

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO DE ODONTOLOGIA**

BRUNA CARVALHO LOPEZ MORENO

**EFEITO BIOMODULADOR DO ÓLEO OZONIZADO NO REPARO TECIDUAL DE
FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**
BIOMODULAR EFFECT OF OZONIZED OIL ON WOUND REPAIR OF SKIN IN
RATS

Salvador - BA
2024.2

BRUNA CARVALHO LOPEZ MORENO

**EFEITO BIOMODULADOR DO ÓLEO OZONIZADO NO REPARO TECIDUAL DE
FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**
BIOMODULAR EFFECT OF OZONIZED OIL ON WOUND REPAIR OF SKIN IN
RATS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cecília
Fonseca Azoubel

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Alena Ribeiro
Alves Peixoto Medrado

Salvador - BA
2024.2

RESUMO

Atualmente, tem ocorrido um aumento na busca por recursos terapêuticos que visem melhorar o reparo tecidual. Este estudo teve como objetivo analisar os possíveis efeitos biomoduladores de aplicações tópicas de óleo ozonizado na fase proliferativa da cicatrização de feridas cutâneas por meio de histomorfometria. Vinte ratos machos foram submetidos à cirurgia cutânea e uma ferida padronizada foi realizada na região dorsal. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 10 ratos cada. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e o Grupo 2 (GOO), foi tratado com óleo ozonizado na superfície da lesão. Os períodos de análise compreenderam do 5º e o 10º dia após a realização do ferimento cutâneo. As secções foram coradas com Hematoxilina-eosina para avaliação da intensidade do infiltrado monomorfonuclear densidade vascular e re-epitelização e com Sirius vermelho para análise do colágeno. A análise semiquantitativa no dia 5, demonstrou que a intensidade da inflamação foi menor no (GOO) ($p=0,033$). Também a área de colágeno e a densidade vascular foram maiores do que as observadas no GC ($p=0,012$ e $p=0,045$, respectivamente). No 10º dia, o infiltrado inflamatório ainda era evidente em ambos os grupos e a densidade vascular foi maior no GOO ($p=0,004$). Em relação às variáveis quantitativas, observou-se que apenas a reepitelização foi menor no GOO quando comparado ao GC ($p=0,029$) no dia 10. Assim, os autores concluíram que o uso de óleo ozonizado tópico foi capaz de modular a densidade vascular durante o ambos os períodos do estudo devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e estímulo da angiogênese.

Palavras-chave: Ozônio. Cicatrização. Cura.

ABSTRACT

Currently, there has been an increase in the search for therapeutic resources that aim to improve tissue repair. This study aimed to analyze the possible biomodulatory effects of topical applications of ozonated oil in the first days of healing of cutaneous wounds by means of histomorphometry. Twenty male rats underwent cutaneous surgery and a standardized wound was performed on the dorsal region. The animals were randomly divided into two groups of 10 rats each. Group 1 corresponded to the Control Group (CG) and Group 2 (OOG) was treated with ozonated oil on the surface of the lesion. The analysis periods comprised the 5th and 10th day after the cutaneous wound was performed. The sections were stained with Hematoxylin-eosin to evaluate the intensity of the monomorphonuclear infiltrate, vascular density and re-epithelialization and with Sirius red for collagen analysis. Semiquantitative analysis on day 5 demonstrated that the intensity of inflammation was lower in the (OOG) ($p=0.033$). The collagen area and vascular density were also higher than those observed in the CG ($p=0.012$ and $p=0.045$, respectively). On day 10, the inflammatory infiltrate was still evident in both groups and vascular density was higher in the OOG ($p=0.004$). Regarding the quantitative variables, it was observed that only re-epithelialization was lower in the OOG when compared to the CG ($p=0.029$) on day 10. Thus, the authors concluded that the use of topical ozonated oil was able to modulate vascular density during both periods of the study due to its anti-inflammatory effects and stimulation of angiogenesis.

Keywords: Ozone. Wound healing. Healing.

AGRADECIMENTOS

Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam, dos que foram chamados de acordo com o seu propósito (Romanos 8, 28).

Durante a graduação, este versículo esteve comigo: diante das dificuldades que se tornaram aprendizado, sabia que não estava sozinha e que tudo cooperaria para meu bem. A Deus, toda honra e glória por este propósito que hoje início como Cirurgiã-dentista. Agradeço a Jesus por estar comigo e ao Espírito Santo por guiar minhas atitudes. À minha Mãe do céu por interceder por mim e ao meu Anjo da Guarda por me proteger. Aos meus pais, Romualdo e Maria José, que nunca mediram esforços para a realização deste sonho, se o conquistei, foi porque me deram uma base firme e coragem. À minha melhor amiga e irmã, Ana Amélia, companheira e confidente. À memória da minha avó Zezé, meu maior exemplo de perseverança e retidão. A memórias da minha avó Dade e dos meus avôs Galdino e Romualdo, pelas memórias e ensinamentos. A toda minha família pelo apoio incondicional, muito do que sei sobre amor, foi por vocês. Aos meus mestres, que foram imprescindíveis em minha formação, em especial a minha co-orientadora, a Prof^a Dra. Alena Medrado por ser meu maior exemplo de profissional, pelas oportunidades e seu compromisso admirável com a pesquisa, que sempre estimulou o meu melhor. A Prof^a Dra. Maria Cecília Azoubel, pelo apoio e conversas que guardarei para sempre comigo.

As minhas irmãs do coração, Gabriela, Maria Clara Duarte, Maria Clara Badaró, Giovanna, Vanessa, Luiza, Sabrina, Júlia e Ana Júlia, essenciais para mim. Amigos da Paróquia Nossa Senhora da Luz, minha segunda casa, vital para meu crescimento espiritual e caráter. Colegas de turma e agora de profissão, que tornaram o processo mais leve e feliz. Funcionários da Bahiana, pelo compromisso e alegria.

Aos pacientes, agradeço a confiança em mim. Cada um foi essencial para meu desenvolvimento.

Uma vez me perguntaram qual o legado que quero deixar no mundo, respondi que é o meu testemunho, que agora sendo Cirurgiã-Dentista, que eu possa transformar mais vidas com a graça de Deus nessa minha nova missão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVO	6
2.1 GERAL	6
2.2 ESPECÍFICOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	7
3.2 AMOSTRA	7
3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E UTILIZAÇÃO DAS TERAPIAS BIOMODULADORAS	9
3.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	9
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E MORMOFÉTRICA	10
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
4. RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO	19
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

O uso medicinal do ozônio teve início no século XX e tem se estendido e fortalecido até os dias atuais (Xiao et al., 2017). Sabe-se que as suas propriedades biomoduladoras, entre as quais se destaca a regulação dos processos de oxi-redução, são úteis em diferentes contextos biológicos. Em especial, no reparo tecidual de diferentes tipos de ferimentos, tem sido documentada a sua fácil difusão nos fluidos corporais, fato este que permite a sua interação com moléculas orgânicas e estímulo à produção de potentes mediadores químicos imunomoduladores (Aktas et al., 2023).

Segundo Oliveira et al., 2011 o ozônio pode induzir maior vasodilatação periférica, com consequentes aumento da oxigenação do microambiente acometido pela lesão e aceleração do metabolismo celular. Esta ação terapêutica, entre outras, favorece o reparo de diversos tipos de ferimentos. O alótropo triatômico pode exercer uma ação anti-inflamatória, bactericida, antiviral e antifúngica. Tem sido usado, em diferentes vias de apresentação, como agente terapêutico clínico para o tratamento de fístulas e feridas pós-cirúrgicas, úlceras por pressão, feridas crônicas como úlceras tróficas, isquêmicas, diabéticas e psoriáticas (Bocci et al., 2009).

Recentemente, dois estudos destacaram o potencial do óleo ozonizado em diferentes contextos patológicos de cicatrização de feridas. Segundo Aktas et al., 2023, em seu estudo randomizado, demonstraram a eficácia do óleo ozonizado na redução do grau de inflamação e no aumento dos níveis de antioxidantes no sangue. Xiao et al., 2021, também demonstraram *in vivo* que o óleo ozonizado acelerou a cicatrização de feridas. O uso de diferentes tipos de óleos ozonizados tem crescido devido à sua fácil viabilidade e baixo custo. Além disso, pode ser administrado pelo próprio paciente de acordo com as recomendações do profissional de saúde. No entanto, ainda faltam estudos, principalmente em modelos experimentais *in vivo*, que avaliem o potencial terapêutico do óleo ozonizado.

Seria possível que aplicações tópicas nos primeiros dias de cicatrização de feridas pudessem contribuir para reduzir a inflamação e estimular processos proliferativos no

microambiente de reparo tecidual? Essa hipótese precisa ser mais estudada e discutida na literatura e se constitui o objetivo deste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar os efeitos biomoduladores do óleo ozonizado em feridas cirúrgicas padronizadas em pele de ratos através de análise histomorfométrica.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do óleo ozonizado sobre o infiltrado de células inflamatórias mononucleares em secções de pele coradas com Hematoxilina-eosina;
- Determinar a densidade vascular no microambiente da lesão, através de análise histomorfométrica;
- Analisar a área de colágeno em secções coradas com Sírius vermelho;
- Avaliar a espessura do epitélio recém-formado em secções de pele dos espécimes do estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA). Foi registrado com o número de protocolo 67/2019. O número do parecer de aprovação pelo CEUA foi CIAEP: 01.0039.2013.

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos, com peso entre 150–300 g provavelmente, do biotério da FADBA. Os animais foram divididos aleatoriamente por sorteio em dois

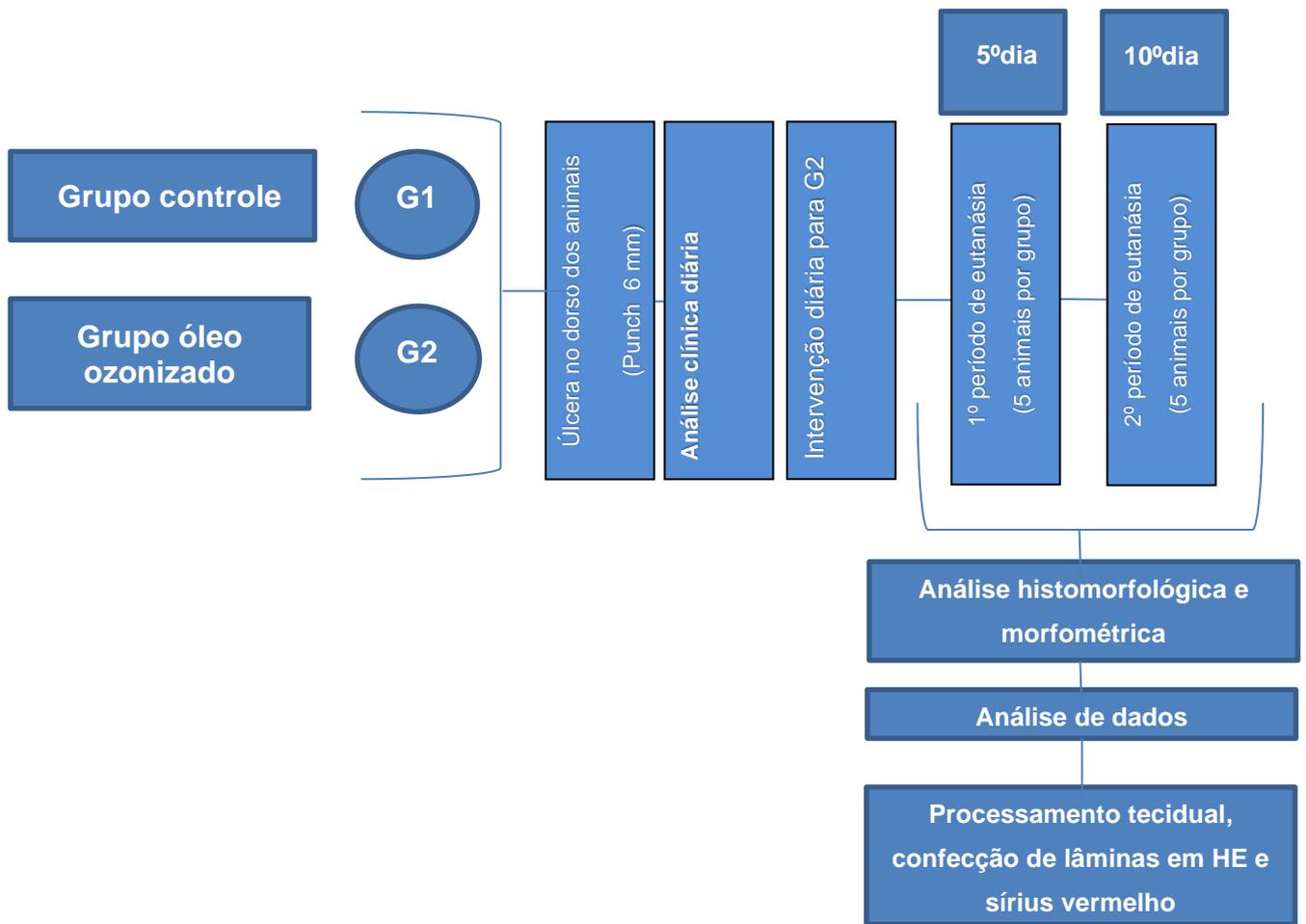
grupos de 10 ratos cada, que foram sacrificados 5 e 10 dias após os tratamentos propostos. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e recebeu uma aplicação de gota de salva; o Grupo 2, denominado Grupo Óleo Ozonizado (GOO), foi tratado com óleo na superfície da lesão. Durante o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, nas condições sanitárias do biotério convencional da instituição. Os animais foram alojados em gaiolas etiquetadas, com piso coberto com maravalha. Os ratos foram mantidos sob as condições padrão de temperatura (22–25 °C), umidade relativa (50–52%), e expostos à luz artificial 12 horas por dia. Os ratos foram alimentados com ração balanceada Nuvilah® (Suprilab) e água *ad libitum*. Cuidados específicos foram tomados com a limpeza e o ambiente foi protegido de estímulos auditivos para evitar estresse.

3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E UTILIZAÇÃO DAS TERAPIAS BIOMODULADORAS

Os animais foram pesados, anestesiados com cloridrato de cetamina 10% (Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml, nas doses de 2 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente. Posteriormente, foi realizada tricotomia dorsal e antissepsia com iodopovidona (Rioquímica, São Paulo, Brasil). Foi realizada incisão circular na região dorsal com bisturi circular metálico, também chamado punch (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) com diâmetro de 6 mm para obtenção de ferida uniforme e padronizada, realizada por um único operador calibrado. Uma descrição detalhada desses métodos foi descrita por Lima, (2023).

Foi administrado óleo de girassol 100% ozonizado (Philozon - LTDA, Santa Catarina, Brasil), com índice de peróxido informado pelo fabricante de 600 meq/kg. Utilizando-se uma pipeta, aplicou-se 50 µl de óleo ozonizado sobre a superfície da lesão e cobriu-se toda a sua extensão, por três dias consecutivos, da mesma forma que o grupo controle, que recebeu o mesmo volume de solução salina a 9%. Os animais foram tratados com óleo ozonizado nos dias 1, 2 e 3 do pós-operatório. O delineamento experimental está ilustrado no Fluxograma 1.

Fluoxograma 1: Esquematização do desenho experimental.



Fonte: Autores.

Nos respectivos dias de sacrifício, após sedação profunda com a solução anestésica já descrita, os animais foram colocados na câmara de gás onde foi liberado gás carbônico na concentração de 5 litros por minuto até a confirmação do óbito.

3.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Uma porção de tecido foi retirada do dorso dos ratos de modo a abranger a ferida cirúrgica. O espécime foi fixado por um período mínimo de 18 horas em solução de formalina tamponada a 10%. Os fragmentos de pele contendo a lesão foram submetidos a cortes histológicos de 4 micrômetros de espessura e corados com Hematoxilina-eosina para avaliação das variáveis infiltrado polimorfo e monomorfonuclear, densidade vascular e re-epitelização. Os cortes de tecido também foram corados com Sirius Red para análise da neocolagênese.

3.5 AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA

A captura das imagens dos cortes de tecido submetidos às colorações descritas acima foi realizada utilizando o Software Motic Images Advanced 3.0 ® (Motic China Group CO. LTD) no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão para análise de todos os casos, a saber, 13107.200000 pixels. Cinco imagens padrão correspondentes a cada secção de tecido foram capturadas com a dimensão estabelecida para uma análise semiquantitativa do infiltrado inflamatório polimorfo e monomorfonuclear, densidade vascular e neocolagênese. Essas áreas foram documentadas nas regiões correspondentes às bordas da úlcera, uma fotomicrografia de cada lado, e três áreas foram obtidas da região central da derme subjacente à localização da úlcera cutânea. Além disso, foi realizada uma análise quantitativa da espessura do epitélio que recobre a ferida e da área correspondente à neocolagênese. Cada área capturada foi obtida com aumento de 400X e salva no formato JPEG.

Todas as análises foram realizadas em triplo-cego, por examinadores previamente calibrados. O índice kappa de Cohen foi utilizado para avaliar a concordância entre os examinadores e demonstrou um resultado de 0,92 (Cohen,1960).

Nos cortes corados pela Hematoxilina-eosina, o grau de inflamação no tecido foi avaliado segundo os critérios descritos no estudo de Alvarenga et al. (2020). Foi realizado um estudo semiquantitativo dos cortes que incluiu a análise das variáveis infiltrado inflamatório monomorfonuclear, intensidade da inflamação e densidade vascular em que foram adotados os critérios de ausente (0), discreto (+), moderado (++) e intenso (+++) e muito intenso (++++). A definição dos critérios de avaliação histológica foi baseada nos seguintes aspectos: quando a variável estava presente em percentual igual ou superior a 75% no corte analisado, o grau foi considerado muito intenso; entre 50% e 75%, intenso; 25 e 50% das células no tecido, grau moderado; e menor ou igual a 25%, discreto.

Para analisar a espessura do epitélio neoformado, foram realizadas três medidas lineares padrão da epiderme recém-formada. As bordas imediatamente próximas à úlcera foram consideradas, e três linhas lineares foram estabelecidas, estendendo-se da camada basal ao estrato córneo. A extensão de cada linha foi calculada em micrômetros (μm) e uma média aritmética dos valores medidos foi estabelecida.

Secções coradas com Sirius Vermelho também foram usados para avaliar o colágeno. Ele foi analisado de duas maneiras. De acordo com os critérios semiquantitativos estabelecidos por Alvarenga et al., (2020) as fibras de colágeno foram classificadas por três pontuações: 1. fibras de colágeno finas, delicadas e frouxamente organizadas observadas em toda a área da ferida; 2. fibras de colágeno finas, delicadas e frouxamente organizadas em algumas áreas e mais espessas em outras áreas da ferida, e 3. fibras de colágeno espessas e densamente organizadas observadas em toda a área da ferida. Além disso, a área de colágeno foi medida em cada uma das cinco micrografias obtidas dos cortes histológicos, e uma média aritmética foi calculada em micrômetros, de acordo com o estudo de Miot et al., (2010).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um banco de dados foi criado no Microsoft® Excel® 2010 (versão 14.0.7132.5000, Microsoft® Office Professional Plus 2010, EUA) e analisado no software R (versão 3.1.1). A distribuição dos dados quanto à normalidade foi testada com o teste de Shapiro–Wilk. Foram realizados os testes não paramétricos de Mann–Whitney e Kruskal–Wallis, seguidos do teste a posteriori de Dunn. O nível de significância considerado para este estudo foi de $P < 0,05$.

A Figura 1 ilustra o esboço geral de todas as fases do estudo.



Figura 1: Linha do tempo representativa da metodologia do estudo experimental. Fonte: Adaptado de Alvarenga et al., 2020.

4. RESULTADOS

As secções de pele coradas com Hematoxilina-eosina dos animais sacrificados 5 dias após a cirurgia cutânea mostraram presença de infiltrado inflamatório monomorfonuclear, predominantemente linfoplasmocitário em ambos os grupos experimentais (figuras 2A e 2B). Na área da lesão, observou-se a presença de tecido de granulação típico, com células de formato romboide com núcleos hipercromáticos e intensa basofilia núcleo/citoplasmática, além de numerosos vasos sanguíneos neoformados. Foi observada desorganização das fibras colágenas nas áreas

correspondentes às bordas da ferida cutânea, logo abaixo do tecido epitelial em formação, (figuras 2E e 2F) bem como nas camadas mais profundas da derme, acima da hipoderme. No décimo dia, houve redução do processo inflamatório (figuras 2C e 2D) e maior grau de organização das fibras colágenas na área da fibroplasia em ambos os grupos de estudo (figuras 2G e 2H). Foi visualizado o início da migração dos queratinócitos das bordas da ferida, o que caracterizou a formação de um novo tecido epitelial.

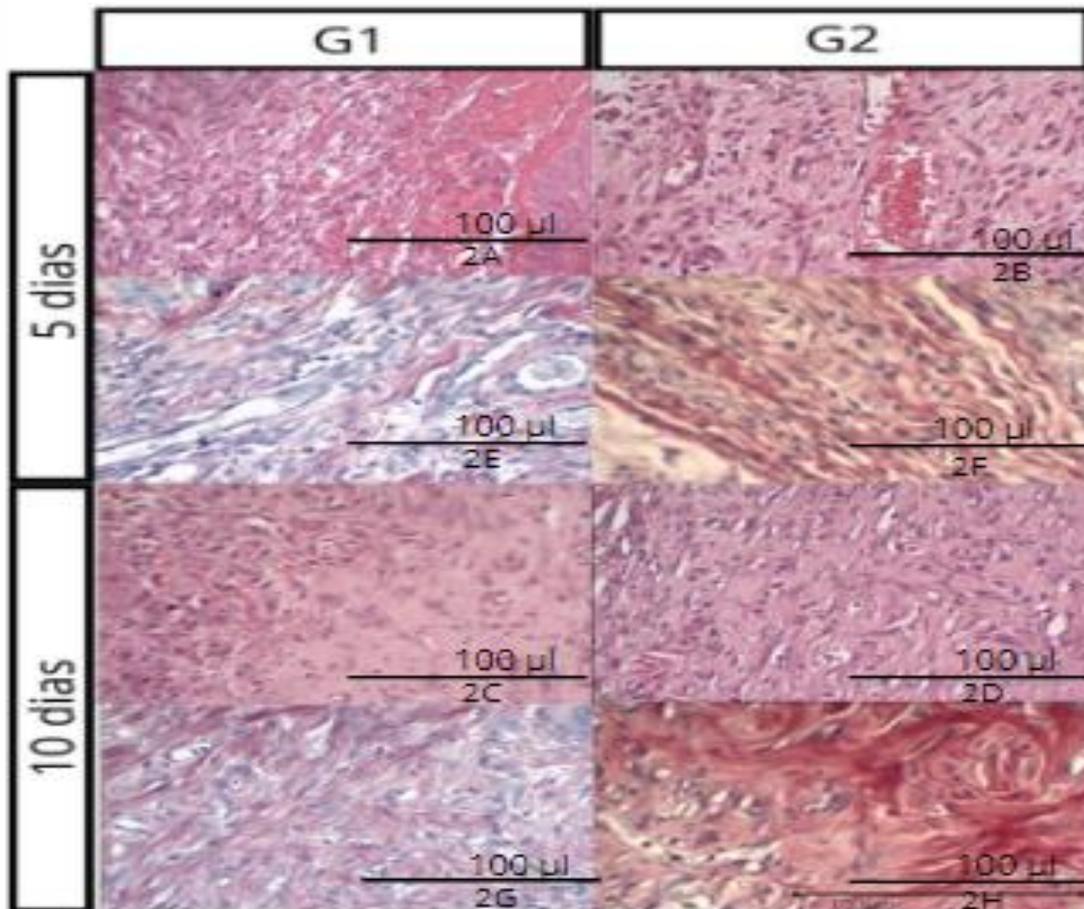


Figura 2 – Grupo controle e grupo óleo ozonizado apresentaram aspectos semelhantes com a presença de infiltrado inflamatório monomorfonuclear, característico de inflamação crônica difusa com intensidade que variou de moderada a intensa e vasos sanguíneos diversos (2A-2B), 5 dias. No dia 10, ambos os grupos apresentaram baixo nível de inflamação e maior área de fibroplasia (2C-2D); Hematoxilina-eosina; X400. Análise do colágeno, o grupo controle apresentou fibras mais delicadas e frouxamente organizadas e o grupo óleo ozonizado apresentou fibras colágenas mais espessas em algumas áreas (2E-2F), 5 dias. Aspectos semelhantes foram observados no 10º dia, pois ambos os grupos apresentaram maior área de fibroplasia (2G-2H), 10 dias. Quanto à análise do colágeno, o grupo controle apresentou fibras mais delicadas e frouxamente organizadas e o grupo óleo ozonizado exibiu fibras de colágeno mais espessas em algumas áreas (2E-2F), 5 dias. Aspectos semelhantes foram observados no 10º dia, pois ambos os grupos apresentaram maior área de fibroplasia (2G-2H), 10 dias, Sirius vermelho X400

A tabela 1 ilustra especificamente a comparação dos dois dias de sacrifício em cada grupo experimental, separadamente. No GC, observou-se que, aos 5 dias, ainda havia persistência de intenso infiltrado inflamatório monomorfonuclear, enquanto aos 10 dias, as células monomorfonucleares ainda eram vistas esparsamente no meio da área de fibroplasia ($p=0,008$). Com relação à organização do colágeno, houve diferença estatisticamente significativa, pois no primeiro período do estudo, os cortes histológicos já apresentavam áreas com fibras delicadas e outras, com feixes mais organizados ($p=0,008$). A variável densidade vascular permaneceu constante nos dois dias de análise ($p>0,05$).

No grupo experimental tratado com óleo ozonizado (GOO), também houve redução significativa na intensidade do grau de inflamação no 10º dia em comparação ao 5º dia ($p=0,016$). Houve diminuição também na porcentagem de células inflamatórias monomorfonucleares ($p>0,05$). Em relação ao colágeno, houve aumento de feixes de colágeno mais espessos e organizados em todos os cortes histológicos corados com Sirius Vermelho. mas essa diferença entre os períodos não foi significativa ($p>0,05$). Aspectos semelhantes foram observados em relação à densidade vascular, que passou de moderada no dia 5 para intensa no período seguinte do estudo, ($p>0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1

Variável	p-valor	5 dias		10 dias	
		GC Mediana (q1-q3)	GOO Mediana (q1-q3)	GC Mediana (q1-q3)	GOO Mediana (q1-q3)
Infiltrado inflamatório	p-valor	3(2,5-3)	3(3-3)	3(3-3) ^A	4(3,5-4)
			0,008*		0,063
Intensidade da inflamação	p-valor	3(2-3)	2(2-2)	1(1-1)	1(1-1)
			0,008*		0,016*
Colágeno	p-valor	1(1-1) ^A	1,5(1-2)	2(2-2,5)	2(2-3)
			0,008*		0,111
Densidade vascular	p-valor	1(1-1,5)	2(2-2,75)	1(1-2) ^A	3(2,5-3) ^B
			0,069		0,190

* $p<0,05$; Mann–Whitney e Kruskal–Wallis foram testados

Tabela 1. Mediana e quartis da análise intragrupo, estratificada por tempo na análise semiquantitativa das variáveis Intensidade da inflamação, densidade de colágeno e vasos sanguíneos. Hematoxilina-eosina e Sirius Red. X400.e colágeno em relação à área total do tecido em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO, 2020).

A Tabela 2 mostra a comparação dos dois dias de sacrifício em cada grupo experimental, separadamente, em relação às variáveis quantitativas de reepitelização e área de colágeno. No GC, houve diminuição da espessura do epitélio neoformado do dia 5 para o dia 10, sem significância estatística ($p>0,05$). Achados semelhantes foram observados no GOO, mas com significância estatística ($p=0,029$). A área representada pelo colágeno aumentou no 10º dia em comparação ao 5º dia em ambos os grupos experimentais ($p>0,05$).

Tabela 2

Variável	GC		GOO	
	5 dias Mediana (q1-q3)	10 dias Mediana (q1-q3)	5 dias Mediana (q1-q3)	10 dias Mediana (q1-q3)
Reepitelização	8395,00 (71505,50- 113171,50)	7240,00 (50091,50- 88170,00)	4934,00 (37071,00- 50172,75)	4112,50 (52922,00- 73954,00)
p-valor	0,1151		0,029	
Área de colágeno	0,60 (14,62- 24,19)	5,71 (18,18- 32,40)	2,58 (21,27- 25,49)	3,71 (18,92- 29,84)
p-valor	(p=1,0)		(p=1,0)	

* $p<0,05$; Mann–Whitney e Kruskal–Wallis foram testados

Tabela 2. Mediana e quartis da análise intragrupo, estratificados por tempo na análise quantitativa das variáveis Infiltrado inflamatório, reepitelização e Área de colágeno. Hematoxilina-eosina e Sirius Vermelho. X400.

Na análise intergrupos, aos 5 dias, foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas variáveis intensidade da inflamação, colágeno e densidade vascular ($p<0,05$); (Tabela 3). A intensidade da inflamação foi menor no GOO, ($p=0,33$) e o colágeno e a densidade vascular apresentaram medianas aumentadas quando comparados ao GC ($p=0,012$ e $p=0,045$ respectivamente). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas variáveis quantitativas reepitelização e área de colágeno entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (Tabela 4). Aos 10 dias, a mediana da densidade vascular aumentou no GOO ($p=0,004$); (Tabela 3). A reepitelização foi menor no GOO, quando comparado ao GC ($p=0,029$).

Tabela 3

Variável	p-valor	5 dias		10 dias	
		GC Mediana (q1-q3)	GOO Mediana (q1-q3)	GC Mediana (q1-q3)	GOO Mediana (q1-q3)
Infiltrado inflamatório	p-valor	3(2,5-3)	3(3-3)	4(4-4) ^h	4(3,5-4)

			0,308		0,043	
Intensidade da inflamação	p-valor	3(2-3) ^A		2(2-2)	1(1-1)	1(1-1)
			0,033			0,068
Colágeno	p-valor	1(1-1) ^A		1,5(1-2)	2(2-2,5)	2(2-3)
			0,012			0,210
Densidade vascular	p-valor	1(1-1,5)		2(2-2,75)	1(1-2) ^A	3(2,5-3) ^B
			0,045			0,004

*p<0,05 ; Mann–Whitney e Kruskal–Wallis foram testados

Tabela 3. Mediana e quartis da análise intergrupos, estratificados por tempo na análise semiquantitativa das variáveis infiltrado inflamatório, intensidade da inflamação, colágeno e densidade vascular. Hematoxilina-eosina e Sirius Vermelho, X400.

Tabela 4

Variável	5 dias		10 dias	
	GC Mediana (q1-q3)	GOO Mediana (q1-q3)	GC Mediana (q1-q3)	GOO Mediana (q1-q3)
Reepitelização	78395,00 (71505,50- 113171,50)	44934,00 (37071,00- 50172,75)	67240,00 (50091,50- 88170,00)	54112,50 (52922,00- 73954,00)
p-valor	0,1151		0,029	
Área de colágeno	20,60 (14,62- 24,19)	21,58 (21,27- 25,49)	25,71 (18,18- 32,40)	23,71 (18,92- 29,84)
p-valor	(p<0,05)		(p<0,05)	

*p<0,05 ; Mann–Whitney e Kruskal–Wallis foram testados

Tabela 4. Análise intergrupos de mediana e quartis, estratificada por tempo em quantitativo das variáveis reepitelização e área de colágeno. Hematoxilina-eosina e Sirius Vermelho.X400

5. DISCUSSÃO

Atualmente, a utilização de terapias biomoduladoras que visam reduzir complicações decorrentes da cicatrização de feridas e promover reparação tecidual eficaz tem despertado o interesse de profissionais de diversas áreas da saúde. Métodos que utilizam a ozonioterapia em suas diferentes formas de apresentação e outros recursos eletroterapêuticos têm sido investigados visando à obtenção de protocolos clínicos padronizados. Tais modalidades terapêuticas podem exercer efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e biomoduladores teciduais que contribuem para a melhoria do padrão de cicatrização de diferentes tipos de feridas (Pietrocola et al., 2018). Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de aplicações tópicas de óleo ozonizado nos primeiros dias de cicatrização de feridas em um modelo

experimental clássico de reparação cutânea em ratos Wistar. Infiltrado inflamatório, intensidade da inflamação, área de colágeno e densidade vascular foram avaliados semiquantitativamente, enquanto os fatores reepitelização e área de colágeno foram avaliados quantitativamente.

Segundo Bocci et al., (2008) a eficiência do ozônio, em suas diferentes formas de apresentação e vias de administração, no contexto da cicatrização de feridas, estaria relacionada à remissão de infecções, modulação da fase inflamatória, estimulação da angiogênese, bem como reações biológicas e enzimáticas que promovem o metabolismo do oxigênio. Tem sido descrito na literatura que a ozonioterapia tem ação terapêutica nos tecidos porque ativa mecanismos de síntese proteica e aumenta a quantidade de ribossomos e a atividade mitocondrial nas células. Essas alterações no nível celular explicam o aumento da atividade funcional e o potencial de regeneração de tecidos e órgãos (Ferreira et al., 2014). Os dados do presente estudo corroboram tal afirmação, pois foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GC e GOO. Especialmente, a intensidade da inflamação foi significativamente menor no GOO quando comparado ao GC nos dias 5 e 10. Esse resultado pode sugerir o efeito anti-inflamatório do óleo ozonizado. Esses resultados também são semelhantes aos relatados por (Xiao et al., 2017), uma vez que os autores conseguiram comprovar que o óleo ozonizado foi capaz de reduzir significativamente o processo inflamatório, além de intensificar a migração dos fibroblastos e a transição epitélio-mesenquimal. Os autores avaliaram as variáveis histológicas a cada dois dias e encontraram diferenças entre os grupos controle e tratado nos dias 3, 5 e 7.

A fase de remodelação é a última etapa da cicatrização da ferida, que resulta em um equilíbrio entre a apoptose de células pré-existentes e a proliferação de novas células. Os fibroblastos sintetizam colágeno tipo I que substitui gradativamente o colágeno tipo III, além de degradar a matriz extracelular por meio da ação de metaloproteinases. Posteriormente, o tecido sofre uma reorientação e reorganização do colágeno e esse processo pode durar de meses a anos (Pai et al., 2014).

No presente estudo, a biossíntese de colágeno foi avaliada de acordo com os critérios estabelecidos por Alvarenga et al., (2020) e a área de colágeno foi medida em cada seção de tecido de acordo com o estudo de Miot et al., (2010). Embora o grupo tratado com óleo ozonizado tenha apresentado aumento de feixes de colágeno espessos e organizados em todas as seções histológicas, apenas a análise semiquantitativa exibiu diferença significativa entre os grupos no dia 5. Nossa análise descritiva do padrão organizacional do colágeno sob a influência do óleo ozonizado foi semelhante à documentada por Hidayat et al., (2021) que descreveram o aumento significativo no número de fibroblastos e espessamento do colágeno em feridas tratadas com óleo de Aloe vera ozonizado em ratos. (Xiao et al., 2021), em seu estudo de caso/controle em ratos Wistar no 3º e 7º dias de cicatrização, também descobriu que o óleo ozonizado estimulou maior biossíntese de colágeno tipo I a partir da terceira semana de tratamento. Considerando a aparente divergência dos resultados quantitativos, acreditamos que esse fato pode estar relacionado à proximidade dos períodos de morte dos animais correspondentes a 5 e 10 dias, respectivamente. Dessa forma, a análise semiquantitativa refletiu melhor os aspectos morfológicos descritos neste estudo. Além disso, a análise semiquantitativa foi realizada em triplicata com alto índice de concordância para minimizar a subjetividade do examinador, enquanto os autores supracitados realizaram apenas a análise quantitativa. Esses dados reforçam a ideia de que os animais que receberam aplicação tópica de óleo ozonizado apresentaram alterações morfológicas em comparação ao grupo controle.

A variável que pareceu ser mais influenciada pelo óleo ozonizado foi a densidade vascular. Em ambos os períodos de análise, observou-se aumento significativo da densidade vascular no grupo OOG quando comparado ao GC. Outros autores relataram esses mesmos resultados positivos, ao utilizar ozônio com óleo como veículo. Krkl¹², 2021, por exemplo, demonstraram que o azeite de oliva ozonizado pode melhorar a neovascularização por meio da indução da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da molécula CD34. Resultados semelhantes foram descritos por Valacchi et al., (2013).

No presente estudo observou-se que a espessura do novo epitélio foi maior no GC quando comparado ao OOG, principalmente no dia 10. Pai et al., (2014) verificaram o uso do óleo de gergelim ozonizado no processo de cicatrização de feridas na pele de ratos. Esses autores encontraram maior contração da ferida e maior espessura da epiderme com a evolução do processo de cicatrização no grupo tratado com óleo ozonizado em comparação ao grupo controle. Essa aparente discrepância pode ter ocorrido devido aos períodos de análise em nosso estudo, pois esse evento tende a se tornar mais evidente em uma fase mais avançada da cicatrização da ferida.

Apesar dos resultados do nosso estudo, o uso terapêutico do óleo ozonizado ainda precisa ser mais investigado. Alguns estudos relataram resultados promissores em humanos. Solovăstru et al., (2018) demonstraram que o óleo de girassol ozonizado combinado com α -bisabolol, promoveu uma redução favorável e progressiva de úlceras venosas em humanos, por meio de suas propriedades antissépticas, imunológicas e oxigenantes. O óleo ozonizado mostrou-se promissor no tratamento/manutenção da saúde gengival (Indurkar et al., 2016), controle de periodontopatógenos (Pietrocola et al., 2018), prevenção de cáries (Nardi et al., 2020) e disfunção progressiva de espécies de *Candida* (Celenza· Et al., 2020). Em um ensaio clínico randomizado com 50 pacientes, Kumar et al., (2016) usaram óleo de oliva ozonizado para tratar diferentes tipos de lesões orais, como ulcerações aftosas, herpes labial, candidíase oral, líquen plano e queilite angular. O óleo foi aplicado duas vezes ao dia até a regressão da lesão, por um período máximo de até 6 meses.

A pequena amostra de animais determinada devido ao cumprimento de princípios éticos, a via de administração do ozônio e a concentração de ozonídeos no óleo utilizado são fatores que devem ser considerados além dos períodos de sacrifício analisados. Os autores do presente estudo sugerem que novos estudos experimentais sejam realizados com uma amostra maior, maior número de períodos de análise e que apresentem cálculos confiáveis da quantidade de ozonídeos entregues ao tecido, a fim de melhor compreender a influência do óleo ozonizado no reparo de feridas. Estudos que também avaliem a toxicidade do ozônio levando em consideração sua

dosagem, tempo de exposição e capacidade antioxidante do tecido exposto foram sugeridos anteriormente por Valacchi et al., (2005). Este aspecto também se torna relevante considerando que quando a dose apropriada de ozônio reage com biomoléculas, pode estimular importantes vias antioxidantes bioquímicas, melhorando assim o reparo tecidual (Bocci et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

Os autores concluíram que o óleo ozonizado tópico foi capaz de modular a Intensidade da Inflamação, bem como a área de colágeno e a densidade vascular no primeiro período do estudo. Aos 10 dias, a variável mais relevante afetada pelo óleo ozonizado foi a densidade vascular.

7. REFERÊNCIAS

1. Xiao W, Tang H, Wu M, Liao Y, Li K, Li L, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biosci Rep.* 2017;37(6):1-11.
2. Aktas S, Ozsunar Y, Ogut S, Gokce S, Tataroglu C. Comparative Efficacy of Red Beetroot Extract and Ozonized Olive Oil on Wound Healing in Rats. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2023;33(12):1385-1389.
3. Oliveira N. Use of ozone through high-frequency device in the treatment of pressure ulcer. *Rev Aten Saúde.* 2011;9(30):41-6.
4. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 2009 Jul;29(4):646-82.

5. Xiao R, Wu M, Bi R. Ozone oil promotes wound healing via increasing miR-21-5p-mediated inhibition of RASA1. *Wound Repair Regen.* 2021;29(3):406-16.
6. Pietrocola G, Ceci M, Preda F, Poggio C, Colombo M. Evaluation of the antibacterial activity of a new ozonized olive oil against oral and periodontal pathogens. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(11):e1103-e8.
7. Ferreira R, Sant'ana P, Rezende D, Greggi A, Zangrando R, Damante CA. Ozone therapy: a critical and current view on its use in periodontics and implant dentistry: literature review. *Innov Implant J Biomater Esthet.* 2014;9(2/3):35-9.
8. Pai A, Gagangras A, Kulkarni S, Majumdar S. Potential of ozonized sesame oil to augment wound healing in rats. *J Indian Pharm Sci.* 2014;76(1):87-92.
9. Alvarenga M, Bittencourt L, Mendes S, Ribeiro T, Lameira A, Monteiro C, Barboza G, Martins D, Lima R. Safety and Effectiveness of Copaiba Oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on Inflammation and Tissue Repair of Oral Wounds in Rats. *Int J Mol Sci.* 2021;21(10):3568.
10. Miot HA, Brianezi G. Digital image analysis techniques for histological quantification of melanin. *An Bras Dermatol.* 2012;87(4):608-11.
11. Hidayat A, Arifin M, Nur M, Muniroh M, Susilaningsih N. Ozonized aloe vera oil effectively increased the number of fibroblasts and collagen thickening in the healing response of full-thickness skin defects. *Int J Inflamm.* 2021:1-8.
12. Krkl C, Yiğit MV, Özercan 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;29(7):322-327.
13. Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Sticozzi C. Ozonized oils as functional dermatological matrices: effects on the wound healing process using SKH1 mice. *Int J Pharm.* 2013;458(1):65-73.
14. Solovăstru LG, Stîncanu A, Ascentii A, Capparé G, Mattana P, Vâță D. Randomized, controlled study of innovative spray formulation containing ozonized oil and α -bisabolol in the topical treatment of chronic venous leg ulcers. 2015;28(9):406-9.
15. Indurkar MS, Verma R. Effect of ozonized oil and chlorhexidine gel on plaque induced gingivitis: A randomized control clinical trial *J Indian Soc Periodontol.* 2016; 20(1):32-5.
16. Nardi GM, Fais S, Casu C, Mazur M, Di Giorgio R, Grassi R, et al. Mouthwash based on ozonized olive oil in caries prevention: a preliminary in-vitro study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(23):9106.

17. Celenza G, Iorio R, Cracchiolo S, Petricca S, Costagliola C, Cinque B, et al. Antimycotic activity of ozonized oil in liposome eye drops against candida spp. *Transl Vis Sci Technol.* 2020 Jul;9(8):1-11.
18. Kumar T, Arora N, Puri G, Aravinda K, Dixit A, Jatti D. Efficacy of ozonized olive oil in the management of oral lesions and conditions: a clinical trial. *Contemp Clin Dent.* 2016;7(1):51-4.