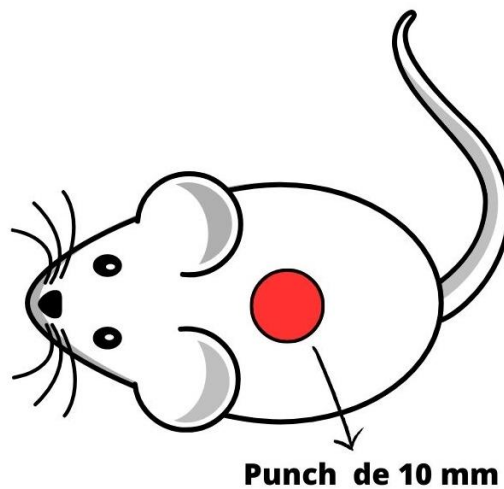
Para a execução do estudo proposto, foram utilizados 35 ratos (*Rattus norvegicus: var. Albinus, Rodentia, Mammalia*), da linhagem Wistar, machos, com três meses e massa corpórea média de 300 g (Comissão de ética para uso de animais – protocolo 1900051). Os animais foram mantidos na Sala de Guarda de Animais do Departamento Fisioterapia — São Carlos. Durante todo o procedimento experimental, permaneceram em gaiolas apropriadas de polietileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22^o-27 °C e ambiente higienizado), recebendo ração própria comum e água *ad libitum*.

4.3. MODELO EXPERIMENTAL DE FERIDAS

Os animais foram pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corporal, via intraperitoneal, com a associação de ketamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg), utilizando uma seringa de insulina. Dosagens aconselhadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), são de 100 a 150mg/kg de quetamina + 5 a 15mg/kg de xilazina, via: Intraperitoneal ou Intramuscular (Brasil). Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana com a extensão dos quatro membros, em seguida foi realizada a tricotomia digital no dorso deles. Após, foi realizada a perfuração da pele utilizando um *punch* dermatológico de 10 mm,

respeitando como limites os ângulos inferiores das escápulas (figura 2). Durante o período pós-operatório, os animais foram mantidos em analgesia de horário (Dornil® 4/4 horas; 500 mg/kg) e em ambiente aquecido a fim de evitar hipotermia.

Figura 2- Esquema representativo do modelo experimental de ferida através de punch dermatológico de 10 mm



Fonte: Autoria Própria

4.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 35 animais, os quais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em grupos:

Tabela 2: Divisão dos Grupos Experimentais

GRUPOS EXPERIMENTAIS	
Grupo Controle	Indução de ferida sem nenhum tratamento.
Óleo Ozonizado 30 minutos	Indução de ferida e tratamento com óleo de girassol ozonizado por 30 minutos.
Óleo Ozonizado 60 minutos	Indução de ferida e tratamento com óleo de girassol ozonizado por 60 minutos.
Óleo Ozonizado 90 minutos	Indução de ferida e tratamento com óleo de girassol ozonizado por 90 minutos.

Óleo Ozonizado 120 minutos	Indução de ferida e tratamento com óleo de girassol ozonizado por 120 minutos.
-----------------------------------	--

Fonte: Autoria Própria

4.5. PROTOCOLO DE TRATAMENTO

As aplicações cutâneas foram realizadas com 80 uL de óleo, tanto ozonizado como não ozonizado, conforme os grupos estabelecidos acima. A primeira aplicação dos óleos (grupos 1 a 5) ocorreu uma hora após o procedimento cirúrgico. As demais aplicações foram realizadas diariamente, no período da manhã, durante 10 dias, respeitando 24 horas de intervalo entre as aplicações consecutivas.

4.6. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia, no 11º dia, respeitando as 24 horas da última aplicação de óleo ozonizado de cada grupo tratado. A eutanásia foi realizada com dose letal de anestésico (três vezes do valor de anestésicos previamente estipulados para a anestesia do animal). Para constatar o óbito, foi realizada a verificação do batimento cardíaco e da frequência respiratória que estavam ausentes nos animais. Em seguida, a pele foi coletada, hemiseccionadas e armazenada para realização das análises.

4.7. ANÁLISE MACROSCÓPICA

A análise macroscópica da ferida foi realizada diariamente, onde foi observada a região da lesão quanto às seguintes ocorrências: necrose; inflamação local; odor; presença de fibrose ou líquido na cavidade.

4.8. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS

A análise morfométrica foi realizada por meio de registros fotográficos no dia 0 e no dia de eutanásia do animal (10^o dia). Foi utilizada uma câmera digital no modo básico, sem flash, sem zoom e resolução de 8,0 megapixels. Para a padronização da distância da câmera à ferida foi utilizado um suporte de alumínio distando 20 cm e perpendicular à ferida. Uma régua disposta ao lado dos animais e junto à ferida foi utilizada para a padronização da unidade de área das lesões em mm². As imagens foram analisadas pelo software *ImageJ* 1,45 (*Research Services Branch, National Institutes of Health – NIH* (Bethesda, Maryland, EUA). A área residual da lesão foi calculada com base nas imagens, obtendo-se os seguintes parâmetros:

a) tamanho da lesão (mm²)

b) área residual (A_r) da lesão (%): $A_r = \frac{A_{dia}}{A_{inicial}} \times 100$ sendo que A_{dia}

representa a área medida diariamente e $A_{inicial}$ é a área inicial mensurada imediatamente após a punção.

4.9. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após a coleta, as peças permaneceram em soluções de formaldeído a 10% para a fixação durante 24 horas. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por 24 horas. Na sequência passaram por desidratação em solução crescente de álcool etílico a 70%, 90% e 100% (1 hora). Após os banhos de desidratação, foi iniciada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) por 1 hora e, a seguir, em 2 banhos de xilol puro, também por 1 hora cada banho. Logo depois, as peças foram incluídas em parafina e cortadas por meio de um micrótomo rotativo, Spencer – 820. Foram confeccionadas lâminas histológicas com cortes de 5µm de espessura. Essas lâminas foram coradas com corante Hematoxilina e Eosina (HE, Merck) para avaliação do processo de reparação tecidual. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Zeiss Axiosop, Carl Zeiss) com objetiva de 20X. As avaliações foram realizadas por dois pesquisadores e a identificação de cada lâmina foi coberta com uma fita

adesiva com o intuito de não haver um conhecimento prévio do avaliador sobre qual grupo está sendo avaliado, evitando assim, qualquer possibilidade de indução nos resultados obtidos. Ao término da análise, a fita foi retirada e o resultado anotado no respectivo grupo. A avaliação histopatológica da lesão foi realizada por uma análise semiquantitativa, sendo considerados os parâmetros inflamação, crosta, deposição de matriz extracelular, e epitelização.

4.10. ANÁLISE DE COLÁGENO

Os cortes histológicos corados pelo método do *Picrosirius-Red* foram analisados em um microscópio de luz polarizada (Leica, com objetiva de 20x) para avaliar as fibras colágenas do tipo I e III, sem diferenciá-las. A metodologia de análise foi realizada de acordo com Castro et al. (2019). Para isso, as imagens foram carregadas no software e então convertidas em preto e branco, assim o preto representa o colágeno, na cor vermelho, e o branco o fundo preto anterior (Figura 10). Em seguida, o número de pixels pretos em cada imagem foi usado para calcular a porcentagem da área da imagem que correspondia ao colágeno. O número de pixels foi determinado e expresso em porcentagem total de colágeno.

4.11. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para análise por Espectroscopia Raman, foi utilizado equipamento *LabRAM HR Evolution* (Horiba Jobin Yvon) equipado com um detector CCD modelo DU420A-OE-325, e registrado em um computador acoplado ao sistema. As amostras foram excitando a temperatura ambiente com um laser Nd:YAG de 532 nm para aquisição dos dados. Os dados foram recolhidos num intervalo espectral 400 - 1800 cm^{-1} . Os espectros foram coletados em duas regiões de lâminas histológicas: 1 – na região do tecido cutâneo sadio e 2 – na região com lesão. Assim, foram selecionados 62 espectros no total das duas regiões avaliadas.

O pré-processamento dos sinais foi realizado pelo Programa de Software *OriginLab®*, processados individualmente e realizando a subtração da linha de base e suavização dos pontos para redução dos ruídos. Os pontos utilizados na suavização

dos 62 sinais analisados foram 5, 8, 12, 14 e 16, os pontos de suavização foram escolhidos através da análise visual dos espectros, para identificar quantos pontos eram necessários para eliminar os ruídos, a fim de inibir ao máximo os ruídos presentes que poderiam interferir nas análises. Após o processamento de todos os espectros, uma segunda análise foi realizada para que os espectros que permaneceram com excesso de ruídos fossem eliminados.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cluster é uma técnica de análise estatística que fornece um conjunto de dados de agrupamento automático por sua similaridade ou dissimilaridade. Podem ser realizadas duas técnicas para a realização da Clusterização dos dados, a técnica do cotovelo (*elbow*) ou o dendrograma (Onumanyi *et al.*, 2022).

Para determinar um número adequado de cluster pode-se utilizar alguns métodos, como silhueta ou cotovelo, sendo que para as análises do presente trabalho foi utilizada a técnica de cotovelo e dendrograma. O *elbow* ou cotovelo é simples e direta, sendo utilizada para determinar qual seria o melhor número de clusters antes dos algoritmos de agrupamento (algoritmo *K-means*). O Dendrograma é um processo hierárquico de agrupamento via gráfico. Resulta na criação de uma “árvore” de clusters visando identificar a similaridade das amostras (Onumanyi *et al.*, 2022).

Para a realização da análise estatística da análise de índice de reparo de feridas e colágeno, utilizou o programa estatístico *GraphPad Prism®* (versão 5.0, *Instat Software Inc., La Jolla, CA, EUA*). Os dados foram avaliados e analisados por meio da análise de variância *one-way* (ANOVA), seguido de teste de *Tukey*, com significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ACHADOS MACROSCÓPICOS

Foi possível observar, em todos os grupos experimentais, que as lesões não apresentaram odor, necrose, fibrose ou líquido na cavidade da lesão (figura 3).

Figura 3- Achados macroscópicos das feridas



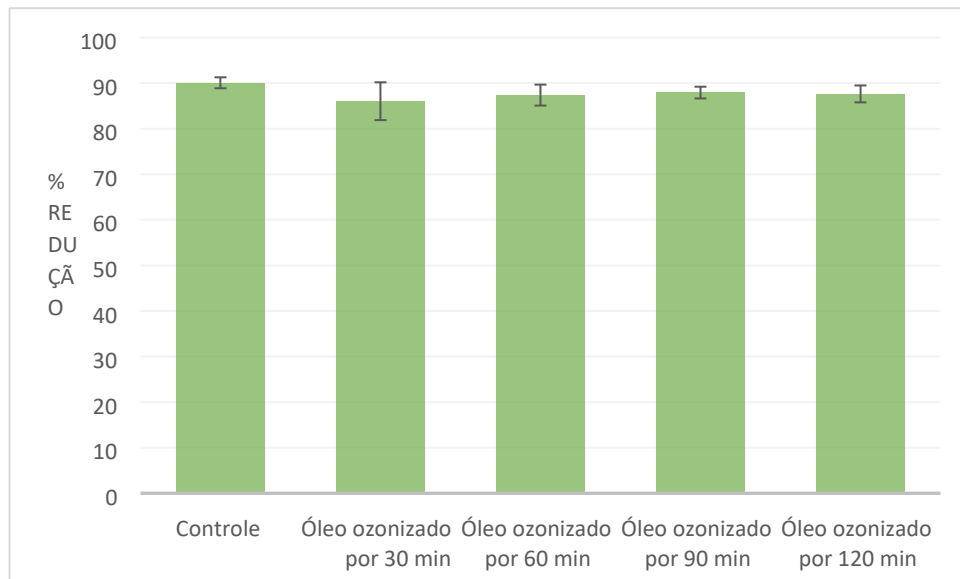
Legenda: controle = sem intervenção terapêutica; Óleo ozonizado 30 minutos = óleo de girassol ozonizado por 30 minutos; Óleo ozonizado 60 minutos = óleo de girassol ozonizado por 60 minutos; Óleo ozonizado 90 minutos = óleo de girassol ozonizado por 90 minutos; Óleo ozonizado 120 minutos = óleo de girassol ozonizado por 120 minutos.

Fonte: autoria própria

5.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO ÍNDICE DE REPARO DE FERIDAS

A figura 4 mostra o percentual de redução do reparo da ferida após 10 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais.

Figura 4- Percentual de redução do reparo de ferida



Legenda: controle = sem intervenção terapêutica; Óleo ozonizado 30 minutos = óleo de girassol ozonizado por 30 minutos; Óleo ozonizado 60 minutos = óleo de girassol ozonizado por 60 minutos; Óleo ozonizado 90 minutos = óleo de girassol ozonizado por 90 minutos; Óleo ozonizado 120 minutos = óleo de girassol ozonizado por 120 minutos.

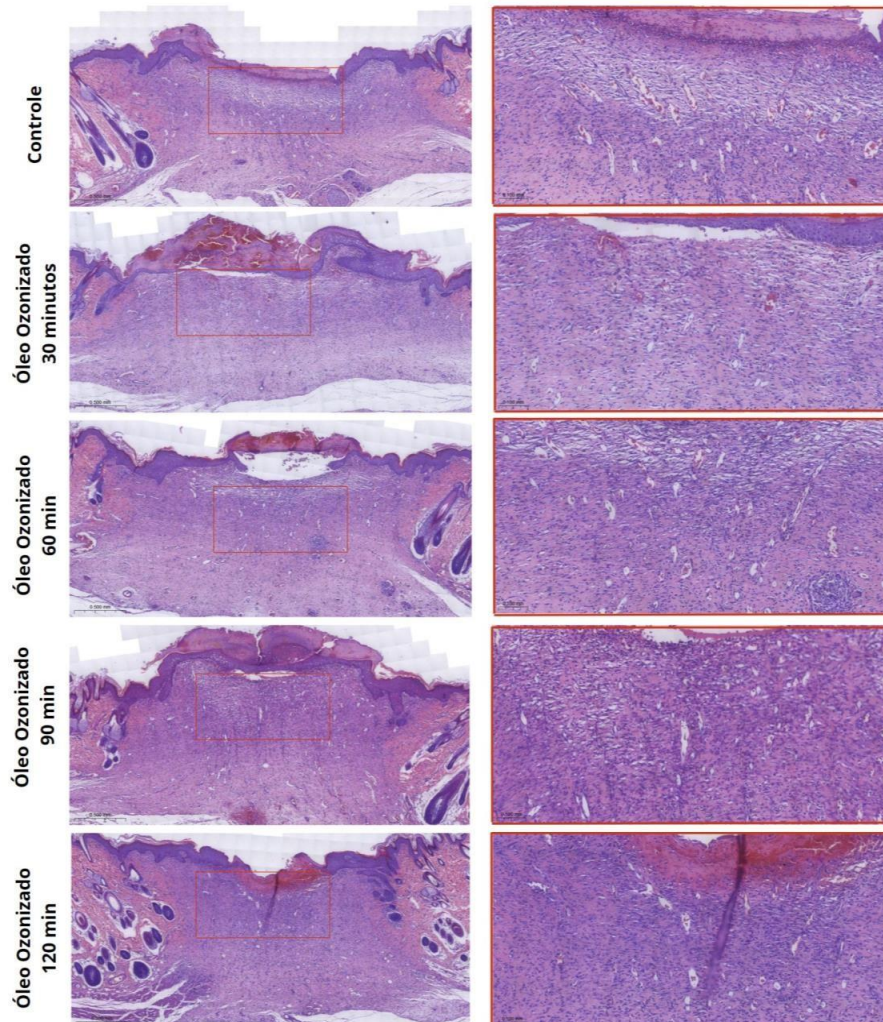
Fonte: autoria própria

5.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

As Imagens histológicas representativas das feridas são apresentadas nas figuras 4. A análise histopatológica revelou que em todos os grupos experimentais, 10 dias pós-operatório, apresentaram material fibrinohemorrágico e neutrofílico recobrendo a superfície central das feridas. Notaram-se poucas diferenças entre os grupos e a documentação fotográfica, para efeitos comparativos, foi realizada no centro das lesões. O leito das feridas se mostrou ocupado por tecido de granulação, constituído por uma matriz extracelular (MEC) com diferentes graus de edema: sendo os grupos controle, óleo ozonizado 30 e 60 minutos com edema moderado e discreto

infiltrado inflamatório. Os grupos óleo ozonizado 90 e 120 minutos apresentaram MEC com menor edema e maior infiltrado inflamatório.

Figura 5- Fotomicrografias representativas da análise histológica



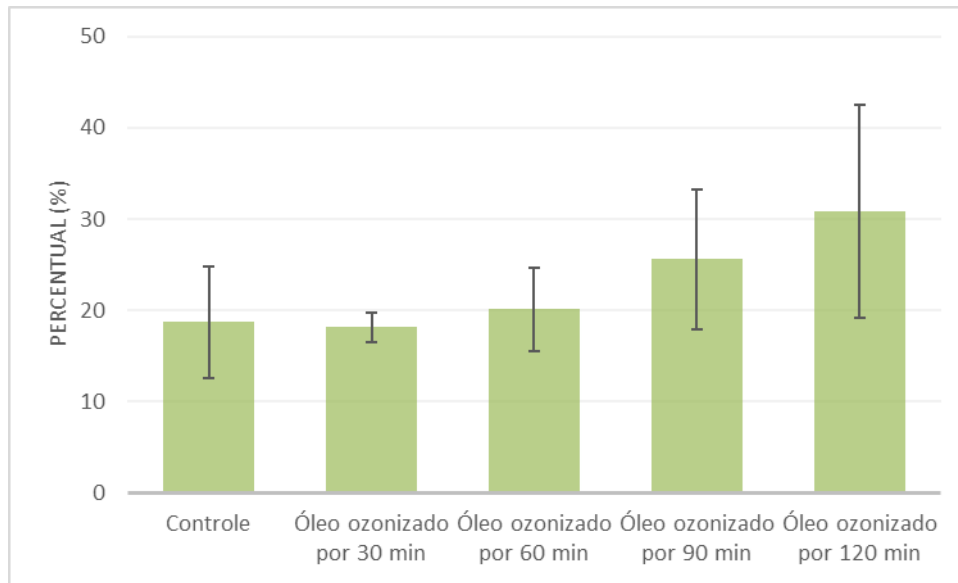
Legenda: controle = sem intervenção terapêutica; Óleo ozonizado 30 minutos = óleo de girassol ozonizado por 30 minutos; Óleo ozonizado 60 minutos = óleo de girassol ozonizado por 60 minutos; Óleo ozonizado 90 minutos = óleo de girassol ozonizado por 90 minutos; Óleo ozonizado 120 minutos = óleo de girassol ozonizado por 120 minutos.

Fonte: autoria própria

5.4. ANÁLISE DE COLÁGENO

Na Figura 6 observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais para a análise de colágeno.

Figura 6- Representação da quantidade de colágeno



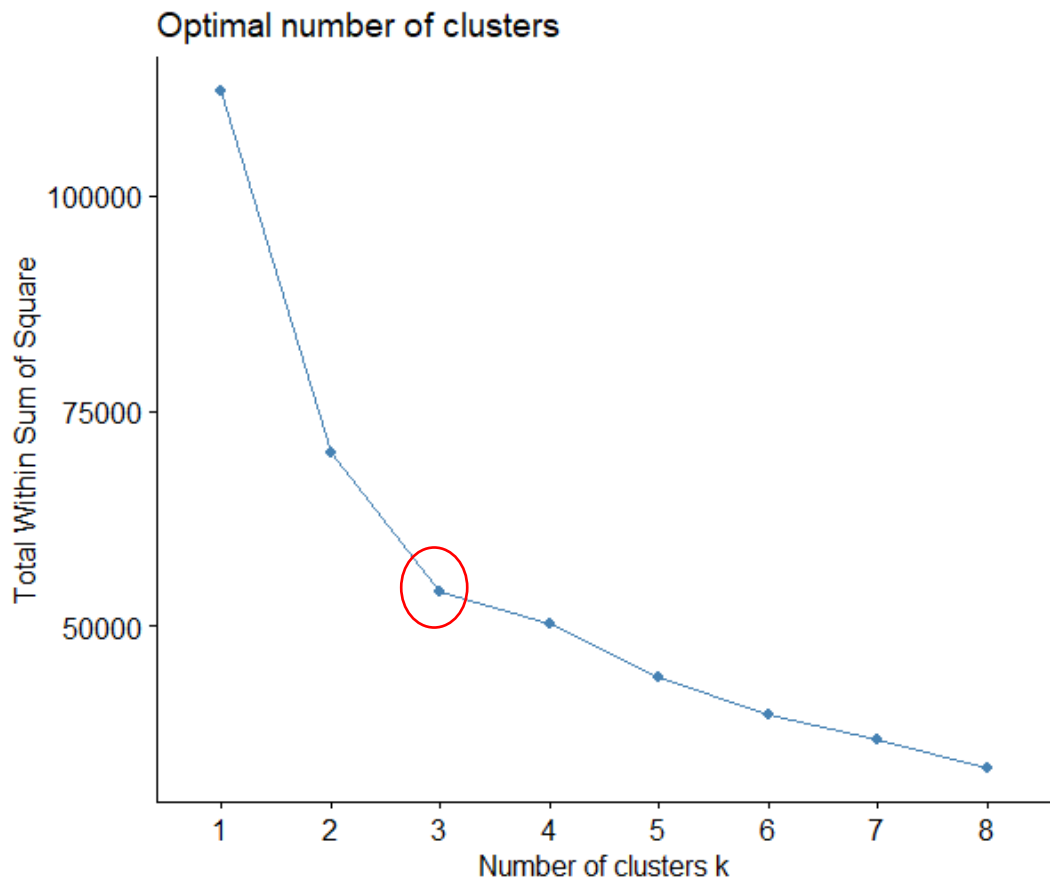
Legenda: controle = sem intervenção terapêutica; Óleo ozonizado 30 minutos = óleo de girassol ozonizado por 30 minutos; Óleo ozonizado 60 minutos = óleo de girassol ozonizado por 60 minutos; Óleo ozonizado 90 minutos = óleo de girassol ozonizado por 90 minutos; Óleo ozonizado 120 minutos = óleo de girassol ozonizado por 120 minutos.

Fonte: autoria própria

5.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA RAMAN

A técnica *Elbow* está exemplificado na Figura 7 sendo utilizada para identificar o número de Clusters ideal para representar os dados da análise por Espectroscopia Raman. Assim, os resultados mostram o cotovelo (círculo vermelho) no número 3, desta forma é indicativo que este é número ideal de clusters para representar os dados da análise por Espectroscopia Raman.

Figura 7- Técnica Elbow – para determinar número de Clusters

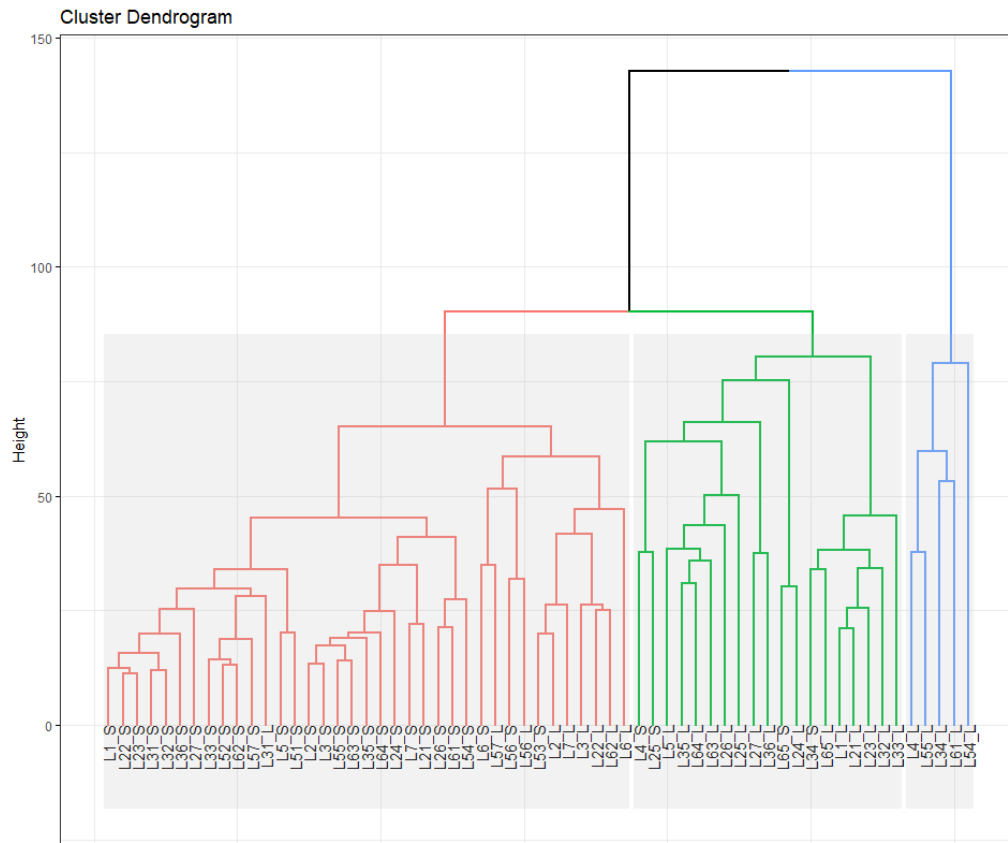


Legenda: "curva cotovelo" determinando o número 3 na análise Elbow como número ideal de Clusters.

Fonte: autoria própria

No Dendrograma apresentado na Figura 8 mostra que o agrupamento das amostras, geraram 3 grupos por similaridades dos dados, sendo eles: Grupo vermelho: formado, na sua maioria, de espectro coletados na região sadia; Grupo Verde: agrupou maior número de espectros na região com lesão e Grupo azul: constituído por amostras somente do grupo lesão, porém separadas por conter excesso de ruído. Assim, com o agrupamento das amostras por similaridade foi possível diferenciar os tecidos lesionados e os sadios, porém não foi possível formar grupos similares que poderiam diferenciar entre os grupos controle e tratados, assim como não conseguiu diferenciar os tempos de ozonólise investigados.

Figura 8- Dendrograma apresentando a análise de Cluster



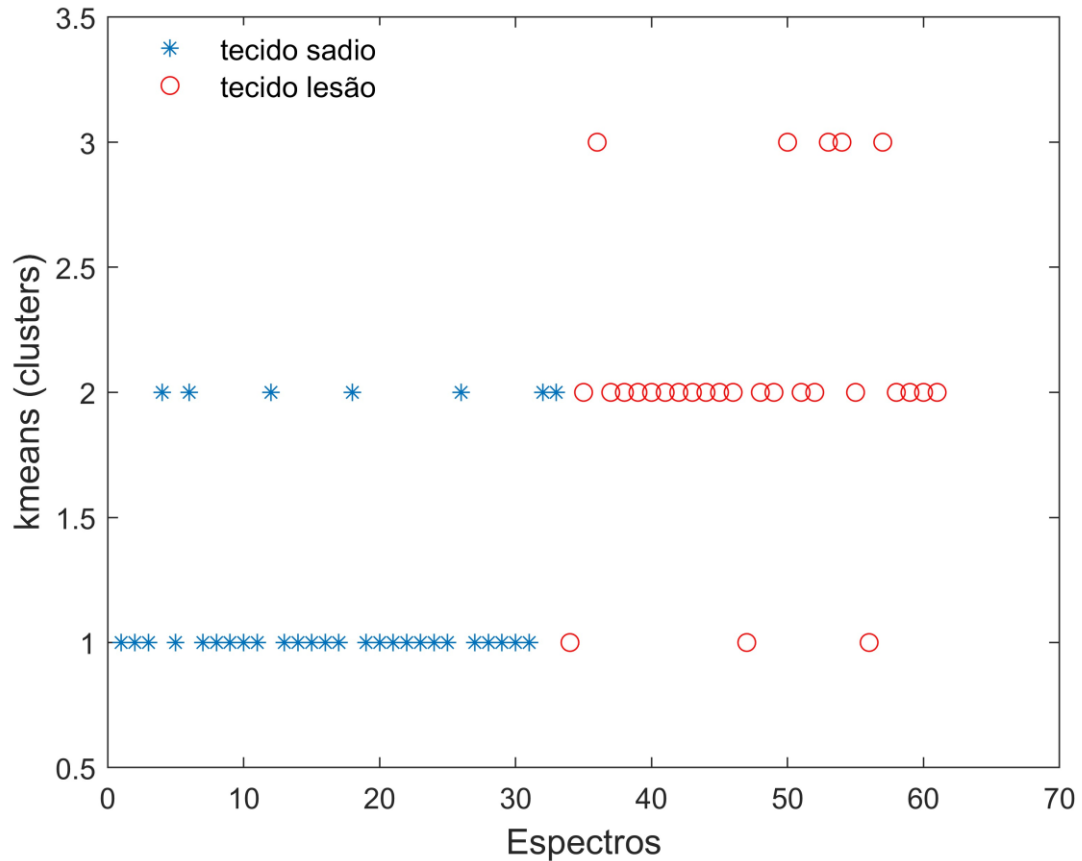
Legenda: Grupo vermelho: Região sadia (em sua grande maioria); Grupo Verde: Região com lesão (em sua grande maioria) e Grupo azul: Amostras com excesso de ruído.

Fonte: autoria própria

Os achados da técnica *K-means*, apresentado na Figura 9, reforçam os achados descritos acima, pois esta técnica também detectou que os dados deveriam ser separados em 3 grupos. Além disso, assim como no Dendrograma, nesta análise foi possível agrupar as amostras por similaridade apenas diferenciando a região avaliada, sadia ou lesão, não conseguindo identificar diferenças entre os grupos: controle e tratados, assim como não há diferenciação dos grupos em diferentes tempos de ozonização.

As amostras nesta figura 9 são divididas em estrelas azuis representando o tecido sadio e círculos vermelhos representando o tecido lesionado. Desta forma, temos a formação de 3 Grupos: 1 - apresenta abundância de estrela azul (Região tecidual sadia) com a presença de 3 amostras do grupo lesionado; 2 - tem em sua maior porcentagem os círculos vermelhos (Região com lesão) com a presença de 7 amostras do grupo sadio; 3 - apresenta 5 amostras de tecido lesionado, que pode ser justificado pelo excesso de ruídos do espectro.

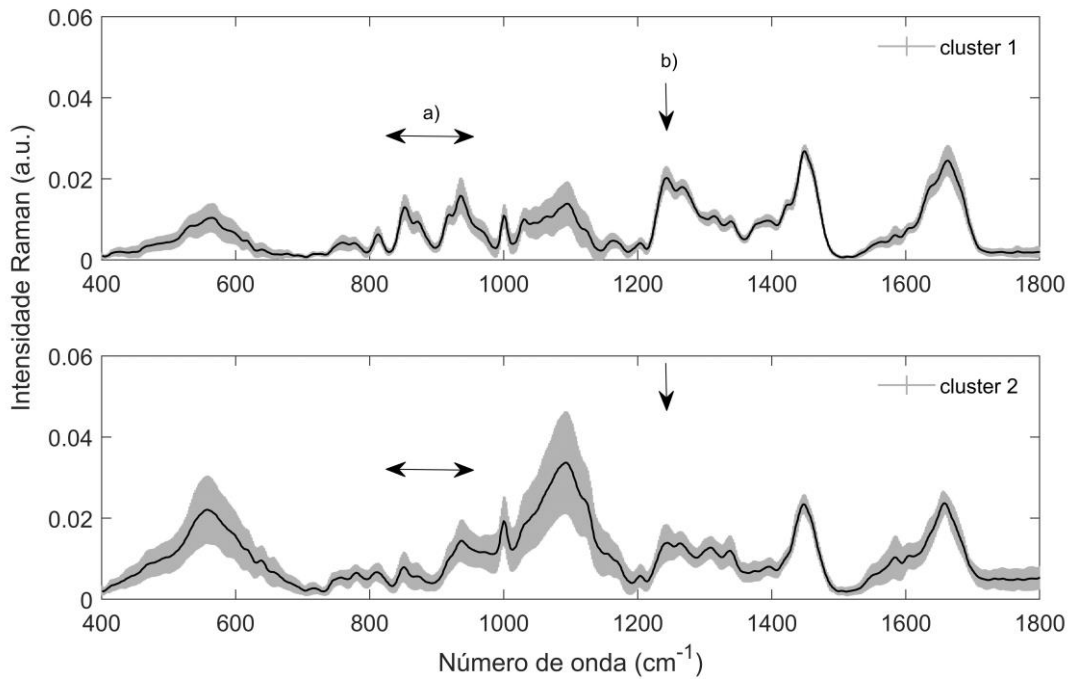
Figura 9- Técnica K-Means



Fonte: autoria própria

Os espectros obtidos segundo o resultado mostrado na Figura 8 acima, relacionada à classificação estabelecida pelo algoritmo *k-means* são apresentados na Figura 9. A média e desvio padrão dos espectros referentes ao *Cluster 1* (vermelho) são representados por amostras, agrupadas por similaridade, sendo como a região sadia. Já o *Cluster 2* (verde) mostra média e desvio padrão dos espectros relativos às amostras da região lesionada. Foi identificadas diferenças na formação das bandas referentes a colágeno: 855 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$ prolina/hidroxiprolina), 875 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$ hidroxiprolina), 940 cm^{-1} ($\nu(\text{C-C})$ prolina/hidroxiprolina), 965 cm^{-1} (hidroxiprolina), 1246 cm^{-1} banda atribuída a amida III, de acordo com Movasaghi *et al.* (2007).

Figura 10- Média e desvio padrão, dos Clusters 1 e 2 dos espectros produzidos através da análise por Espectroscopia Raman de Pele.



Legenda: a) área entre as bandas 855 cm^{-1} (v(C-C) prolina/hidroxirolina), 875 cm^{-1} (v(C-C) hidroxirolina), 940 cm^{-1} (v(C-C) prolina/hidroxirolina) e 965 cm^{-1} (hidroxirolina), b) 1246 cm^{-1} banda atribuída a amida III

Fonte: autor

Tabela 3: Comprimentos de Ondas analisados com suas respectivas bandas referentes a Colágeno.

COMPRIMENTO DE ONDAS	BANDAS
855 cm^{-1}	(v(C-C) Prolina/Hidroxirolina)
875 cm^{-1}	(v(C-C) Hidroxirolina)
940 cm^{-1}	(v(C-C) Prolina/Hidroxirolina)
965 cm^{-1}	Hidroxirolina
1246 cm^{-1}	Amida III

Fonte: autor

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar se o tempo de ozonólise do processo de ozonização de óleo de girassol influencia no estímulo do reparo tecidual de feridas dérmicas induzidas. Os resultados das análises macroscópicas e histológicas mostraram que nenhum dos tempos utilizados no processo de ozonização do óleo de girassol conseguiu estimular o processo de reparo cutâneo. Da mesma forma, (Loureiro et al., 2023), evidenciaram que o uso de óleo de girassol ozonizado utilizado no tratamento de pacientes com ferida no palato não otimizou o processo de reparo tecidual. Por outro lado, a literatura demonstra diversos trabalhos que relatam os efeitos do óleo ozonizado no estímulo do reparo tecidual (Anzolin et al., 2020; Kesik et al., 2016; KRKL C et al., 2016; Sanguanini et al., 2020). O trabalho de Prazeres et al., (2023) que relata a eficácia do óleo de girassol ozonizado no reparo cutâneo em um Hamster Dourado, com reparo completo em 23 dias de tratamento. Entretanto, ainda não são bem compreendidos os mecanismos de ação dos ozonídeos e peróxidos formados após o processo de ozonólise. Evidências indicam que o óleo ozonizado pode desencadear uma cascata de reações, tais como síntese de citocinas e fatores de crescimento, proliferação celular, estimula a vascularização e também pode otimizar a resposta do sistema imunológico e a regulação de enzimas antioxidantes. Estes eventos poderiam culminar no estímulo do processo de reparo (Anzolin et al., 2020; Girondi et al., 2021; Orlandin et al., 2021).

Sabemos que um dos principais constituintes da matriz extracelular é o colágeno (Halper et al., 2014). E na tentativa de buscar informações a respeito de possíveis alterações bioquímicas que o óleo ozonizado poderia ter induzido no tecido cutâneo, os autores realizaram a análise por Espectroscopia Raman. Nesta avaliação, como é esperado, foi possível observar a diferença na intensidade das bandas apenas para distinguir o tecido normal e a área de lesão. No agrupamento destacado em vermelho no Dendrograma, houve um número maior de espectros da região sadia, com presença de 9 espectros da região lesão, justificando-se por uma região analisada mais próxima da região sadia ou com melhor reparo cutâneo, fazendo com que o algoritmo coloque estes espectros no grupo vermelho. No agrupamento destacado em verde, observa-se que a maioria das lâminas são da região lesão, tendo somente 4 espectros da região sadia. Enquanto o agrupamento destacado em azul, apresenta somente espectros da região lesão, porém são espectros com excesso de

ruídos. Assim, a Espectroscopia Raman conseguiu diferenciar e agrupar as amostras de pele lesionada e pele sadia, com maior precisão, ainda um agrupamento de espectros que apresentavam ruídos.

Esta dissimilaridade entre as regiões sadias e com lesões apresentadas no dendrograma, pode ser justificada pela intensidade das bandas prolina/hidroxiprolina e de amida III para a pele lesionada foi maior do que as bandas da pele normal, refletindo a formação excessiva de colágeno. Tais achados são corroborados pela literatura, que demonstram, o aumento da formação e deposição de colágeno durante o processo de reparo cutâneo (Sorg et al., 2017; Wang et al., 2018). Contudo, assim como nas análises histológicas, a avaliação por Espectroscopia Raman demonstrou que todos os tempos utilizados para ozonólise do óleo de girassol neste estudo, não foram suficientes para promover estímulo na produção de colágeno. Vários estudos evidenciaram que a utilização da análise por Espectroscopia Raman consegue distinguir o estágio do processo de reparo, pois esta análise pode identificar proteínas presentes no tecido neoformado (Flach et al., 2010; Jain et al., 2014; Su et al., 2019).

Sabemos que no processo de ozonólise, o O_3 reage com as duplas ligações carbono-carbono dos ácidos graxos insaturados presente no óleo de girassol que culmina na formação de compostos oxigenados: ozonídeos, aldeídos e uma variedade de peróxidos (Criegee, 1975). Entretanto, a formação destes compósitos pode estar diretamente relacionada a parâmetros utilizados para o processo de ozonólise, tais como temperatura de reação, tipo de reator, vazão e concentração de O_3 , tempo de reação, entre outros (Anzolin et al., 2020; Díaz et al., 2006; Moureu et al., 2015). Em alguns lugares, processo de ozonólise do azeite leva dois dias, enquanto no Hospital Universitário de Siena utiliza o tempo de reação de 30 minutos e ambos os azeites são amplamente utilizados por seus efeitos terapêuticos. Diferentemente, o presente estudo não observou efeito terapêutico, em todos os tempos utilizados para o processo de ozonólise do óleo de girassol.

Ainda, vale destacar que durante o processo de ozonólise, um fator importante a considerar. Existem diferenças nos níveis de ácido graxos dos óleos vegetais, como oliva, girassol, canola ou coco e que essa quantidade de insaturação disponível nos óleos vegetais podem afetar a formação de compostos oxigenados. Assim, além do tempo de processo de ozonólise, a quantidade de insaturação presente no óleo vegetal pode afetar a composição e efeitos terapêuticos de óleos ozonizados (Díaz et al., 2006; Valacchi et al., 2011).

A ausência de informações e padronização nos protocolos de ozonólise podem justificar os casos em que não foram evidenciados os efeitos terapêuticos do óleo ozonizado. Uma vez que, o processo de ozonólise pode não ter promovido a formação de compostos oxigenados suficientes, pois estes estão relacionados com a ampla atividade biológica dos óleos vegetais ozonizados (Loureiro et al., 2023; Orlandin et al., 2021).

Diante do exposto, desenvolver protocolos de ozonólise com informações de tipo de óleo vegetal, tempo de reação, métodos utilizados, borbulhamento e dosagem de ozônio parecem ser essenciais para conseguir a produção de óleo vegetal ozonizado com efeitos terapêuticos positivos (Anzolin et al., 2020). Uma vez que, o intuito de realizar a ozonólise de óleo vegetal é para conseguir formulações que mantenha a melhor estabilidade do ozônio, melhorar o armazenamento e evitar sua degradação, assim como facilitar seu manuseio, como seu uso extra-hospital ou domiciliar. Entretanto, a eficácia e a segurança do óleo ozonizado estão intimamente ligadas ao seu controle de qualidade no processo de ozonólise (Martínez-Sanchez, 2021).

Diante destes resultados e os achados na literatura, novos estudos devem investigar os métodos e processo de ozonólise tais como qualidade e quantidade de ácidos graxos do óleo vegetal utilizado; tempo de reação, concentração de O₃, níveis de formação de compostos oxigenados (níveis de peróxidos de oxigênio) para obter um óleo ozonizado de qualidade e com capacidade de estimular o processo de reparo cutâneo. Pois, uma das grandes dificuldades encontradas neste trabalho, foi encontrar estudos padronizados com todas as informações pertinentes, supracitadas. Reforçando a importância de novas pesquisas com grupos controlados, randomizados para que os protocolos de tratamento sejam utilizados da melhor forma nas rotinas clínicas.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, exploramos o impacto do tempo de ozonólise no óleo de girassol para avaliar sua eficácia no estímulo ao reparo tecidual de feridas dérmicas induzidas. Utilizando uma combinação de técnicas analíticas - macroscópicas, histológicas e espectroscopia Raman - buscamos identificar alterações bioquímicas e estruturais no tecido em reparação.

Os resultados macroscópicos e histológicos não evidenciaram uma melhora significativa no processo de reparo tecidual para os tempos de ozonólise testados. A análise Raman, conhecida por sua capacidade de identificar proteínas no tecido neoformado, corroborou essas descobertas, mostrando que não houve um estímulo significativo na produção de colágeno, uma proteína crucial para o reparo tecidual.

A literatura sugere que os produtos da ozonólise, como ozonídeos, aldeídos e peróxidos, podem desempenhar um papel benéfico no estímulo ao reparo tecidual. No entanto, nossos achados indicam que os parâmetros de ozonólise utilizados neste estudo podem não ter sido ideais para obter esses benefícios. Sugere-se que estudos futuros investiguem diferentes parâmetros e concentrações de ozônio, bem como os mecanismos exatos pelos quais os produtos de ozonólise podem afetar o reparo tecidual.

Finalmente, é essencial que a comunidade científica continue a explorar e entender os mecanismos subjacentes e os parâmetros ideais para otimizar o uso de óleo ozonizado como um agente terapêutico potencial no tratamento de feridas dérmicas.

8. REFERÊNCIAS

- ALHAJJ, Mandy; GOYAL, Amandeep. Physiology, granulation tissue. 2020.
- ANZOLIN, Ana Paula; DA SILVEIRA-KAROSS, Níncia Lucca; BERTOL, Charise Dallazem. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? **Medical gas research**, v. 10, n. 1, p. 54, 2020.
- BALSA, Ingrid M.; CULP, William TN. Wound care. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, v. 45, n. 5, p. 1049-1065, 2015.
- BATISTA, J. S. et al. Evaluation Of The Healing Activity Of Pequi (Caryocar Coriaceumwittm) Oil In Cutaneous Wounds Induced Experimentally In Rats. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 441-447, 2020.
- BEZERRA, N. K. M. S.; BARROS, T. L.; COELHO, N. P. M. F. The effect of the pequi oil (Caryocar brasiliense) in the healing of skin lesions in mice. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 875-880, 2015.
- BERDYSHEV E, Bronova I, Leung DYM, Goleva E. Methodological Considerations for Lipid and Polar Component Analyses in Human Skin Stratum Corneum. *Cell Biochem Biophys*. 2021 Sep;79(3):659-668. doi: 10.1007/s12013-021-01016-6. Epub 2021 Jul 15. PMID: 34264438; PMCID: PMC8551066.
- BOCCI, V. Ozone: a new medical drug. 1a ed., ed. Springer, 2005.
- BOCCI, Velio. The potential toxicity of ozone: side effects and contraindications of ozonotherapy. **OZONE: A new medical drug**, p. 75-84, 2011.
- BOHLING, M. W.; HANDERSON, R. A. Differences in cutaneous wound healing between dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. [S.1.] v.36, n. 4, p.687-692, 2006.
- BRASIL. Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-INCA). Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/protocolo_anestesia.pdf. Acesso em: 20/09/2023.
- CHAGAS, Larissa Harmatiuk; MIRA, Anabella. Efeito do óleo ozonizado em lesões cutâneas em ratos. **Revista Cultivando o Saber**, p. 160-172, 2015.
- CHATTERJEE, Shampa. Oxidative stress, inflammation, and disease. In: **Oxidative stress and biomaterials**. Academic Press, 2016. p. 35-58.
- CORRÊA, F. I. et al. O uso do laser HeNe (632,8nm) no fechamento de feridas. *Fisioterapia Brasil*, v. 4, n. 2, p.144-148, 2003.
- CRIEGEE, Rudolf. Mechanism of ozonolysis. **Angewandte chemie international edition in english**, v. 14, n. 11, p. 745-752, 1975.

DE ALENCAR, Jéssica Silva; DE CONTO, Natália Rayz Cerqueira; REIS, Alessandra dos Santos Belo. Tratamentos alternativos para feridas cutâneas em equinos. *Multidisciplinary Reviews*, v. 3, p. e2020013-e2020013, 2020.

DE OLIVEIRA, Heloiza Helena et al. Uso de óleo ozonizado no tratamento tópico de infestação por carrapato em cão-Relato de caso. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, n. 4, p. 405-408, 2014.

DE SOUZA, Rafaela Cabral et al. Efeitos do óleo de girassol ozonizado no tratamento de ferida cirúrgica em gatas submetidas a ovariectomia eletiva. *Veterinária e Zootecnia*, v. 29, p. 1-10, 2022.

DÍAZ, Maritza F. et al. Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 403-407, 2006.

FERNÁNDEZ-GALLEGO N, Sánchez-Madrid F, Cibrian D. Role of AHR Ligands in Skin Homeostasis and Cutaneous Inflammation. *Cells*. 2021 Nov 15;10(11):3176. doi: 10.3390/cells10113176. PMID: 34831399; PMCID: PMC8622815.

FLACH, Carol R.; ZHANG, Guojin; MENDELSON, Richard. Raman microscopy and imaging: applications to skin pharmacology and wound healing. **Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields**, p. 365-384, 2010.

GALIÈ, Mirco et al. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 124, p. 114-121, 2018.

GIRONDI, Juliana Balbinot Reis et al. Ozonioterapia no tratamento de feridas em adultos: revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 68912-68925, 2021.

GOLEVA, Elena et al. Epithelial barrier repair and prevention of allergy. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 4, p. 1463-1474, 2019.

GRACER, R. I.; BOCCI, V. Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process?. **Medical hypotheses**, v. 65, n. 4, p. 752-759, 2005.

IACOPETTI, Ilaria et al. Autologous platelet-rich plasma enhances the healing of large cutaneous wounds in dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 575449, 2020.

HALPER, Jaroslava (2014). [Advances in Experimental Medicine and Biology] Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases Volume 802 || Structure, Physiology, and Biochemistry of Collagens. 10.1007/978-94-007-7893-1(Chapter 2), 5–29.

HAMILTON, L.; KOŽÁR, M. Efficiency of enzymatic debridement in the healing process of chronic wounds in small animal practice. *Folia Veterinaria*, v. 61, n. 1, p. 38-42, 2017.

JAIN, Rishabh et al. Raman spectroscopy enables noninvasive biochemical characterization and identification of the stage of healing of a wound. **Analytical chemistry**, v. 86, n. 8, p. 3764-3772, 2014.

KESIK, Vural et al. Ozone Ameliorates Doxorubicine-Induced Skin Necrosis results from an animal model. *The international journal of lower extremity wounds*, v. 15, n. 3, p. 248-254, 2016.

KRAMER, Rebeca Funayama; JAINES, Vanessa Ingrid. Tratamento De Ferida Aberta Com Ozonioterapia E Óleo Ozonizado Previamente A Reparação Plastia Cutânea–Relato De Caso. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 10, p. 4230-4245, 2022.

KRKL C, Yiğit MV, Özeran İH, Aygen E, Gültürk B, Artaş G. The Effect of Ozonated Olive Oil on Neovascularization in an Experimental Skin Flap Model. *Adv Skin Wound Care*. 2016 Jul;29(7):322-7. doi: 10.1097/01.ASW.0000484172.04260.46. PMID: 27300363.

KOZAT, Süleyman; OKMAN, Eda Nur. Has ozone therapy a future in veterinary medicine. **Journal of Animal Husbandry and Dairy Science**, v. 3, n. 3, p. 25-34, 2019.

LOUREIRO, Bruno B. et al. Application of highly ozonated sunflower oil does not improve palatal wound healing: A randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, 2023.

LÓPEZ EG, Martínéz AR, Ruiz AOB, García LOR. La ozonoterapia en el tratamiento de la estomatitis subprótesis. *Revista Cubana de Estomatología [online]* 2003;40(2).

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

MITTAG, Barbara Franco et al. Cuidados com lesão de pele: ações da enfermagem. **ESTIMA Rev Assoc Bras Estomater**, v. 15, n. 1, p. 19-25, 2017.

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

NAKAO, Atsunori et al. Therapeutic antioxidant medical gas. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 44, n. 1, p. 1-13, 2009.

ONUMANYI, Adeiza James et al. AutoElbow: An automatic elbow detection method for estimating the number of clusters in a dataset. **Applied Sciences**, v. 12, n. 15, p. 7515, 2022.

ORLANDIN, Jéssica Rodrigues et al. Ozone and its derivatives in veterinary medicine: A careful appraisal. **Veterinary and Animal Science**, v. 13, p. 100191, 2021.

PITT, Kathryn A.; STANLEY, Bryden J. Negative pressure wound therapy: experience in 45 dogs. *Veterinary Surgery*, v. 43, n. 4, p. 380-387, 2014.

PETEOACĂ, Alexandra et al. The use of ozone therapy in veterinary medicine: a systematic review. **Agro-Life Sci J**, v. 9, n. 2, p. 226-239, 2020.

PRAZERES JÚNIOR, F. R. et al. Use of ozonized sunflower oil in the treatment of skin injury in golden hamster (*Mesocricetus auratus*)-case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 75, p. 451-454, 2023.

RANGARAJU, Lakshmi Priya et al. Classification of burn injury using Raman spectroscopy and optical coherence tomography: An ex-vivo study on porcine skin. **Burns**, v. 45, n. 3, p. 659-670, 2019.

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

SCIORSCI, R. L. et al. Ozone therapy in veterinary medicine: a review. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 240-246, 2020.

SU, Joshua Weiming et al. Depth-sensitive Raman spectroscopy for skin wound evaluation in rodents. **Biomedical optics express**, v. 10, n. 12, p. 6114-6128, 2019.

SUMIDA, Juliana Midori; HAYASHI, Ayne Murata. Ozone therapy in veterinary medicine: clinical indications and techniques. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 16, n. 4, 2022.

TELLEZ SOTO, Claudio Alberto et al. DFT: B3LYP/3-21G theoretical insights on the confocal Raman experimental observations in skin dermis of healthy young, healthy elderly, and diabetic elderly women. **Journal of biomedical optics**, v. 21, n. 12, p. 125002-125002, 2016.

UEBELE, Daniela TR et al. Ozonizing sunflower oil using Fourier-transform infrared spectroscopy for product characterization. **Vibrational Spectroscopy**, v. 123, p. 103460, 2022.

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

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

WANG, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., & Chen, Y.-J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94–101. doi:10.1016/j.jcma.2017.11.002

9. ANEXO I

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL- CEUA



RESOLUÇÃO - PARECER

COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTOCOLO N° 1900051

TÍTULO DO PROJETO

Avaliação do efeito de cicatrização cutânea pelo uso de óleo ozonizado

RESPONSÁVEL

Nome completo	Carla Tim
Instituição	Universidade Brasil
Unidade	São Paulo
Departamento	Engenharia biomédica

RESOLUÇÃO – PARECER

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, na sua reunião de 13/11/2019

, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura – coordenadora da comissão

Cássia Maria Barroso Orlandi