



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

RODRIGO DA SILVA PRIMICERI

**APLICAÇÃO DA OZONIOTERAPIA NO PROCESSO DE
REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS CUTÂNEAS:
Avaliação Histométrica**

2024

RODRIGO DA SILVA PRIMICERI

**APLICAÇÃO DA OZONIOTERAPIA NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL
DE QUEIMADURAS CUTÂNEAS: Avaliação Histométrica**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA E TECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA.

Área: Inovação tecnológica multidisciplinar com ênfase em Odontologia.

Linha de pesquisa: Inovação tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado

Co-orientadora: Prof.Dra. Milene da Silva Melo

São José dos Campos

2024

Primiceri, Rodrigo da Silva

Aplicação da ozonioterapia no processo de reparação tecidual de queimaduras cutâneas: avaliação histométrica / Rodrigo da Silva Primiceri. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.

39 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Miguel Angel Castillo Salgado

Coorientadora: Milene da Silva Melo

1. Ozônio. 2. Pele. 3. Reparação tecidual. 4. Ozonioterapia. I. Salgado, Miguel Angel Castillo, orient. II. Melo, Milene da Silva, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado (Orientador)

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Alexandre Prado Scherma

Universidade de Taubaté (UNITAU)

Departamento de Odontologia

Campus de Taubaté

Prof. Dr. Jorge Kennety Silva Formiga

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Instituto de Ciências e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de fevereiro de 2024.

RESUMO

Primiceri R. Aplicação da ozonioterapia no processo de reparação tecidual de queimaduras cutâneas: avaliação histométrica [dissertação]. São José dos Campos (SP) Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia;2024.

O ozônio é considerado um agente oxidante muito potente, e quando aplicado nos tecidos reage imediatamente com várias moléculas presentes nos fluidos biológicos promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio que envolvem várias reações bioquímicas, e que na associação ao óleo formam-se uma série de subprodutos, dentre eles, peróxidos com propriedades germicidas (BOCCI, 2006). Dentre as propriedades biológicas do ozônio, também são descritas sua ação antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica incluindo a neutralização de mediadores da dor. E seu efeito terapêutico na redução do estresse oxidativo (Menendes et al., 2002; Ferreira e cols., 2013). Ainda, em aplicações clínicas na odontologia, o ozônio foi descrito como biocida oxidativo, atuando em fungos, colônias bacterianas, vermes e vírus (Oliveira e Mendes, 2009). Este trabalho avaliou a ação do ozônio associado ao óleo de girassol no tratamento de feridas cutâneas ocasionadas por queimaduras induzidas por laser CO₂ em ratos machos da linhagem Winstar. Os resultados mostraram uma diminuição significativa do número de células mononucleares e de vasos sanguíneos no 7º dia, período inicial do tratamento e uma proliferação exacerbada de fibroblastos em todos os períodos estudados. Desta maneira pode-se concluir que a ozonioterapia administrada com óleo de girassol ozonizado não favoreceu eficientemente a reparação tecidual de feridas cutâneas por queimaduras. Assim, Novas pesquisas se tornam importantes para estabelecer novos critérios para o uso do ozônio como terapia adjuvante, embora algumas propriedades biológicas sejam descritas.

Palavras-chave: ozônio; pele; reparação tecidual; ozonioterapia

ABSTRACT

Primiceri R. Application of ozone therapy in the tissue repair process of skin burns: histometric evaluation [dissertation]. São José Dos Campos (SP) University (UNESP), Institute of Science and Technology; 2024.

Ozone is considered a very powerful oxidizing agent, and when applied to tissues it reacts immediately with several molecules present in biological fluids, promoting the formation of reactive oxygen species that involve several biochemical reactions, and when associated with oil, a series of byproducts, including peroxides with germicidal properties (BOCCI, 2006). Among the biological properties of ozone, its antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic action is also described, including the neutralization of pain mediators and its therapeutic effect in reducing oxidative stress (Menendes et al., 2002; Ferreira et al., 2013). Furthermore, in clinical applications in dentistry, ozone has been described as an oxidative biocide, acting on fungi, bacterial colonies, worms and viruses (Oliveira and Mendes, 2009). This work evaluated the action of ozone associated with sunflower oil in the treatment of wounds cutaneous injuries caused by CO₂ laser-induced burns in male Wistar rats. The results showed a significant decrease in the number of mononuclear cells and blood vessels on the 7th day, the initial period of treatment, and an exacerbated proliferation of fibroblasts in all periods studied. Therefore, it can be concluded that ozone therapy administered with ozonized sunflower oil did not efficiently promote tissue repair of cutaneous burn wounds.

Thus, new research becomes important to establish new criteria for the use of ozone as an adjuvant therapy, although some biological properties are described.

Keywords: ozone; skin; tissue repair; ozone therapy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Pele	9
2.2 Reparação tecidual.....	10
2.3 Ozonioterapia.....	12
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Animais.....	16
4.1.1 Ozonização do Óleo de Girassol.....	16
4.1.2 Procedimentos cirúrgicos e indução das queimaduras	17
4.1.3 Tratamento das lesões induzidas	18
4.1.4 Eutanásia dos animais e obtenção das peças histológicas	19
4.1.5 Procedimentos de análise histométrica	20
4.1.6 Análise estatística	21
5 RESULTADOS.....	22
6 DISCUSSÃO	26
7 CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

A pele, ou tegumento, é o maior órgão do corpo correspondendo a 15% do peso corporal de um indivíduo adulto e recobre a sua superfície externa oferecendo proteção contra inúmeras influências ambientais danosas, (Meireles, 2007). Como órgão, é formado por um tecido epitelial de células achatadas, sobrepostas e intimamente unidas que repousam num tecido conjuntivo que lhe serve de sustentação e nutrição pelos vasos sanguíneos aí presentes (Domansky et al., 2012; Junqueira, Carneiro, 2002; Hiatt, 2011)

As queimaduras são feridas traumáticas que podem suprimir tal proteção oferecida, sendo causadas por agentes térmicos, químicos, radioativos ou elétricos. Este evento destrói total ou parcialmente a pele e seus anexos, podendo atingir camadas mais profundas (músculos, tendões e ossos). A gravidade destas alterações depende da extensão corporal afetada pela queimadura e da sua profundidade, provocando reações teciduais locais e também sistêmicas (Rowan et al., 2015).

Dados atuais da Organização Mundial de Saúde (OMS) apuram que as queimaduras afetam aproximadamente 265 mil pessoas por ano e devido à sua alta incidência, morbidade e mortalidade são problemas críticos de saúde pública. No Brasil, o Ministério da Saúde afirma que as queimaduras ocupam o quarto lugar no ranking de causas de morte, e que um milhão de casos ocorrem a cada ano, dos quais quarenta mil demandam hospitalização. Destacam ainda que as infecções são a maior causa da mortalidade relacionada às queimaduras. (Brasil, 2014; Cruz, Cordovil, Batista, 2012).

Segundo a Associação Brasileira de Ozonioterapia (2020), a terapia com ozônio é uma técnica medicinal que utiliza a aplicação de uma mistura dos gases oxigênio e ozônio. O uso da ozonioterapia é indicada no tratamento de inúmeras patologias com benefícios comprovados por inúmeros estudos, como o realizado por Chen et al. (2013), os quais afirmam que o ozônio tem excelentes propriedades medicinais, como anti-inflamatórias, antissépticas, modulação do estresse oxidativo e melhora da circulação periférica e da oxigenação.

Em queimaduras, foi avaliado o uso da ozonioterapia em componentes como água (Miroshin, Kontorshikova, 1995) e óleo ozonizado (Campanati et al., 2013). Os autores relatam resultados promissores ao empregar a ozonioterapia como parte do protocolo de tratamento para esses tipos de lesões, destacando como resultados acelerar a cicatrização, reduzir o risco de infecções e melhorar a recuperação dos pacientes.

O ozônio (O₃) é uma molécula gasosa natural, composta por três átomos de oxigênio e possui propriedades únicas que proporcionam uma vasta aplicação aos sistemas biológicos e tratamentos clínicos (França et al, 2020). É uma molécula altamente reativa, porém instável. Além disso, atualmente, foi descoberto (Babior et al., 2013) que o gás é produzido na formação do complexo antígeno-anticorpo do corpo humano, o que comprova que essa molécula é fisiologicamente gerada pelo sistema imunológico.

Edward Fish, em 1950, utilizou a ozonioterapia para desinfecção e cicatrização de feridas em cirurgias dentárias. Empregada para o tratamento de doenças sistêmicas e orais, a ozonioterapia tem potencial antimicrobiano, conforme descrito por Kim et al., 1999, também sendo reconhecida como imunoestimulante, analgésico, anti-inflamatório (Naik et al., 2016) e com efeito anti-hipóxico e biossintético (Deepa et al., 2016). Além disso, estudos (Silvia et al., 2021) afirmaram que a ação antimicrobiana da ozonioterapia ocorre através do dano às membranas celulares e oxidação das proteínas intracelulares, o qual desencadeia a perda do funcionamento da organela.

O reparo tecidual é o evento biológico pelo qual o organismo busca eliminar os danos causados nos tecidos, visando restaurar sua integridade anatômica estrutural e funcional. Este processo engloba uma complexa série de eventos imunológicos, bioquímicos e celulares sendo que, se descoordenados, podem acarretar lesões crônicas ou ainda fibroses extensas e indesejáveis (Estrela et al., 2006; Polydorou et al., 2006). Esse processo de reparo pode ocorrer através da regeneração ou da cicatrização do tecido, dependendo de fatores como extensão da lesão, tipo de tecido envolvido e da capacidade de regeneração das células (Naik et al., 2016).

Esses eventos, de desenvolvimento contínuo, podem ser divididos didaticamente em etapas. A primeira é a fase inflamatória como resposta à lesão

tecidual; em seguida a fase proliferativa onde ocorrem angiogênese e fibroplasia, havendo deposição de matriz colágena, que junto de células mononucleares e capilares neoformados conferem à lesão uma aparência rosácea e granular, o que caracteriza o denominado tecido de granulação. Com a progressão desta fase proliferativa, o processo de reparação evolui para a sua fase final, a de maturação e remodelamento do tecido fibroso (Pereira et al., 2005, Estrela et al., 2006; Polydorou et al., 2006).

Xavier et al. (2021) também destacam a importância da ozonioterapia como uma ótima alternativa no tratamento de lesões, também, em pacientes diabéticos, pelas suas propriedades antimicrobianas, estimulante da formação de novos vasos na região afetada, acelerando a proliferação do tecido de granulação e diminuindo o tempo de cicatrização em lesões crônicas.

A literatura é escassa com relação a aplicação do óleo de girassol ozonizado em queimaduras de espessura total, bem como dos seus efeitos durante as fases de reparação tecidual, contagem de células e vasos. Neste sentido o presente estudo analisou o processo de reparação tecidual por meio de uma análise quantitativa histométrica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

A pele é um órgão que faz parte do sistema tegumentar e tem como papel a cobertura do corpo, proteger contra o atrito, a perda de água, a contaminação por microrganismos externos, radiação externa, dentre outros agentes agressores. Também possui função na percepção sensorial (tato, calor, pressão e dor), sintetização de vitamina D e na termorregulação (Junqueira e Carneiro, 2013; Lowe e Anderson, 2015). A estrutura da pele é constituída em epiderme e derme, cada uma com suas características peculiares (Ovalle, Nahirney, 2008; Gartner e Hiatt, 2011).

A epiderme é composta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, o qual possui quatro camadas: 1- estrato basal, ou germinativo, com capacidade proliferativa, aqui encontram-se as células sensoriais de Merkel e os melanócitos; 2- estrato espinhoso, com células fortemente associadas por desmossomos, estruturas de união celular, e onde estão presentes as células Langerhans, responsáveis por fagocitar e processar antígenos estranhos na pele; 3- estrato granuloso, composto por queratinócitos que sintetizam colesterol acondicionados em corpos lamelares, formando uma barreira impermeável à água; 4- estrato córneo, composto de células anucleares, pavimentosas e queratinizadas que protegem contra o atrito, invasão por microrganismos e perda de água.

A derme por sua vez, é composta por tecido conjuntivo. Nesta camada estão dispostos os anexos cutâneos como glândulas, terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos. Esta possui duas camadas: 1- derme papilar: tecido conjuntivo frouxo vascularizado e 2- derme reticular: tecido conjuntivo denso não modelado, resistente ao estiramento devido sua composição predominante por fibras colágenas densas dispostas entrelaçadas em vários sentidos.

2.2 Reparação tecidual

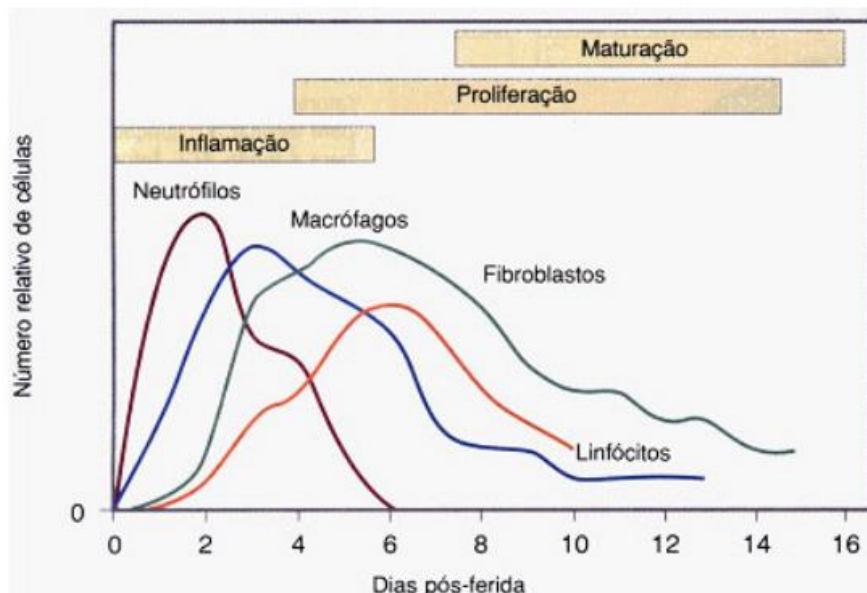
O reparo tecidual é o evento biológico pelo qual o organismo busca eliminar os danos causados nos tecidos, visando restaurar sua integridade anatômica estrutural e funcional. Este processo engloba uma complexa série de eventos imunológicos, bioquímicos e celulares sendo que, se descoordenados, podem acarretar lesões crônicas ou ainda fibroses extensas e indesejáveis (Estrela et al., 2006; Polydorou et al., 2006). Esse processo de reparo pode ocorrer através da regeneração ou da cicatrização do tecido, dependendo de fatores como extensão da lesão, tipo de tecido envolvido e da capacidade de regeneração das células (Naik et al., 2016). A cicatrização ocorre quando a lesão a ser reparada é muito grave ou quando o tecido afetado é incapaz de regenerar.

O processo de reparo é a resposta natural dos tecidos frente a um trauma e que desencadeia uma cascata de eventos vasculares, celulares e moleculares que são integrados. A reparação se inicia com a fase inflamatória, em seguida da fase proliferativa e finalmente a remodeladora, que visa à reestruturação funcional dos tecidos. De forma geral, o processo de reparo tecidual pode ser dividido em três fases: hemostasia, inflamação, proliferação e a remodelação (Menke et al., 2008).

Segundo Mendonça (2009), o processo cicatricial compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para que ocorra a restauração do tecido lesado. Desde o extravasamento de plasma, com a coagulação e agregação plaquetária até a reepitelização e remodelagem do tecido lesado o organismo age tentando restaurar a funcionalidade tecidual.

Tazima, Vicente, Moriya (2008), afirmam que o tempo do processo de reparo é variável e dependente dentre outros fatores da quantidade de esfoliação tecidual, da presença de fatores de interferência externa e de características individuais. O processo de reparação tecidual possui 3 fases: inflamação, proliferação e fase de maturação ou remodelamento (Figura 1). Em cada fase são recrutados ou liberados fatores de reparação tecidual, células de defesa como neutrófilos e macrófagos, e colagenases que atuarão na síntese da nova matriz.

Figura 1 - Evolução do número relativo de células sanguíneas mononucleares e fibroblastos nas fases inflamatória, proliferativa e de maturação no processo de reparação tecidual



Fonte: Tazima, Vicente e Moriya (2008).

A fase inflamatória é a primeira resposta do organismo frente à agressão ou ameaça (Cardoso et al., 2008). As células como macrófagos, mastócitos e eventuais linfócitos, além das células do próprio tecido afetado iniciam a liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, as citocinas, que agem de modo a promover alterações vasculares. Esse conhecimento reafirma a importância da regulação da fase inflamatória, em que as células mononucleares iniciam a estimulação de fatores de crescimento, como ponto de partida a indução e o recrutamento de fibroblastos e células epiteliais, fundamental para a preparação da fase proliferativa.

A fase proliferativa acontece em dois momentos: sendo o primeiro caracterizado pela proliferação de células endoteliais e neovascularização na área afetada, ou seja, conhecido como angiogênese, de acordo com Landén et al. (2016). E o segundo caracteriza-se pelo recrutamento e proliferação de fibroblastos, estimulando a cicatrização, processo conhecido como fibroplasia. Os fibroblastos passam por modificações e remodelamento, de forma que o resultado do reparo

depende do equilíbrio entre a síntese e a degradação do processo cicatricial. Esta etapa da reparação tecidual depende da modulação de fibroblastos, levando à contração da ferida (Sanguanini et al., 2019).

2.3 Ozonioterapia

O ozônio (O₃) é uma molécula gasosa natural, composta por três átomos de oxigênio e possui propriedades únicas que proporcionam uma vasta aplicação aos sistemas biológicos e tratamentos clínicos (França et al, 2020). É uma molécula altamente reativa, porém instável, atualmente, foi descoberto que o gás é produzido na formação do complexo antígeno-anticorpo do corpo humano, o que comprova que essa molécula é fisiologicamente gerada pelo sistema imunológico (Babior et al., 2013).

Christian Friedrich Schonbein (1834), nomeado pai da Ozonioterapia, demonstrou as mudanças causadas no oxigênio (O₂) que derivam na formação do ozônio (Silvia et al., 2021). Este gás demonstrou propriedades desinfetantes importantes e altamente voláteis, com alto poder oxidativo. O uso da ozonioterapia em queimaduras foi associado a componentes como água (Miroshin; Kontorshikova, 1995) e óleo ozonizado (Campanati et al., 2013).

A ação antimicrobiana da Ozonioterapia ocorre através do dano às membranas celulares e oxidação das proteínas intracelulares, o que desencadeia a perda do funcionamento da organela (Silvia et al., 2021).

Segundo Rodriguez Sanchez (2011), a ozonioterapia tem sido preconizado como coadjuvante no tratamento de diversas patologias, pelas qualidades do mecanismo de ação do ozônio um agente potencialmente biocida, atuando contra vírus (Goldstein et al.,1950; Emerson et al.,1982), fungos, relacionado à sua atividade altamente oxidativa (Shargawi et al. 1999), além de colônias bacterianas (Velano et al., 2001) e vermes (Péres et al., 2003).

Shargawi et al. (1999); Pereira et al. (2005); Gopalakrishnan et al. (2012), afirmam que o mecanismo de ação do ozônio está relacionado à sua atividade

altamente oxidativa, e segundo Lynch (2004), nenhum outro agente tem sido capaz de combater tantos patógenos como o ozônio.

Existem diversas modalidades de aplicações do ozônio, sendo algumas de uso restrito à prática médica (Lynch, 2004). As vias clássicas relacionadas à Odontologia são: aplicação do gás diretamente aos tecidos; água ozonizada e óleo ozonizado. Na aplicação local, segundo Estrela et al. (2006), o ozônio apresenta propriedades de reduzir a dor e a inflamação, neutralizando mediadores neuroquímicos da sensação dolorosa, facilitando a metabolização e a eliminação de mediadores inflamatórios como histamina, quinina e bradicinina.

No estudo realizado por Valachi et al. (2005), os autores aplicaram de forma tópica óleo de gergelim ozonizado em feridas cutâneas agudas no dorso de camundongos e, num estudo biométrico ao longo dos períodos de estudo, descreveram uma redução significativa das áreas lesadas.

Bocci (2005) afirma que a constante aplicação de óleo ozonizado em concentrações progressivamente baixas ao longo dos dias de tratamento atua diretamente em todas as fases inflamatórias da ferida prevenindo a superinfecção delas, e, estimulando a proliferação celular, a síntese de fibronectina, colágeno e ácido hialurônico.

Em um estudo (Melo et al., 2019) foi investigado os efeitos do óleo de girassol ozonizado no tratamento de queimaduras de terceiro grau induzidas por laser CO₂, em ratos Wistar. Os ratos foram divididos em dois grupos, com avaliações nos dias 7, 14 e 21 pós-queimaduras. Após 7 dias, ambos os grupos mostraram necrose e inflamação significativa. Após 14 dias, o grupo tratado exibiu células inflamatórias, tecido epitelial e novos vasos, enquanto o grupo não tratado apresentou inflamação e vasos moderados. Após 21 dias, ambos os grupos tinham feridas com crostas, com o grupo tratado mostrando menos inflamação e vasos, além de uma quantidade moderada de fibroblastos. O estudo concluiu que o óleo de girassol ozonizado teve efeitos positivos no tratamento de queimaduras de terceiro grau.

Em um relato de caso realizado por Sanchez (2008), o óleo ozonizado foi aplicado em um Cuy (*Cavia Porcellus*), o qual teve sua ferida cicatrizada por 8 dias. No exame histopatológico, foram avaliados os processos de cicatrização, ou seja,

formação de novos vasos, hiperemia, fibroblastos, presença infiltrado inflamatório, colágeno, erosão e presença de inflamação na derme e na epiderme. Afirma que o tratamento com óleo ozonizado obteve grande sucesso, pois a cicatrização foi rápida, com potencial de eficácia aos tratamentos de diversas patologias.

Num estudo realizado por Traina (2008), com água ozonizada em concentrações diferentes (grupos com 4ppm, 1ppm, água e um grupo que não recebeu tratamento), foi demonstrado que o grupo que recebeu água ozonizada com 4 ppm, apresentou uma contração da ferida em 14 dias de tratamento. O estudo afirmou que no histopatológico as feridas tratadas com água ozonizada de 1ppm obteve grande presença de fibroblastos, com moderada formação de novos vasos e pequena síntese de colágeno, enquanto o grupo tratado somente com água apresentou grande presença de fibroblastos, pouca síntese de colágeno e pouca formação de novos vasos. Os autores relatam ainda que as feridas no grupo sem tratamento apresentaram intensa presença de fibroblastos e pouca formação de novos vasos.

Sendo assim, no presente estudo investigamos o processo de reparação tecidual em queimaduras de espessura total induzidas em pele de ratos por laser de CO₂ e tratadas com óleo de girassol ozonizado.

3 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do ozônio veiculado no óleo de girassol na reparação tecidual de queimaduras induzidas experimentalmente em pele de ratos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o processo de reparação, em termos quantitativos na contagem dos componentes teciduais representativos como as células mononucleares, fibroblastos e vasos sanguíneos.

- Destacar a ação do ozônio nos elementos teciduais e nos períodos de evolução do processo de reparação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José dos Campos-SP – Instituto de Ciência e Tecnologia (Protocolo 010/2016– CEUA-ICT-UNESP – ANEXO 1).

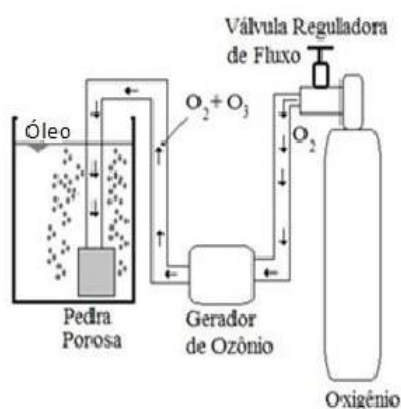
4.1 Animais

A fase experimental de tratamento e cuidados In vivo foi realizada nas dependências do Biotério do ICT-UNESP. Foram utilizados 45 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, com idade de 60 dias e peso entre 250 e 300 g. Em todos os momentos do estudo, os animais alojados individualmente em gaiolas metálicas, tiveram livre acesso à alimentação/dieta padrão e água potável *ad libitum* e foram mantidos em temperatura ambiente em ciclos circadianos de luz e escuridão de 12 horas cada.

4.1.1 Ozonização do Óleo de Girassol

Para a ozonização do óleo de girassol, utilizado como veículo, foi utilizado um gerador de ozônio (Ozone & Life, modelo O&L 1.5M) configurado para gerar 65 mg/litro de ozônio mediante o fornecimento de oxigênio medicinal na vazão de 1/8 litro por minuto durante 6 horas, atuando numa temperatura ambiente de 20° C controlada com equipamento de ar-condicionado, de acordo com Melo et al., (2014). Em seguida, o óleo foi fracionado e congelado (a -18°C) para utilização (Figura 2).

Figura 2: Ozonizador: aparato desenvolvido para a ozonização do óleo de girassol pelo fornecimento de oxigênio medicinal ao gerador de ozônio e imediatamente o gás formado é combinado com o óleo de girassol.



Fonte: Melo et al., (2014)

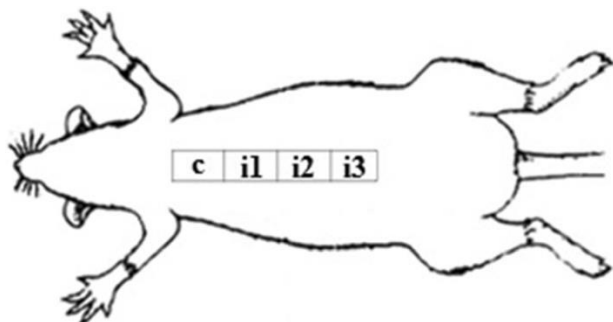
4.1.2 Procedimentos cirúrgicos e indução das queimaduras

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados assepticamente na sala de cirurgia do Biotério do ICT-UNESP.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (125 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg). Na sequência, foi realizada a tricotomia da região dorsal com demarcação de 4 áreas, sendo três irradiadas com o laser de CO_2 por 120 segundos e uma área como controle (Figura 3), segundo a técnica de Melo et al. (2014).

Um laser de CO_2 (Synrad, modelo J48-5-2848) com emissão em $\lambda=10,6 \mu m$ foi utilizado para indução das queimaduras. Essa radiação atingiu o dorso do animal por 120 segundos, sendo que, o ponto de incidência foi indicado por um laser semiconductor operando no vermelho.

Figura 3 - Distribuição das regiões avaliadas. As indicações referem-se à área controle (C) e áreas submetidas à irradiação por laser de CO₂ no dorso do rato (i1, i2, i3)



Fonte: Melo et al., (2014)

4.1.3 Tratamento das lesões induzidas

O presente estudo investigou a reparação tecidual em lesões cutâneas induzidas em um grupo de animais (n=15) que foram divididos em três subgrupos (n=5) de acordo com os diferentes períodos de estudo (7, 14 e 21 dias). Foram tratadas e analisadas as lesões sem terapia (grupo controle) e as lesões com tratamento tópico de ozônio veiculado ao óleo de girassol (grupo ozônio) de acordo com o protocolo a seguir:

1. *Grupo Ozônio* – Lesões com tratamento com óleo de girassol ozonizado

Os animais (n=15) foram subdivididos em três grupos de acordo com os períodos de estudo (7, 14 e 21 dias) de cinco animais cada. Após a queimadura receberam tratamento tópico, através do gotejamento de 0,2 ml do óleo de girassol ozonizado em cada lesão. O tratamento foi iniciado 24 horas após a indução das mesmas e realizado uma vez por dia durante os períodos de estudo previamente determinados.

2. Grupo *CONTROLE* - Lesões sem tratamento

Os animais (n=15) foram subdivididos em três grupos de cinco animais cada, de acordo com os períodos de estudo (7, 14 e 21 dias). Após a indução das queimaduras, estas lesões não receberam quaisquer tratamentos.

4.1.4 Eutanásia dos animais e obtenção das peças histológicas

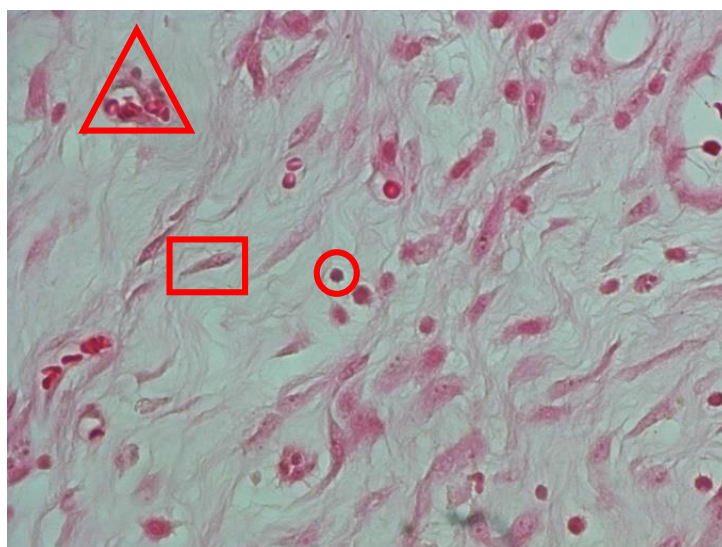
Nos dias determinados para o sacrifício dos animais, foi realizada a anestesia de acordo com o procedimento padrão estabelecido inicialmente na indução das queimaduras e efetuada a excisão dos tecidos para a realização do estudo histológico. Neste procedimento, foi realizada a eutanásia através da técnica de superdose dos mesmos anestésicos. Os animais foram sacrificados após 7, 14 e 21 dias (n=5 animais para cada grupo). As biópsias das regiões irradiadas e das regiões controle foram obtidas e fixadas em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas e, posteriormente, processadas de acordo com a técnica de inclusão em parafina (Paraplast plus ® sigma-aldrichchemical, Saint Louis, MO, USA). As peças foram incluídas em blocos de parafina e cortadas para obtenção de cortes histológicos com 5 µm de espessura no micrótomo rotativo automático (Leicarm 2255) e posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H-E).

4.1.5 Procedimentos de análise histométrica

Após a fase de microtomia e coloração, os cortes histológicos foram analisados no microscópio óptico Carl Zeiss, modelo Axioscop 4.0 (40x), e para o registro digital das imagens (fotomicrografias) foi utilizado o programa Axiovision 4.3 (Fig.3). Essa fase do estudo foi realizada no Laboratório de Histologia do Centro de Biociências Aplicado à Pacientes com Necessidades Especiais (CEBAPE) DO ICT-UNESP.

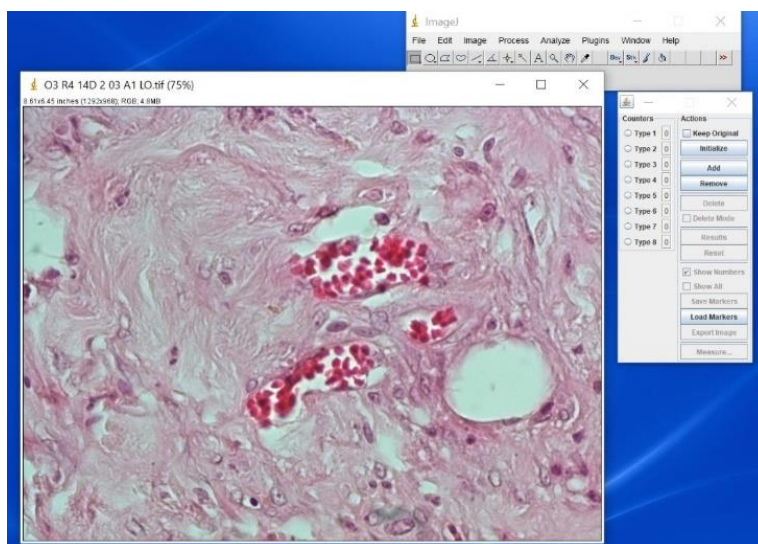
As fotomicrografias obtidas permitiram a análise e contagem de células inflamatórias mononucleares, vasos sanguíneos e fibroblastos presentes nas áreas de reparação das queimaduras, nos períodos determinados (7, 14 e 21 dias). Para isto, foi utilizado o software ImageJ (fig. 5), o qual possibilitou a contagem de células separando-as nos grupos já referidos anteriormente.

Figura 4 – Fotomicrografia da área da lesão com tratamento de ozônio. É possível observar células inflamatórias mononucleares (\circ), fibroblastos (\square) e vasos sanguíneos na região (\triangle)(40x).



Fonte: do autor.

Figura 5 – Software ImageJ utilizado para a análise e contagem das células das regiões fotografadas



Fonte: do autor.

4.1.6 Análise estatística

Após a contagem das células mononucleares, fibroblastos e vasos sanguíneos, os dados foram tabulados e submetidos à estatística descritiva, obtendo-se os valores médios e desvio padrão de cada um dos parâmetros estudados. A comparação entre os grupos e períodos de estudo foi realizada pela Análise de variância na obtenção do índice de Kruskal-Wallis (h). Para determinar sua significância biológica foi estabelecido $p = 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados das médias e do desvio padrão do estudo histométrico obtidos na presente pesquisa encontram-se resumidos na tabela 1 e os valores da análise de variância dos parâmetros estudados encontram-se nas tabelas 2, 3 e 4.

TABELA 01 – Médias e desvio padrão da contagem de fibroblastos, células mononucleares e vasos sanguíneos nos grupos Ozônio e Controle, nos períodos de 07, 14 dias e 21 dias

Células e vasos	Grupo	07 dias		14 dias		21 dias	
		N	$\bar{x} \pm dp$	N	$\bar{x} \pm dp$	N	$\bar{x} \pm dp$
Fibroblastos	Ozônio	47	$8,62 \pm 7,58$	48	$9,71 \pm 7,22$	24	$9,87 \pm 9,32$
	Controle	104	$8,88 \pm 8,48$	36	$3,77 \pm 2,49$	23	$3,86 \pm 2,73$
Mononucleares	Ozônio	54	$4,31 \pm 3,00$	49	$8,14 \pm 4,64$	29	$5,50 \pm 4,41$
	Controle	122	$8,98 \pm 9,63$	33	$4,22 \pm 2,49$	25	$2,43 \pm 1,59$
Vasos sanguíneos	Ozônio	47	$3,23 \pm 6,45$	46	$8,00 \pm 6,58$	24	$4,29 \pm 4,01$
	Controle	104	$4,07 \pm 4,26$	36	$4,47 \pm 3,05$	23	$1,73 \pm 1,83$

Fonte: do autor.

A tabela 1 mostra que as médias do número de fibroblastos no grupo tratado com ozônio foram semelhantes nos três períodos analisados (8,62; 9,71; 9,87) enquanto no grupo controle estas células se mostraram em maior número na fase inicial de 7 dias (8,88) e menos numerosos nos períodos de 14 e 21 dias (3,77 e 3,86 respectivamente)

Com referência ao número de células Mononucleares frequentes, o grupo tratado com Ozônio apresentou medias menores nos períodos de 07 e 21 dias (4,31 e 5,50 respectivamente) e um número maior de células (8,14) no período de 14 dias.

O grupo Controle apresentou maior número de células no período de 07 dias (8,98) e menor frequência nos períodos subsequentes de 14 dias (4,22) e 21 dias (2,43).

Quanto ao número de vasos sanguíneos presentes, o grupo tratado com Ozônio apresentou medias menores nos períodos de 07 e de 21 dias (3,23 e 4,29 respectivamente) sendo maior a frequência de vasos no período de 14 dias (8,00). Os valores encontrados no grupo Controle foram semelhantes nos períodos de 07 (4,07) e de 14 dias (4,47), sendo menos frequentes (1,73) no 21 dia.

As tabelas 2, 3 e 4 mostram os resultados da análise de variância, valores do índice H (Kruskal Wallis) e p (probabilidade), comparativamente dos grupos Ozônio e Controle, nos períodos analisados iniciais de 07 dias e final de 21 dias.

TABELA 02 – Análise de variância (Kruskal-Wallis) dos valores encontrados na análise histométrica de fibroblastos dos grupos Ozônio e Controle, nos períodos de 07 e 21 dias

Fibroblastos			
Ozônio	7 x 21 dias	H = 0,036	p = 0,85
Controle	7 x 21 dias	H = 64,79	p = 0,000 *
Ozônio x Controle	21 x 21 dias	H = 31,80	p = 0,000 *

Fonte: do autor.

A tabela 2 resume os resultados da análise de variância encontrados na frequência de Fibroblastos. O grupo Ozônio mostrou que as medias encontradas no de 07 dias e no de 21 dias foram semelhantes ($p= 0,85$) entretanto as frequências encontradas no grupo Controle, nestes períodos, foram diferentes estatisticamente

significantes ($p= 0.000$). Na análise comparativa dos períodos finais de 21 dias entre os grupos Ozônio e Controle as diferenças foram altamente significantes ($p= 0.000$).

TABELA 03 – Análise de variância (Kruskal-Wallis) dos valores encontrados na análise histométrica de células mononucleares dos grupos Ozônio e Controle, nos períodos de 07 e 21 dias

Células mononucleares			
Ozônio	7 x 21 dias	H = 1,98	p = 0,159
Controle	7 x 21 dias	H = 18,94	p = 0,000 *
Ozônio x Controle	21 x 21 dias	H = 6,88	p = 0,000 *

Fonte: do autor.

A análise de variância feita nas células Mononucleares (tabela 03), mostrou que as frequências medias encontradas no grupo Ozônio, nos períodos inicial e final, foram semelhantes ($p= 0,159$) sem diferenças estatisticamente significantes, entretanto no grupo Controle as medias apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p= 0,000$). Na comparação dos valores encontrados nos grupos Ozônio e Controle, no período de 21 dias, as médias foram diferentes altamente significantes ($p= 0,000$).

TABELA 04 – Análise de variância (Kruskal-Wallis) dos valores encontrados na análise histométrica de vasos sanguíneos dos grupos Ozônio e Controle, nos períodos de 07 e 21 dias

Vasos sanguíneos			
Ozônio	7 x 21 dias	H = 3,99	p = 0,047
Controle	7 x 21 dias	H = 6,87	p = 0,009
Ozônio x Controle	21 x 21 dias	H = 3,99	p = 0,046

Fonte: do autor.

Com referência à frequência de vasos sanguíneos (tabela 4), a análise de variância mostrou que as médias comparativas do 07 e 21 dias foram estatisticamente significantes no grupo Ozônio ($p = 0,047$) e altamente significantes no grupo Controle ($p = 0,009$). As médias encontradas no período final de estudo, 21 dias, dos grupos Ozônio e Controle apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,046$).

6 DISCUSSÃO

O mecanismo de ação do ozônio está relacionado à sua atividade altamente oxidativa (Shargawi et al., 1999; Pereira et al., 2005; Gopalakrishnan et al. 2012) e, no entendimento de Lynch (2004) nenhum outro agente tem sido capaz de combater tantos patógenos como o ozônio.

Segundo Valachi et al. (2005) e Bocci (2006), a ozonioterapia pode ser um tratamento adjuvante ao tratamento convencional, tendo uma comprovação eficiente no tratamento de diferentes enfermidades. Rodriguez Sanchez (2011), afirma que o uso tópico do óleo ozonizado tem sido benéfico para algumas lesões como psoríase, úlceras diabéticas, fistulas, feridas pós cirúrgicas melhorando a manifestação de sinais e dos sintomas.

Existem diversas modalidades de aplicações do ozônio, sendo algumas de uso restrito à prática médica (Lynch, 2004). As vias clássicas são: aplicação do gás diretamente aos tecidos; água ozonizada e óleo ozonizado.

Na aplicação local, segundo Estrela et al. (2006), o ozônio apresenta propriedades de reduzir a dor e a inflamação, neutralizando mediadores neuroquímicos da sensação dolorosa, facilitando a metabolização e a eliminação de mediadores inflamatórios como histamina, quinina e bradicinina.

Na área da odontologia, a ozonioterapia tem sido usada no controle de biofilmes, canais radiculares, cicatrização de feridas, cárie dentária, tratamento de líquen plano, gengivite, periodontite, halitose, osteonecrose da mandíbula, dor pós-cirúrgica, hipersensibilidade dentinária, distúrbios da articulação temporomandibular e clareamento dentário (Suh Y, et al., 2019). Assim também, segundo Silva e Dietrich (2018), a ozonioterapia mostrou-se superior a técnicas convencionais quanto à capacidade de neutralização ou inibição do crescimento bacteriano na cavidade oral

Valachi et al. (2011) aplicaram de forma tópica óleo de gergelim ozonizado em feridas cutâneas agudas no dorso de camundongos e, num estudo biométrico ao longo dos períodos de estudo, descrevem uma redução significativa das áreas lesadas. Por outro lado, num estudo em equinos, Araújo (2014), afirma que feridas tratadas com óleo ozonizado tiveram uma cicatrização com melhor eficiência evidenciando uma avançada epitelização, acentuada proliferação de fibroblastos, e

moderada proliferação vascular.

Num estudo realizado por Traina em 2008, com água ozonizada em concentrações diferentes (grupos com 4ppm, 1ppm, somente água e um grupo sem tratamento) foi mostrado que o grupo que recebeu água ozonizada com 4ppm, apresentou uma contração da ferida em 14 dias de tratamento. Afirma que no estudo histopatológico as feridas tratadas com água ozonizada de 4ppm mostraram uma quantidade moderada de fibroblastos e de colágeno com pouca presença de novos vasos, enquanto o grupo tratado somente com água apresentou grande presença de fibroblastos, pouca síntese de colágeno e pouca formação de novos vasos.

Num estudo histológico e biométrico no tratamento de queimaduras de terceiro grau induzidas por laser CO₂ no dorso de ratos Wistar feito por Melo et al. (2014), foi mostrado que o óleo de girassol ozonizado apresentou efeitos positivos e benéficos no fechamento das lesões. Os autores descrevem que inicialmente as feridas em todos os animais apresentaram uma inflamação significativa, edema, congestão vascular e necrose de coagulação, e que na fase final de estudo os animais tratados exibiram aspectos morfológicos de menor inflamação.

Embora tenham sido descritas várias maneiras de veicular o ozônio na terapia tópica de feridas (Lynch, 2004) neste trabalho foi adotado o uso de ozônio associado ao óleo de girassol devido ao protocolo adotado em pesquisa anterior (Melo e col. 2019).

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o uso do ozônio determinou comportamentos diferenciados no processo de reparação das feridas causadas por queimaduras de CO₂ evidenciados com destaque no período final do estudo. A metodologia usada no estudo histométrico permitiu realizar a quantificação de fibroblastos, células mononucleares e de vasos sanguíneos presentes e representativos do processo de reparação das lesões. Devemos destacar a falta de artigos científicos que referenciem resultados de outros estudos histométricos que permitam analisar comparativamente os resultados obtidos nesta pesquisa. Desta maneira nossos resultados devem ser considerados de significativa importância por refletir quantitativamente um processo biológico regularmente descrito pelos aspectos histomorfológicos qualitativos. Assim, devemos analisar comparativamente as evidências observadas entre o grupo tratado com Ozônio e o grupo Controle, sem tratamento.

Neste sentido, evidenciamos que o número de fibroblastos no grupo Controle apresentou uma média maior apenas no 07 dia diminuindo significativamente no 14 dias e no 21 dias, enquanto no grupo tratado com ozônio as médias foram elevadas nos três períodos estudados (tabela 1). A análise de variância (tabela 2) realizada comparativamente nos período inicial e final do estudo mostrou diferenças estatisticamente significantes apenas no grupo Controle ($p= 0,000$) enquanto no grupo Ozônio as médias foram semelhantes ($p= 0,85X$). Isto permite aferir que o ozônio interferiu no processo de maturação tecidual nas lesões tratadas induzindo a proliferação de fibroblastos e mantendo um número maior destas células ao longo dos períodos de reparação estudados.

Assim também, a análise de variância de ambos os grupos, Ozônio e Controle, no período final de análise de 21 dias, mostrou diferenças altamente significantes ($p= 0,000$). Desta maneira, observamos que no grupo Controle, sem tratamento, o processo de reparação tecidual representado pelo número de fibroblastos decorreu de modo esperado de acordo com Tazima, Vicente, Moriya (2008), identificando o desenvolvimento normal e maturação do tecido conjuntivo, enquanto a permanência de elevado número de fibroblastos observados nesta pesquisa no grupo tratado com Ozônio, nas várias etapas de estudo, identifica sua interferência e falha de progressão do processo de maturação e de reparação tecidual.

Quanto ao número de células Mononucleares, representando o mecanismo de defesa tecidual, o grupo Controle evidenciou valores elevados da presença no 07 dia diminuindo significativamente no 14 dia e no 21 dias, enquanto o grupo Ozônio, diferentemente, apresentou menor número de mononucleares no 07 e 21 dias e maior número no 14 dia (tabela 1). Desta maneira, foi evidenciado o grande número de células mononucleares na fase inicial de reparo da lesão e seu conseqüente decréscimo ao longo do processo reparativo nos animais do grupo Controle, demonstrando a maturação e adequação histofisiológica da reparação tecidual, em concordância com Tazima, Vicente, Moriya (2008). No grupo Ozônio o número de células presentes no primeiro dia de estudo da fase reparativa foi menor, apenas proliferando significativamente no 14 dia e diminuindo no 21 dias, diferindo das observações de Tazima, Vicente, Moriya (2008). Esta alternância na frequência de mononucleares identifica a influência do ozônio retardando a proliferação inicial destas células nos primeiros dias do processo e induzindo este mecanismo somente após a

continuidade da reparação no período de 14 dias.

A análise de variância (tabela 3) mostrou as diferenças altamente significantes na frequência destas células nos períodos inicial e final do estudo no grupo Controle ($p= 0,000$), enquanto no grupo tratado com Ozônio o número de mononucleares foi estatisticamente semelhante ($p= 0,159$). A fase inicial do processo de reparação envolve a presença de grande número de células inflamatórias dentre as quais as mononucleares, fato este evidenciado no grupo Controle e deficiente no grupo Ozônio. Fica evidente a influência negativa do ozônio impedindo ou interferindo nos mecanismos de proliferação celular, especificamente neste tipo de células mononucleares.

A presença de vasos sanguíneos no tecido conjuntivo permite identificar o grau da intensidade metabólica de um tecido, e neste caso da lesão e do processo reparativo. A tabela 1 mostra que as médias do número de vasos no grupo Controle, no 07 e 14 dias foram estatisticamente semelhantes enquanto no 21 dia sua frequência foi menor. No grupo Ozônio foi observada uma frequência moderada e semelhante de vasos nos 07 e 21 dias e um aumento de número considerável no 14 dia.

A análise de variância (tabela 4) mostrou diferenças altamente significantes na comparação dos períodos de 07 e 21 dias no grupo Controle ($p= 0,009$), enquanto no grupo ozônio nestes mesmos períodos, inicial e final do estudo, se mostraram estatisticamente semelhantes ($p= 0,047$). A presença de vasos sanguíneos nas lesões no grupo Controle nos três períodos analisados representativos do processo contínuo de reparação tecidual se mostrou coerente com a maturação histofisiológica das lesões, entretanto a frequência observada no grupo ozônio, sendo muito elevada no 14 dia, evidencia uma interferência da terapia influenciando a formação de novos vasos neste período, fato ausente na fase inicial do processo de reparo.

Pelos resultados obtidos na metodologia adotada consideramos que a terapia tópica do ozônio veiculado com óleo de girassol em feridas cutâneas por queimaduras não se mostrou eficiente no processo de reparação tecidual, interferindo na proliferação celular, ora estimulando a multiplicação e permanência de fibroblastos, ora diminuindo a frequência de células mononucleares e de vasos sanguíneos nas etapas iniciais do processo.

Este desempenho biológico do ozônio, discrepante, já fora manifestado por

Rosa et al. (2023) numa revisão dos trabalhos relacionados à ozonioterapia num período de vinte e três anos de estudo. Os autores afirmam que os efeitos da ozonioterapia indicaram uma eficácia satisfatória, porém ainda com evidências limitadas.

Consideramos que novos estudos são necessários abordando aspectos moleculares que possam elucidar os mecanismos da interferência na dinâmica celular e na resposta tecidual no processo de reparação.

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia e resultados descritos, podemos concluir que:

- A terapia com óleo de girassol ozonificado não se mostrou eficiente na reparação de feridas cutâneas por queimaduras;
- O uso de óleo de girassol ozonificado estimulou a proliferação inadequada de fibroblastos em todos os períodos analisados;
- O uso de óleo de girassol ozonificado retardou a proliferação de células mononucleares e da formação de vasos sanguíneos;
- A frequência de células mononucleares, vasos sanguíneos e fibroblastos no grupo controle mostraram evolução normal do processo reparativo;
- Os períodos de estudo determinados permitiram uma observação adequada das modificações teciduais do processo reparativo.

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª edição. Rio de Janeiro. Elsevier Brasil; 2015. 552 páginas. ISBN: 9788535283204.

Al-Dalain SM, Martínez G, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Re L, Giuliani A, León OS. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res*. 2001 Nov;44(5):391-6. doi: 10.1006/phrs.2001.0867. PMID: 11712870.

Araújo AL de. Efeitos do uso tópico de óleo de andiroba puro e ozonizado em feridas cutâneas experimentalmente induzidas em equinos. repositoriouvbr [Internet]. 2014 Feb 11; Available from: <https://repositorio.uvv.br/handle/123456789/262>

Bastos PL, Ottoboni GS, Karam AM, Sampieri MB da S, Araújo EF de. Ozonioterapia na odontologia: revisão sistemática de literatura. *Research, Society and Development*. 2022 Mar 24;11(4):e46711427474.

Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*. 2006 May;37(4):425-35. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.08.006. PMID: 16624639.

Brito, AFS. Diferentes Doses De Laser No Tratamento Neural Após Compressão Experimental Do Nervo Ciático De Ratos Submetidos a Hipocinesia Dos Membros Pélvicos [dissertação]. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2010. Available from: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/5049/1/texto%20completo.pdf>

Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Mar;105(3):e85-91. doi: 10.1016/j.tripleo.2007.10.006. PMID: 18280954.

Chiari A, Fernandes M do C, Negrini F, Oliveira J de, Mesquita RA. Hidroterapia e exercícios respiratórios associados à massoterapia na reabilitação de paciente com queimaduras acometendo a região torácica. *Fisioter Bras* [Internet]. 2007; 441–7. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-491309>

Gupta S, Arun D. Applications of ozone therapy in dentistry. *Journal of Oral Research and Review*, 2016. 8. 86. DOI: 10.4103/2249-4987.192243.

Ferreira T, Torres L, Monteiro B, Silva I, Mendonça S. Os efeitos da ozônioterapia em indivíduos com dores musculoesqueléticas: revisão sistemática. *Centro de Pesquisas Avançadas em Qualidade de Vida*. 2020;(v12n3):1-6. doi: 10.36692/v12n3-27r

Emerson MA, Sproul OJ, Buck CE. Ozone inactivation of cell-associated viruses. *Appl Environ Microbiol*. 1982 Mar;43(3):603-8. doi: 10.1128/aem.43.3.603-608.1982. PMID: 6280611; PMCID: PMC241881.

Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*. 2017 Jun 9;356(6342):1026-1030. doi: 10.1126/science.aam7928. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28596335.

Estrela C, Estrela CR, Decurcio Dde A, Silva JA, Bammann LL. Antimicrobial potential of ozone in an ultrasonic cleaning system against *Staphylococcus aureus*. *Braz Dent J*. 2006;17(2):134-8. doi: 10.1590/s0103-64402006000200010. PMID: 16924341.

Ferreira S, Mariano RC, Garcia Júnior IR, Pellizer EP. Ozônioterapia no controle da infecção em cirurgia oral. *Rev Odontol Araçatuba (Impr)* [Internet]. 2013; 36–8. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-856954>

Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J*. 2018 Aug;15(4):633-644. doi: 10.1111/iwj.12907. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29536625; PMCID: PMC7949634.

Gopalakrishnan S, Parthiban S. Ozone- a new revolution in dentistry [Internet]. Semantic Scholar. 2012. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/OZONE-A-NEW-REVOLUTION-IN-DENTISTRY-Gopalakrishnan-Parthiban/a67afbf20b62f83b6c0fc8642fbdbc304fc76c2d>

Karam AM. Ozonioterapia na preparação tecidual de feridas induzidas em pele de ratos [dissertação] Barretos, Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, 2012.

Kim JG, Yousef AE, Dave S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot.* 1999 Sep;62(9):1071-87. doi: 10.4315/0362-028x-62.9.1071. PMID: 10492485.

Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Oct;73(20):3861-85. doi: 10.1007/s00018-016-2268-0. Epub 2016 May 14. PMID: 27180275; PMCID: PMC5021733.

Lynch E. Ozone: the revolution in Dentistry. Reino Unido, Quintessência, 2004. 288. ISBN 1850970882

Mandelbaum SH, Di Santis ÉP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2003 Aug;78(4):393–408.

Marchesini BF, Ribeiro SB. Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. *Fisioter Bras* [Internet]. 2020;281–8. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1283097>

Marques Meccatti V, de Carvalho LS, Yoshiko Hakumata Oliveira L, Dias de Oliveira L. Efetividade da ozonioterapia no tratamento endodôntico. *RECIMA21 - Revista*

Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218 [Internet]. 2023 Jul 31; 4(8):e483528. Disponível em: <https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/3528>

Melo MS., Alves LP., Carvalho HC., Lima CJ., Munin E., Vilela-Goulart MG., Gomes MF., Salgado MAC., Zângaro RA. Ozonioterapia Em Queimaduras Induzidas Por Laser De Co 2 Em Pele De Ratos. Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 24., 2014, Uberlândia. Anais Eletrônicos. Uberlândia: UFU, 2014.

Menezes ELM de. A enfermagem no tratamento dos queimados [Internet]. pesquisa.bvsalud.org. 1988. p. 125–5. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-669903>

Naik SV, K R, Kohli S, Zohabhasan S, Bhatia S. Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth????? Open Dent J. 2016 May 11;10:196-206. doi: 10.2174/1874210601610010196. PMID: 27386005; PMCID: PMC4911747.

Orban C, Tomescu D. The importance of early diagnosis of sepsis in severe burned patients: outcomes of 100 patients. Chirurgia (Bucur). 2013 May-Jun;108(3):385-8. PMID: 23790789.

Peck MD. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. Burns. 2011 Nov;37(7):1087-100. doi: 10.1016/j.burns.2011.06.005. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21802856.

Pereira MMS, Navarini A, Mimica LMJ, Pacheco Jr. AM, Silva RA. Efeito de diferentes gases sobre o crescimento bacteriano: estudo experimental “in vitro.” Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. 2005 Feb;32(1):12–4.

Méndez Pérez NI, Calunga Fernández JL, Menéndez Cepero S. Ozonioterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por Giardia lamblia: estudio preliminar [español]. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas [Internet]. 2003 Sep 1; 22(3):145–9. Available from: http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000300001

Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin-bonding systems. *Eur J Oral Sci.* 2006 Aug;114(4):349-53. doi: 10.1111/j.1600-0722.2006.00363.x. PMID: 16911107.

Rodriguez Sanchez MDP. Estudo histomorfológico e histomorfométrico da reparação tecidual na alveolite provocada em ratos tratada por óleo ozonizado [dissertation]. São Paulo: University of São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. doi:10.11606/D.23.2011.tde-20092011-165642. Available from: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23149/tde-20092011-165642/pt-br.php>

Rosa LR de O, Araújo JB, Aguiar KLF de, Costa MML, Ferreira VA, Marques DMC, et al. Benefícios da Ozonioterapia nas Patologias Bucomaxilofaciais. *Arch Health Invest [Internet].* 21^o de julho de 2023;12(7):1488-94. Disponível em: <https://www.archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/6135>

Rossi LA, Ferreira E, Costa ECFB, Bergamasco EC, Camargo C. Prevenção de queimaduras: percepção de pacientes e de seus familiares. *Revista Latino-Americana de Enfermagem.* 2003; 11(1): 36-42.

Sanchez CM. A utilização de óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinho da índia (*Caviaporcellus*) - relato de caso [monografia]. Itatiba, Universidade Camilo Castelo Branco, 2008. Available from: http://polivet-itapetininga.vet.br/mhav/tbo/Oleo_ozonizado.pdf

Shargawi JM, Theaker ED, Drucker DB, MacFarlane T, Duxbury AJ. Sensitivity of *Candida albicans* to negative air ion streams. *J Appl Microbiol.* 1999 Dec;87(6):889-97. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00944.x. PMID: 10664912.

Silva VCC. O efeito do laser de baixa potência (658nm) na capacidade tecidual de queimaduras de terceiro grau em ratos Wistar [dissertação]. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba; 2006.

Traina AA. Efeitos biológicos do ozônio diluído em água na preparação tecidual de feridas dérmicas em ratos [tese]. São Paulo, Universidade de São Paulo, 2008.

Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:610418. doi: 10.1155/2010/610418. Epub 2010 Jul 4. PMID: 20671923; PMCID: PMC2910505.

Valacchi G, Fortino V, Bocci V. A dupla ação do ozônio na pele. *Jornal Britânico de Dermatologia*. 2005; 153:1096-1100.

Valacchi G, Lim Y, Belmont G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, Travagli V. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair and Regeneration*. 2011; 19: 107-15.

Velano HE, do Nascimento LC, de Barros LM, Panzeri H. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus* [In vitro assessment of antibacterial activity of ozonized water against *Staphylococcus aureus*]. *Pesqui Odontol Bras*. 2001 Jan-Mar;15(1):18-22. Portuguese. doi: 10.1590/s1517-74912001000100004. PMID: 11705311.

Sanguanini RC. Efeitos da água e do óleo ozonizados no reparo tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos. 2019. 71 f. [Dissertação]. Goiânia, Universidade Federal de Goiás, 2019.

Saraiva L, Adriana Campos Tortelli S, Santos Gomes Jorge M, Oliveira Siqueira M, Mara Wibelinger L, Cristina Miyagaki D. Tratamento de disfunção temporomandibular com ozonioterapia: revisão sistemática. *Revista da Faculdade de Odontologia - UPF*. 2019 Dec 19;24(2):316–21. Disponível em: <https://seer.upf.br/index.php/rfo/article/view/10461>

Silva HM da, Oliveira ECM, Lira LMSS de, Rocha LMBM, Gaines APL, Marinho RRB, et al. Aplicação da ozonioterapia na odontologia: revisão integrativa. *Revista*

Eletrônica Acervo Saúde. acervomaiscombr [Internet]. 2021 Aug 25; Available from: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/8648>

Xavier PB, Silva Í de S, Almeida JLS, Araujo TL de L, Santos GA dos, Braga DM dos R, et al. Aplicação da ozonioterapia no tratamento de lesões de pele em idosos. Research, Society and Development. 2021 Dec 27;10(17):e229101724682.