

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MARINA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA COM ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NO
REPARO DE PELE EM RATOS**

[Evaluation of the therapy with sunflower ozonised oil on skin healing in rats]

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2013

MARINA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DA TERAPIA COM ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NO
REPARO DE PELE EM RATOS**

[Evaluation of the therapy with sunflower ozonised oil on skin healing in rats]

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudia Turra Pimpão

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2013

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ivi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	iv
RESUMO GERAL	iv
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 PELE	2
2.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	4
2.3 ESTAFILOCOCOS DA PELE	8
2.4 TRATAMENTO DE FERIDAS.....	10
2.5 OZONIOTERAPIA.....	19
CAPÍTULO 3	
3 AVALIAÇÃO DA OZONIOTERAPIA (ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO) NA CICATRIZAÇÃO DE PELE EM RATOS	20
RESUMO	210
ABSTRACT	21
3.1 INTRODUÇÃO	22
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.2.1 Animais, ambiente e grupos.....	24
3.2.2 Protocolo Anestésico e Procedimento Cirúrgico.....	25
3.2.3 Amostras para cultura e antibiograma.....	26
3.2.4 Avaliação e acompanhamento das lesões.....	27
3.2.5 Avaliação microscópica da pele	28

3.2.6 Análise estatística dos dados	29
3.3 RESULTADOS	30
3.3.1 Resultados microbiológicos	30
3.3.2 Avaliação clínica e resultados macroscópicos	31
3.3.3 Resultados histopatológicos	39
3.4 DISCUSSÃO	42
3.5 CONCLUSÃO.....	426

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSÃO GERAL.....	47
-------------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	48
--------------------------	-----------

ANEXOS	56
---------------------	-----------

Dedico aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço por ter saúde e por tudo ter ocorrido bem até aqui. Creio que existe uma força maior que nos ajuda a seguir em frente, sempre procurando fazer o melhor e dando o nosso melhor para a humanidade. A esta força, energia protetora, meu agradecimento eterno.

Aos animais, seres mais sagrados da Terra, muito obrigada por tornarem os meus dias mais felizes. Tenho certeza de que meu objetivo aqui é tornar a vida de vocês mais fácil e menos sofrida. Em especial, agradeço ao Pingo, Kiko, Elvis, Nino, Cirilo, Snow, Rock, Feijão, Rato, Matilda, Gerusa e Tartaruga.

Às cem ratas que contribuíram sem opção no meu projeto, peço desculpas e prometo fazer que os resultados ali obtidos beneficiem muitos animais. Vocês foram incrivelmente dóceis e tolerantes. Matilda e Gerusa representam todas vocês na minha vida.

Aos meus pais, meus melhores amigos, obrigada pelo apoio, compreensão e por sempre acreditarem no meu potencial, até mesmo nos momentos de desânimo.

Agradeço ao CETAS por ter despertado a minha paixão e o meu amor pelos animais selvagens. Preta, Paulo, seu Belmiro e Grazi, vocês fazem parte de uma fase muito importante da minha vida.

À professora Cláudia que me acompanha desde 2004, quando entrei na faculdade, meus sinceros e profundos agradecimentos por todas as oportunidades oferecidas e por todos os ensinamentos passados. Tenha certeza de que minha formação profissional e pessoal tem uma grande contribuição sua.

Aos meus amigos, agradeço pelos momentos de força, distração, felicidade e conversas. Vocês são a família que eu encontrei. A vida sem vocês não teria a mesma alegria e razão. Em especial à Grazielle V., Grazielle S., Caroline, Ana Carolina F., Patrícia, Paulinho, Zalmir, Marcelo, Ana Caroline G. e Maíra.

Agradeço aos professores que desde o início de nossas vidas contribuem na nossa formação. Em especial à minha professora de Ciências Maria do Belém que desde muito pequena, despertou em mim a vontade de seguir na área da pesquisa, da descoberta e da medicina veterinária.

José Guilherme Rodrigues Filho, obrigada por fornecer todo o material para o projeto e por se mostrar sempre tão disponível a ajudar.

Aos meus estagiários, Amanda e Deivid, agradeço pela dedicação sem limites, ao apoio em todas as horas e pela alegria de viver que irradiam. Amo vocês. Camila, Tiago, Flávia, Flávio, Jéssica, Leonardo e Aline, obrigada pela ajuda durante todo o projeto.

Seu Elias, Elaine, Elvis, Hannelore, Lúcia e Samara, agradeço a boa vontade em sempre me ajudar quando precisei e aos bons momentos de risadas.

E por fim, obrigada a todos que torcem por mim.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

O capítulo 3 trata de futura publicação.

O capítulo 4 trata de uma conclusão geral.

As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

Introdução: A dermatologia é uma das especialidades de maior crescimento na medicina veterinária, pois as doenças da pele constituem a maior parte dos atendimentos clínicos em hospitais veterinários. Apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas na compreensão dos diversos fatores e fenômenos envolvidos com o processo de reparação tissular e da evolução da pesquisa produzir novos recursos e tecnologia, muito há de ser descoberto. Até agora a medicina oficial ainda não reconheceu o uso tópico do ozônio (O₃) e seus derivados na terapia, pois poucos estudos clínicos são publicados em revistas científicas. **Objetivo:** Avaliar o poder cicatrizante do óleo de girassol ozonizado em lesão aguda de pele em ratos. **Método:** Foram utilizados 100 ratos Wistar fêmeas, provenientes do biotério da PUCPR (CEUA/PUCPR n° 650). Foi retirado um fragmento de pele (2x1cm) do dorso dos animais. Os animais foram divididos em 5 grupos para tratamento da lesão cirúrgica: grupo controle 1 – NaCl 0,9%; grupo controle 2 – NaCl 0,9% + óleo de girassol; grupo O₃ (90) – NaCl 0,9% + óleo de girassol ozonizado (90 g/L – pH 5); grupo O₃ (60) – NaCl 0,9% + óleo de girassol ozonizado (60 g/L – pH 6); grupo gentamicina-NaCl 0,9% + pomada de gentamicina (5mg/g). As lesões foram avaliadas diariamente com relação à dor e a cicatrização. Foram coletadas amostras para cultura e antibiograma no primeiro, quarto e sétimo dia de tratamento. A cada sete dias, cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para análise histológica da pele. **Resultados:** A avaliação macroscópica da lesão mostrou uma melhor evolução do processo cicatricial nos animais dos grupos O₃ (90 e 60g/L) (p<0,05) em relação aos demais grupos. O grupo gentamicina apresentou os piores resultados relacionados à cicatrização (p<0,05). 57,3% das amostras foram positivas para *Staphylococcus aureus*, 34,6% para *Staphylococcus pseudintermedius* e 8% para *Staphylococcus sp.* (coagulase negativa). Na avaliação histológica, verificou-se uma melhor colagenização nos animais do grupo O₃ (60) na primeira semana de tratamento (p<0,05) e um maior grau de células mononucleares (p<0,05) no grupo O₃ (90). Piores resultados de colagenização e reepitelização aos 28 dias foram verificados no grupo controle 1 em relação aos demais grupos (p<0,05). **Discussão:** Os animais tratados com óleo de girassol ozonizado 60 e 90 g/L obtiveram uma boa e rápida cicatrização, porém ocorreu uma intensa reação inflamatória nos primeiros dias de tratamento no grupo O₃ (90), provavelmente devido ao pH mais ácido deste grupo. Os animais tratados com a pomada de gentamicina apresentaram um retardo na cicatrização quando comparado com os outros grupos. **Conclusão:** O grupo O₃ (60) apresentou os melhores resultados relacionados à cicatrização de pele em ratos.

Palavras Chave: Dermatologia veterinária; Microbiota da pele; Ozonioterapia veterinária.

ABSTRACT

Introduction: Dermatology is one of the fastest growing specialties in veterinary medicine because skin diseases constitute the majority of victims in veterinary hospitals. Despite major advances seen in recent decades in understanding the various factors and phenomena involved in the process of tissue repair, and development of research to produce new features and technology, there is much to be discovered. So far, the official medicine has not yet recognized the topical use of ozone (O₃) and its derivatives in therapy, because few studies are published in journals. **Objective:** To evaluate the healing power of the ozonized sunflower oil in acute injury in rat skin. **Methods:** 100 female Wistar rats from the vivarium of PUCPR (CEUA/PUCPR n°650) were used. A piece of skin (2x1cm) were removed from the back of the animals. The animals were divided equal into 5 groups (n=20), for the treatment of surgical injury: control group 1 - 0.9% NaCl; control group 2 - NaCl + 0.9 % sunflower oil ; O₃ group (90) - 0.9% NaCl + oil ozonized sunflower (90 g / L - pH 5), group O₃ (60) - 0.9% NaCl + ozonized sunflower oil (60 g / L - pH 6), group gentamicin - NaCl + 0.9 % ointment gentamicin (5 mg / g).The lesions were daily evaluated in relation to pain and healing. Samples were collected for culture and sensitivity in the first, fourth and seventh days of treatment. Every seven days, five animals from each group were sacrificed for histological analysis of the skin. **Results:** The macroscopic lesion showed a better evolution of healing in animals in groups O₃ (90 and 60 g / L) (p < .05) compared to the other groups. The gentamicin group showed the worst results related to healing (p < .05). 57.3 % of the samples were positive for *Staphylococcus aureus*, 34.6% to *Staphylococcus pseudintermedius* and 8% for *Staphylococcus sp.* (coagulase negative). Histological evaluation showed a higher degree of collagen in the first week of treatment on O₃ (60) group (p <0.05) and a higher degree of mononuclear cells (p < .05) in-group O₃ (90). Worst results of collagen and epithelium formation at 28 days were observed in the control group 1 compared to the other groups (p < .05). **Discussion:** Animals treated with ozonized sunflower oil obtained good and rapid healing, but there was an intense inflammatory reaction in the early days of treatment group O₃ (90), probably due to the acidic pH of the ozonated oil. The animals treated with gentamicin ointment had delayed healing, despite the infection was absent. **Conclusion:** The group O₃ (60) showed the best results related to wound healing in rat skin.

Keywords: Veterinary dermatology; Skin microbiota; Veterinary ozonotherapy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sensibilidade antimicrobiana de colônias bacterianas isoladas da pele de ratas mantidas em biotério.	30
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Local de alojamento das ratas durante todo o projeto.	25
Figura 2.	Remoção do fragmento de pele da região dorsal das ratas.	26
Figura 3.	Medição do tamanho da ferida com o auxílio de um paquímetro digital.	28
Figura 4.	Amostras de pele encaminhadas à histopatologia fixadas sobre o papel cartão.	29
Figura 5.	Escore da dor a palpação nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	31
Figura 6.	Evolução do processo de cicatrização das lesões de pele induzida em ratas.	32
Figura 7.	Escore do edema nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	33
Figura 8.	Escore da hemorragia nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	33
Figura 9.	Escore da secreção purulenta nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	34
Figura 10.	Escore do tecido de granulação nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	35
Figura 11.	Escore do tecido de granulação no 14° e 21° dia de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	35
Figura 12.	Escore da reepitelização no 7° dia de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	36
Figura 13.	Escore da reepitelização no 14° e 21° dia de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	37

Figura 14.	Área das lesões no 7° e 14° dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	38
Figura 15.	Área das lesões aos 21 dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	38
Figura 16.	Escore das células mononucleares encontradas após sete dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	39
Figura 17.	Corte histológico de pele apresentando infiltrado inflamatório aos 7 dias de cicatrização. Lâmina A (ozônio 90) com mais mononucleares que a lâmina B (controle 1). Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.	39
Figura 18.	Escores da colagenização após sete (A) e 28 (B) dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	40
Figura 19.	Escores da reepitelização após 28 dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	41
Figura 20.	Escores da proliferação vascular após 21 dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O ₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O ₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).	41

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos casos atendidos em hospitais veterinários refere-se a problemas cutâneos. Isso se deve, em parte, ao fato de que a pele é um dos maiores órgãos do corpo, sofrendo alterações em potencial, a partir da ação de uma variedade de fatores endógenos e exógenos. Além disso, lesões de pele são facilmente observadas pelos proprietários. Dessa maneira, a pele tem uma importância econômica significativa na prática veterinária pelo grande número de casos apresentados para avaliação clínica (Hargis, 1998).

Segundo Cuzzel e Krasner (2003) existem no mercado atualmente aproximadamente 2.500 itens que se destinam ao tratamento de feridas agudas e crônicas, desde a mais simples cobertura, soluções para higienização e antissepsia até os mais complexos tipos de curativos, chamados "curativos inteligentes" ou "bioativos", que interferem, de forma ativa, nas diversas fases do processo cicatricial dos vários tipos de feridas.

Apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas, muito há que ser descoberto na compreensão acerca dos diversos fatores e fenômenos envolvidos com o processo de reparação tissular, o que implica em maior investimento em pesquisas para buscar novos recursos e tecnologias com menor custo e maior eficácia (Mandelbaum et al., 2003).

Atualmente a Ozonioterapia é reconhecida pelo Sistema de Saúde da Alemanha, da Suíça, Áustria, Itália, Cuba, Ucrânia, Rússia, Grécia, Israel, Egito e da Austrália, além de ser praticada em 13 estados dos Estados Unidos. Cuba conta com 39 centros clínicos de ozonioterapia e, na Rússia, é utilizada em todos os hospitais governamentais. Atualmente, aproximadamente 10.000 médicos utilizam este método na Europa (ABOZ, 2013). A atividade fungicida, bactericida e virostática fazem do ozônio um excelente agente de limpeza e desinfecção de feridas, acelerando o processo de cicatrização (Hansler, 2007).

A principal contribuição científica deste estudo será a avaliação do uso do óleo ozonizado no processo de cicatrização de lesões agudas da pele de ratas e uma possível nova opção de tratamento auxiliar na cicatrização.

CAPÍTULO 2

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PELE

A pele é o maior e mais explorável órgão do corpo, sendo fundamental para a manutenção da vida (Conceição e Santos, 2011).

A pele consiste em epiderme, derme, folículos pilosos, anexos digitais, glândulas sebáceas, sudoríparas e outras glândulas. O tecido subcutâneo conecta a epiderme e derme às fáscias e musculaturas subjacentes (Scott e Yager, 1993).

A epiderme é um epitélio estratificado não vascular de espessura variada. Ela pode ser dividida em uma parte seca, dura, superficial, o estrato córneo, e uma parte profunda, úmida, macia, o estrato germinativo (Sisson et al., 1986). O estrato córneo consiste em várias camadas de células queratinizadas achatadas (Hargis, 1998). A função dos queratinócitos é produzir uma barreira de proteção. Elas são produzidas pelas células do estrato germinativo (Merck, 2005). Os queratinócitos estão em constante divisão e migração para as camadas ascendentes da epiderme. Tornam-se preenchidas por queratina, perdem seu núcleo e são liberadas como células córneas mortas (Conceição e Santos, 2011). Entre as células basais do estrato germinativo estão os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (Hargis, 1998). Os melanócitos são responsáveis pela pigmentação da pele. Eles protegem o núcleo dos queratinócitos das radiações ultravioletas. As células de Langerhans servem à mediação da resposta imunológica (Bragulla et al., 2004). Estas células se originam da medula óssea, fagocitam o antígeno e migram para a área paracortical dos linfonodos via vasos linfáticos e estimulam a proliferação de linfócitos T auxiliares (Conceição e Santos, 2011). As células de Merkel têm a função de receptores de contato, os quais

transmitem a informação de um estímulo de contato para as fibras nervosas aferentes (Bragulla et al., 2004).

A derme é constituída por fibras colágenas e elásticas imersas em uma matriz de sustentação formada por glicosaminoglicanos e fornece sustentação aos folículos pilosos, glândulas, vasos e nervos. A camada mais superficial possui fibras colágenas mais delgadas e a camada mais profunda, fibras colágenas mais grosseiras (Hargis, 1998). Todas essas fibras são sintetizadas pelos fibroblastos (Conceição e Santos, 2011). Fibroblastos, mastócitos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e, raramente, eosinófilos e neutrófilos podem ser encontrado na derme normal. A hipoderme ou tecido subcutâneo une a derme a um músculo ou osso subjacente e é formada por tecido adiposo e fibras colágenas e elásticas, responsáveis pela flexibilidade. O tecido adiposo pode servir de isolante contra variações de temperatura e, nos coxins plantares, amortece os choques (Hargis, 1998).

A pele participa na regulação da temperatura e da pressão sanguínea, evita a perda de fluidos e eletrólitos, serve de barreira contra agentes físicos, químicos e microbiológicos, produz vitamina D, é um órgão sensorial e armazena lipídeos, água, vitaminas, carboidratos, proteínas e outros nutrientes (Hargis, Ginn, 2001). Devido à ação combinada das células imunocompetentes presentes na epiderme e derme, a pele pode ser vista como um órgão imunológico (Conceição e Santos, 2011).

A pele é um espelho da saúde e, assim, de grande significado para o veterinário, uma vez que, de cada cinco atendimentos, um se refere à doença de pele (Bragulla et al., 2004). Várias doenças internas e o estado nutricional repercutem na aparência da pele e pelagem (Conceição e Santos, 2011).

A pele é um órgão que apresenta um espectro limitado de respostas à agressão. Por esse motivo, muitas vezes, é necessário obter-se histórico completo, realizar exames cutâneo e sistêmico completos, considerar os padrões de distribuição anatômica e predileções de raças e faixa etária e fazer testes diagnósticos relacionados à enfermidade cutânea ou sistêmica, com o objetivo de determinar a causa da lesão. Biópsias de pele podem ser úteis para chegar a um diagnóstico

definitivo, especialmente se o agente etiológico for encontrado nas amostras colhidas. As alterações microscópicas podem auxiliar no diagnóstico (Hargis, 1998).

As infecções cutâneas ocorrem por ruptura nos mecanismos de defesa da pele, que incluem as barreiras físicas – pelagem, pigmentação, estrato córneo da epiderme, e as barreiras químicas – emulsão de lipídeos, eletrólitos, proteínas, vitaminas, hormônios, transferrina, imunoglobulinas e flora microbiana. Os fatores predisponentes às infecções da pele são fricção, trauma, umidade excessiva, sujeira, pelos aglutinados, irritantes químicos, congelamento e queimadura, irradiação, dieta inadequada e infecção parasitária. As infecções bacterianas de pele são as mais comuns (Hargis, 1998).

2.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Como desencadeante da cicatrização, ocorre a perda tecidual, a partir da qual o fisiologismo volta-se para o reparo de um evento danoso ao organismo (Mandelbaum et al., 2003).

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local. Desde os mais remotos tempos, pesquisam-se incessantemente drogas que acelerem o processo cicatricial normal. A princípio procura-se proteger a ferida de complicações físicas, químicas ou bacteriológicas que possam retardar e até impedir a cicatrização. Normalmente a proteção das feridas, que cicatrizarão por segunda intenção, é feita pelo uso de curativos artificiais que, basicamente, consistem de gaze impregnada com substâncias emolientes ou antissépticas (Araújo et al., 1994).

A cicatrização exige do organismo a ativação, produção e inibição de grande número de componentes moleculares e celulares que, em sequência ordenada e contínua, patrocina todo o processo de restauração tissular (Meneghin e Vattimo, 2005). Existe uma sequência de estágios interdependentes e sobrepostos descritos como inflamação (fase exsudativa), reconstrução (fase proliferativa), epitelização (fase regenerativa) e maturação (Martins et al., 2006).

Os principais fatores que podem favorecer a cicatrização são: a) programas de controle de infecções; b) controle ao estresse, devido a sua interferência negativa no equilíbrio hormonal orgânico; c) uso de substâncias farmacológicas que comprovadamente apresentem favorecimento do processo cicatricial (Martins et al., 2006). A cicatrização depende de vários fatores, como: localização anatômica, tipo da pele, raça, técnica cirúrgica realizada (Mandelbaum et al., 2003).

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Nos organismos unicelulares, está restrita à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais (como os constituintes do citoesqueleto, membranas e paredes celulares) e de moléculas de alta complexidade (como proteínas de elevada complexidade estrutural, RNAs e o DNA). Em organismos superiores, além destes, também ocorre o reparo de tecidos que pode se dar de duas formas: (1) pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou (2) pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda de sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (Balbino et al., 2005).

Após uma lesão, ocorre uma sequência determinada de eventos que levam à correção do defeito e à restauração da superfície da pele (Irion, 2005). As feridas podem ser classificadas como superficiais (epiderme), de espessura parcial (atingem uma parte da derme), de espessura total (atingem toda a espessura da derme) e, mesmo, estender-se ao tecido subcutâneo (Mandelbaum et al., 2003; Irion, 2005).

O processo de cicatrização pode ocorrer de três formas, descritas abaixo, levando-se em consideração os agentes causadores da lesão, a quantidade de tecido perdido e o conteúdo microbiano (Meneghin e Vattimo, 2005).

A cicatrização por primeira intenção, ou fechamento primário, ocorre em feridas cirúrgicas ou feridas com bordos limpos e regulares (suturas) (Irion, 2005).

A cicatrização por segunda intenção ocorre em lesões abertas, grandes, com contaminação microbiana elevada, perda de tecido e bordos irregulares (Irion, 2005), onde não é possível realizar a junção dos bordos e conseqüentemente requer maior tempo de cicatrização (Meneghin e Vattimo, 2005).

O fechamento primário adiado ou cicatrização por terceira intenção ocorre quando há contaminação, perda de tecido ou risco de infecção. A lesão é, então, primeiramente limpa e monitorada, antes de sofrer a sutura (Irion, 2005).

O processo de cicatrização de feridas cutâneas passa por três fases antes que seu reparo completo ocorra (Singer e Clark, 1999; Gogia, 2003; Campos et al. 2007; Mendonça e Coutinho-Neto, 2009).

A fase inflamatória, caracterizada por aumento de temperatura tecidual, edema, dor, rubor e perda de função, tem como função impedir a infecção e é essencial para a cicatrização (Susman e Bates-Jensen, 2007).

A fase inflamatória prepara a ferida para a cicatrização e remove restos celulares e tecidos desvitalizados. Ela dura de 24 a 48 horas e é completada em 2 semanas (Gogia, 2003). Após o trauma, ocorre uma vasoconstrição transitória, para parar a perda sanguínea da área afetada. A norepinefrina é secretada pelos vasos sanguíneos e serotonina pelos mastócitos e plaquetas (Gogia, 2003; Balbino et al, 2005). A parede endotelial dos vasos torna-se aderente e os leucócitos começam a aderir à parede do vaso (marginação neutrofilica). Após a vasoconstrição, ocorre uma vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular devido à liberação de histamina pelos mastócitos e prostaglandinas pela membrana celular danificada. A permeabilidade aumentada leva a extravasamento plasmático para a área lesada. Tampões de fibrina bloqueiam o fluxo linfático, fecham a ferida, localizam a reação inflamatória e evitam a disseminação de infecção. Leucócitos, eritrócitos e plaquetas aderem às paredes endoteliais dilatadas dos vasos sanguíneos. Alterações químicas induzem e atraem essas células a passar pelos capilares dilatados e adentrar o local da ferida (Gogia, 2003). Os leucócitos polimorfonucleares são os primeiros a chegar e iniciar a fagocitose do tecido desvitalizado e substâncias estranhas (Gogia, 2003; Mandelbaum et al., 2003). Eles fagocitam micro-organismos e liberam enzimas e radicais livres (Irion, 2005). Limpam a área da ferida de bactérias e corpos estranhos e depois são fagocitadas por macrófagos (Singer e Clark, 1999). À medida que os leucócitos morrem, eles tornam-se parte do exsudato ou pus. Em seguida, os monócitos, leucócitos mononucleares, migram para o local da lesão e viram

macrófagos (Gogia, 2003). Estes fagocitam bactérias, neutrófilos esgotados, e material desvitalizado de células (Irion, 2005). À medida que os macrófagos ingerem o material, eles excretam peróxido de hidrogênio (controle do crescimento de anaeróbios), ácido ascórbico e ácido láctico. O acúmulo dessa secreção na ferida pode prejudicar a cicatrização, por isso recomenda-se a limpeza do local. Ao final, a fibrinolisa é produzida para auxiliar na dissolução dos coágulos. Os canais linfáticos se abrem para reduzir o edema (Gogia, 2003).

Há evidências de que uma subpopulação de células T reside na pele. Após o reconhecimento antigênico, as células apresentadoras de antígeno (APC, células de Langerhans) apresentam estes antígenos aos linfócitos residentes cutâneos, aumentando a velocidade da resposta imunológica (Conceição e Santos, 2011).

A fase fibroblástica ou proliferativa reconstrói as estruturas danificadas e proporciona força tensil à ferida (Gogia, 2003). Nesta fase ocorre tanto a reepitelização como a formação de tecido de granulação (Irion, 2005). O tecido de granulação é composto de novos capilares e proteínas de tecido conjuntivo (matriz extracelular), fibroblastos e células inflamatórias. Nesta fase, também a integridade vascular é restaurada (Doughty e Sparks-Defriese, 2007). As células epiteliais migram da periferia para dentro da ferida, proliferando-se e situando-se abaixo do coágulo e, posteriormente, abaixo da crosta. Inicialmente há uma camada epitelial fina ao redor da periferia da lesão. A epitelização gradual cobre a superfície da ferida para fechar o defeito epitelial. Enquanto a reepitelização está ocorrendo, o processo de contração é iniciado. Os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos. Estas células se aderem às margens da pele e puxam toda a epiderme para dentro e são responsáveis pela contração da ferida. Substâncias presentes na ferida (ácido láctico, ácido ascórbico e outros cofatores) são indispensáveis para a estimulação de fibroblastos para a síntese de colágeno. O colágeno proporciona resistência e rigidez à ferida. Os fibroblastos sintetizam uma substância chamada pró-colágeno para o espaço extracelular, onde sofrem clivagem e passam a se chamar tropocolágeno. Estes formam espirais com outros tropocolágenos para formar fibrilas de colágeno. As fibrilas de colágeno são compostas de feixes de filamento de colágeno os quais, posteriormente, combinam-se

para formar fibras de colágeno. Os fibroblastos também sintetizam glicosaminoglicanos (GAG) que ocupam os espaços entre as fibras de tecido conjuntivo e proporcionam lubrificação e densidade (Gogia, 2003). A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada (Mandelbaum et al., 2003). As células endoteliais formam brotos na extremidade de capilares intactos e crescem para dentro da área lesada para juntar-se a outros brotos, a fim de formarem uma rede capilar. Juntamente com o colágeno, esta rede capilar forma o tecido de granulação (Gogia, 2003).

A fase de remodelamento ou maturação é a deposição de colágeno de maneira organizada (Campos et al., 2007). Ela modifica a cicatriz imatura para uma madura, a fim de ajustar-se ao tamanho da ferida e também dá forma final à lesão. Inicia-se após 2 a 4 semanas, dependendo do local e tamanho da lesão (Gogia, 2003). Durante esta fase ocorre a produção de um novo colágeno enquanto o antigo é degradado (Doughty e Sparks-Defriese, 2007). A degradação do colágeno é mediada por collagenases específicas e se inicia precocemente já durante o processo inflamatório (Campos et al., 2007). Há uma diminuição da vascularização, dos fibroblastos, o aumento da força tênsil e reorientação das fibras do colágeno (Meneghin e Vattimo, 2005). O remodelamento do colágeno permite que o tecido cicatricial depositado aleatoriamente seja arranjado tanto em orientação linear como lateral. A teoria da indução diz que a cicatriz tenta imitar as características do tecido que está cicatrizando. A teoria da tensão diz que as tensões sofridas durante a cicatrização afetam a área da lesão durante a fase de remodelamento (Gogia, 2003). O volume da cicatriz diminui e a coloração passa de vermelho para o branco pálido, característico do tecido cicatricial (Meneghin e Vattimo, 2005).

2.3 ESTAFILOCOCOS DA PELE

Há cerca de 10^3 - 10^4 micro-organismos/cm² de pele (Muller et al., 2001). A maioria localiza-se superficialmente no estrato córneo porém, algumas se encontram

nos folículos pilosos e atuam como reservatório para substituir a microbiota superficial (Levinson, 2010).

As bactérias gram-positivas, particularmente os cocos, são os micro-organismos isolados com maior frequência de amostras clínicas (Koneman e Winn, 2008).

O *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston e atualmente é um dos micro-organismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (Santos et al., 2007).

De acordo com Quinn et al. (2005) e Levinson (2010) os estafilococos são cocos gram-positivos esféricos, com aproximadamente 1 μ de diâmetro, organizados em agrupamentos irregulares em forma de arranjos semelhantes a cachos de uvas, forma predominante ou encontrados na forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas.

As espécies do gênero *Staphylococcus* estão amplamente distribuídas no mundo todo como comensais na pele de animais e na de humanos. Existem no mínimo 30 espécies de *Staphylococcus*, sendo eles comensais da pele e de membranas mucosas. Algumas dessas espécies podem desempenhar o papel de patógenos oportunistas causando assim infecções (Quinn et al., 2005). Segundo Koneman e Winn (2008), o *Staphylococcus pseudintermedius* é encontrado como parte da microbiota dos animais e, em determinadas situações com condições apropriadas, pode causar infecções em diversos sistemas, incluindo o cutâneo.

A maioria dos estafilococos é anaeróbio facultativo e catalase-positivo. São imóveis, oxidase-negativa e não formam esporos. Os estafilococos coagulase-positivos são os *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus pseudintermedius*. Estafilococos coagulase-negativos são pouco virulentos, porém, ainda assim, é possível encontrar alguns micro-organismos desta mesma classificação que ocasionalmente geram doenças nos animais e no homem (Quinn et al., 2005).

O *Staphylococcus aureus* é considerado o patógeno mais importante entre os estafilococos. Mesmo que este micro-organismo frequentemente constitua parte da microbiota normal, ele pode gerar infecções oportunistas quando encontra fatores predisponentes. Com frequência o *Staphylococcus aureus* é isolado de infecções pós-

cirúrgicas de feridas, que podem atuar como foco para desenvolvimento de infecções sistêmicas (Koneman e Winn, 2008).

Muitas infecções são oportunistas e associadas a trauma, imunossupressão, infecções parasitárias ou fúngicas intercorrentes, condições alérgicas ou distúrbios endócrinos e metabólicos (Quinn et al., 2005).

A implantação da terapia antimicrobiana em 1932 por Gerard Domagk (sulfanilamida) aparentemente ditava o fim das doenças infecciosas. Logo surgiram outros fármacos como a penicilina G (1943) e metilina (1960), sendo que logo os *Staphylococcus* passaram a exibir resistência (Santos et al., 2007).

MRSA ou *Staphylococcus aureus* resistente à metilina são bactérias que expressam o gene *MecA* que pode ser expresso por algumas ou por todas as células de uma determinada população, de modo que a resistência é denominada heteroresistência. O determinante *mecA* de *Staphylococcus aureus* heteroresistentes também é encontrado nos estafilococos coagulase-negativos resistentes à metilina (Koneman e Winn 2008).

2.4 TRATAMENTO DE FERIDAS

Há evidências de que na pré-história eram utilizadas plantas ou seus extratos para o tratamento de feridas. O histórico do tratamento de feridas revela uma enorme preocupação dos povos da antiguidade com as complicações infecciosas. No final do século XIX, com o desenvolvimento da “teoria dos germes” por Pasteur, surge o conceito de que as feridas deveriam ser mantidas secas e tratadas com antibióticos. No final da década de 1950 começaram a surgir os primeiros estudos sobre cicatrização de feridas em ambiente úmido. No Brasil, somente na década de 1990, curativos úmidos começaram a ser usados (Dantas, 2005).

O mecanismo que provocou a lesão, o tempo da ferida, a limpeza e a extensão da lesão são fatores críticos para o plano de tratamento das feridas agudas (Irion, 2005). As infecções de pele podem ser tratadas de forma tópica, sistêmica, cirúrgica ou por uma combinação destas (Muller et al., 2001).

As drogas de aplicação tópica têm numerosos usos indispensáveis para os animais produtores de alimentos e de companhia (Huber, 1992).

Diversos produtos podem ser utilizados topicamente em uma ferida. Os mais utilizados são sabões e antissépticos, antimicrobianos, agentes anti-inflamatórios, anestésicos e analgésicos, enzimas debridantes, colas teciduais e agentes cicatrizantes (Bolton et al., 2003).

Um antisséptico é um agente químico que reduz a população microbiana na pele e em outros tecidos vivos (Heit e Riviere, 2003). Ele é sugerido em situações que requerem a máxima redução da contaminação bacteriana (Huber, 1992). Entretanto, é importante enfatizar que eles não auxiliam na cicatrização e, ao contrário, frequentemente podem prejudicar (Paulino, 2006). Desde a década de 1960, estudos demonstram a toxicidade dos antissépticos às células epiteliais (Ribeiro, 2005).

Dentre os agentes antissépticos e desinfetantes estão: os álcoois (etílico e isopropílico); halógenos e compostos halogenados (cloro, iodo e derivados); aldeídos (formaldeído e glutaraldeído); compostos fenólicos (hexaclorofenol, triclosan, cresol, ácido pícrico); surfactantes (catiônicos e aniônicos); biguanidas (clorexidina e hexamedina); metais pesados (mercúrio, prata e zinco); agentes alcalinos e ácidos; agentes oxidantes (peróxido de hidrogênio, peróxido de benzoíla, permanganato de potássio); nitrofuranos (nitrofurazona e nitrofurantoína) (Huber, 1992; Brito, 2002; Paulino, 2006). A seleção do produto depende das preferências do proprietário e do clínico e da condição da pele do animal (Muller et al., 2001).

Para a maioria das feridas, o cuidado começa com a limpeza para remover tecido necrótico, tecidos desvitalizados ou bactérias e minimizar as chances de infecção (Bolton et al., 2003). A limpeza da ferida com o uso de fluidos/soluções envolve a seleção de uma solução biocompatível e de um artifício mecânico para transferir a solução para o interior da ferida. Pode-se utilizar: soluções salinas, água, solução de papaína, soluções com surfactantes e antissépticos e, para a limpeza, gazes, esponjas ou escovas. A força e o tipo de solução dependerão da condição da ferida (Yamada, 2005).

O debridamento, quando necessário, visa a deixar a ferida em condição adequada para cicatrizar e reduzir o conteúdo bacteriano (Yamada, 2005).

Os curativos têm como principais finalidades: proteção física da ferida, prevenção de contaminação, promoção de debridamento, preenchimento do espaço morto, controle da secreção e retenção da umidade (Irion, 2005). Além disso, devem ser fáceis de remover, confortáveis, fáceis de aplicar e não exigir trocas frequentes (Mandelbaum et al., 2003).

A escolha do tratamento é um grande desafio para o clínico e as decisões precisam ser modificadas ao longo da terapia, baseadas na condição do paciente. Mais de 2000 materiais de curativo estão disponíveis comercialmente (Cuzzel e Krasner, 2003).

Curativos não-oclusivos são adequados para feridas agudas, feridas infectadas e feridas que necessitem de debridamento ou inspeção frequente (Irion, 2005). A manutenção do meio úmido, ao contrário do que se pensava antigamente, favorece e aumenta a velocidade da cicatrização (Bajay et al., 2005).

O tipo básico de curativo envolve compressas de gaze não-aderente, compressas de gaze e rolos de atadura (Irion, 2005). Segundo Mandelbaum et al. (2003) e Bajay et al. (2005) estes são os principais recursos disponíveis no Brasil para auxiliar na cicatrização: ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, antissépticos e degermantes, bandagens para compressão, carvão ativado e prata, filmes semipermeáveis, colágeno biológico, fator de crescimento celular, hidropolímeros, hidrogel, hidrocolóides, enzimas proteolíticas, sulfadiazina de prata, acetato de celulose, protetores cutâneos, membrana permeáveis ao vapor e curativos com gaze. A utilização de insulina, antioxidantes tópicos e substitutos da pele também são utilizados (Sarabahi, 2012).

Alguns agentes físicos têm sido utilizados no auxílio da cicatrização de feridas (Irion, 2005): estimulação elétrica, luz ultravioleta C, oxigênio hiperbárico, radiação infravermelha, ultrassom terapêutico, laser, sanguessugas e larvas.

A estimulação elétrica consiste na aplicação de eletrodos próximos às feridas para a passagem de uma corrente pulsátil de alta voltagem (Irion, 2005). Ela influencia a proliferação e a migração celular, diminui o edema, melhora o fluxo sanguíneo, inibe o crescimento bacteriano e aumenta a fagocitose (Brown, 2003).

A luz ultravioleta C a partir de lâmpadas de quartzo frias tem efeito fungicida e bactericida. A terapia com pressão negativa remove secreções excessivas da ferida, através da geração de um sistema de vácuo (Gogia, 2003).

A utilização do oxigênio hiperbárico consiste em aumentar a disponibilidade de oxigênio para a cicatrização da ferida (Irion, 2005). A hipóxia tecidual causa edema, isquemia e infecção (Gogia, 2003).

A radiação infravermelha desidrata as feridas como um meio de evitar infecções, além de promover um aquecimento (Irion, 2005).

O ultrassom terapêutico promove um aquecimento (Dyson, 2003) e auxilia na cicatrização de lesões de tecidos moles, como estiramentos, entorses e tendinites (Irion, 2005).

O tratamento com laser diminui o edema, a inflamação e aumenta a epitelização. Porém, sua utilização ainda requer mais estudos (Gogia, 2003).

O uso de sanguessugas diminui o risco de trombose de dedos, orelhas e retalhos de pele reimplantados e é direcionado para a resolução da congestão venosa. A larvaterapia promove um desbridamento altamente seletivo de tecido necrótico (Irion, 2005).

Além destes métodos mais tradicionais, alguns fitoterápicos são utilizados no auxílio da cicatrização: babosa, alfazema, arnica, assa-peixe, calêndula, camomila, confrei, erva de são-joão, hamamelis, hissopo, sálvia, aroeira, entre outros.

Os benefícios da fitoterapia são reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Periodicamente, o órgão divulga recomendações para incentivar os países a formularem políticas e regulamentações nacionais referentes à utilização de

medicamentos tradicionais de eficácia comprovada. Desde 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, foi aprovada. Ela constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais (Ministério da Saúde, 2009). No Brasil, o Ministério da Saúde dobrou este ano (2013) o orçamento destinado para projetos de estruturação de Arranjos Produtivos Locais (APLs) sobre plantas medicinais e fitoterápicos (Ministério da Saúde, 2013).

2.5 OZONIOTERAPIA

Atualmente a ozonioterapia é reconhecida pelo Sistema de Saúde da Alemanha, da Suíça, Áustria, Itália, Cuba, Ucrânia, Rússia, Grécia, Israel, Egito e da Austrália, além de ser praticada em 13 estados dos Estados Unidos. Cuba conta com 39 centros clínicos de ozonioterapia e, na Rússia, é utilizada em todos os hospitais governamentais. Atualmente, aproximadamente 10.000 médicos utilizam este método na Europa. No Brasil iniciou-se em 1975 com o médico Heinz Konrad e em 2006 foi fundada a Associação Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ, 2013).

O ozônio é um composto químico que consiste de 3 átomos de oxigênio, uma forma mais energética do oxigênio atmosférico normal (Bocci, 2006). À temperatura ambiente, não tem cor e possui um odor bastante característico. Seu nome vem do grego que significa “cheiro” e foi descoberto pelo químico alemão Christian Friedrich Schonbein em 1840. O precursor do uso do ozônio foi Werner von Siemens, que em 1857 construiu o primeiro tubo de indução para a destruição de micro-organismos. É um dos gases mais importantes na estratosfera do planeta. Em condições normais de temperatura e pressão a espessura da camada de ozônio atinge somente alguns milímetros. Possui uma grande capacidade de absorção de raios UV, funcionando, assim, como um filtro protetor. Seu cheiro pode ser detectado após o aparecimento de raios em dias de chuva. O aumento da poluição faz com que outras substâncias reajam com o oxigênio, impedindo, assim, a formação da molécula de ozônio. Por este motivo a concentração de ozônio é utilizada como um indicador de poluição (Hansler, 2007).

O ozônio é um poderoso germicida empregado em engenharia sanitária para a desinfecção da água de piscinas, na remoção de sabores e odores indesejáveis, em tratamentos estéticos, tratamento de enfermidades dermatológicas em seres humanos e em animais (Aboz, 2013). É uma terapia versátil utilizada em infecções agudas ou crônicas causadas por bactérias, vírus e fungos; doenças isquêmicas; enfermidades ortopédicas; na odontologia; doenças dermatológicas, pulmonares, renais e hematológicas (Bocci, 2004).

A atividade fungicida, bactericida e virostática fazem do ozônio um excelente agente de limpeza e desinfecção de feridas, acelerando o processo de cicatrização. O ozônio libera moléculas ativas de oxigênio ao entrar em contato com a pele, estimulando o metabolismo celular, e ativa os antioxidantes do próprio organismo (Hansler, 2007).

O ozônio é um poderoso oxidante, parecendo um contrassenso propor o seu uso terapêutico (Bocci, 1999). Surpreendentemente, um estresse oxidativo calculado (terapia com ozônio), pode corrigir um desequilíbrio causado por uma injúria oxidativa crônica e excessiva (infecções, desordens vasculares, depressão imunológica, doença degenerativa, patologias ortopédicas) (Bocci, 1999). A recomendação de Bocci (1999) é de que a terapia comece com doses baixas para que o organismo se adapte ao estresse oxidativo gradualmente. Porém esta dose não pode ser muito baixa, pois o ozônio pode ser neutralizado pelos antioxidantes plasmáticos (Sagai e Bocci, 2011).

Embora a atividade desinfetante do ozônio fosse conhecida desde os primeiros testes com sua descoberta, o conhecimento sobre as diversas propriedades farmacológicas são recentes e ainda há muito a ser descoberto (Hansler, 2007).

Na aplicação local do ozônio, usa-se principalmente sua propriedade antimicrobiana e de cicatrização. O seu efeito sistêmico é notável na sua habilidade de ativar o metabolismo celular (auto-hemoterapia). No organismo e no óleo a reação do ozônio ocorre na dupla ligação dos ácidos graxos insaturados (do óleo ou da membrana celular), resultando na formação de vários peróxidos. Esse peróxidos formados conseguem entrar na célula e influenciar o metabolismo (células vermelhas e

células brancas). Eles ativam o sistema de proteção oxidativa (dose dependente). Além disso, assumem uma função de moléculas mensageiras secundárias, regulando os antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glutathione peroxidases, glutathione reductase). Desta forma, o organismo adquire uma maior tolerância ao estresse oxidativo (Hansler, 2007).

O ozônio de uso médico pode ter diferentes propriedades, dependendo da concentração da mistura de ozônio e oxigênio (Caquetti, 2013). É um gás extremamente reativo, reagindo preferencialmente com ácidos graxos insaturados (Bocci, 2006). Diversas formulações trazem óleos vegetais como soluções líquidas que estabilizam o ozônio. Em reação com óleos, o ozônio quebra a dupla ligação entre os átomos de carbono das moléculas lipídicas, resultando em novas moléculas estáveis. Enquanto o tempo de meia-vida do gás é efêmero, na forma de óleo permite o armazenamento por meses, além de dispensar a utilização do gerador (Guinesi et al., 2011).

É interessante que o ozônio, um gás instável, pode ser estabilizado como um ozonido entre a dupla ligação dos ácidos graxos insaturados. Ao entrar em contato com as substâncias do local onde é aplicado, promove uma esterilização e oxigenação, responsáveis por acelerar a cicatrização (Bocci, 2006).

Ainda é uma questão aberta a maneira como os óleos ozonizados agem (Travagli et al., 2010). Sabe-se que a reação entre os óleos e o ozônio produz vários componentes oxigenados como: hidroperóxidos, ozonidos, aldeídos, peróxidos, diperóxidos e poliperóxidos (Almeida et al., 2012), e que há um decréscimo gradual de ácidos graxos insaturados com o aumento gradual da ozonização (Díaz et al., 2006).

Os olhos e pulmões são muito sensíveis ao ozônio, pois eles têm capacidades antioxidantes e neutralizantes mínimas, sendo que, desta forma, o ozônio não deve entrar em contato com estes órgãos. Não deve ser administrado pela via intravenosa diretamente na forma de gás (risco de embolismo), mas pode ser feito pelas seguintes vias parenterais: Intra-arterial (sangue do próprio paciente previamente ozonizado), intramuscular, subcutâneo, intraperitoneal, intrapleural, intravenosa (sangue do próprio

paciente previamente ozonizado), periarticular, intradiscal, intra-lesional, tópica, nasal, auricular, oral, vaginal, uretral, retal, dental (Bocci, 2006).

Na medicina veterinária a maioria dos estudos está voltada para o seu poder bactericida. Pereira et al. (2003) dizem que os efeitos contra micro-organismos da mastite em vacas são satisfatórios quando o ozônio é insuflado diretamente nos ductos galactóforos. A ação é mais rápida e intensa e, além disso, o leite da vaca afetada pela mastite pode ser utilizado imediatamente, o que não é possível com vacas tratadas com antibióticos.

Pereira et al. (2005) evidenciaram em seu estudo que o gás ozônio foi o único que impediu o crescimento bacteriano em laminocultivos com: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*, quando comparado aos gases dióxido de carbono e hélio.

Sanches (2008) obteve sucesso ao utilizar o óleo de girassol ozonizado em uma lesão de pele de *Cavia porcellus* (Porquinho-da-índia).

Não houve diferença da atividade antimicrobiana in vitro entre os óleos de girassol e óleo de oliva ozonizados num estudo realizado por Díaz et al. (2006).

Sechi et al. (2001) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo de girassol ozonizado contra diversas espécies de bactérias. O estudo mostrou que o óleo ozonizado se mostrou eficaz contra todas as bactérias testadas e que a *Mycobacterium* foi a mais susceptível. Diversas bactérias testadas eram resistentes a diversos antibióticos.

De acordo com um experimento de Rodríguez et al. (2007), 40 coelhos foram tratados em óleo ozonizado (Oleozon®), e 40 foram tratados com solução de Lugol. O tempo de cicatrização nos animais tratados com ozônio foi menor.

Díaz et al. (2006) realizaram um estudo com coelhos e porquinhos-da-índia para avaliar a irritabilidade dérmica e oftálmica do óleo de girassol ozonizado. No mesmo estudo verificou-se que o mesmo não irrita a pele e a estrutura ocular, cumprindo um dos requisitos necessários para ser aceito como medicamento.

Kim et al. (2009) avaliaram o efeito tópico do óleo de oliva ozonizado em porquinhos-da-índia. No estudo, constatou-se que o O₃ acelera o reparo de feridas agudas, promovendo uma síntese de colágeno e fibroblasto e promovendo a expressão de alguns fatores de crescimento, dados, estes, verificados pelo uso das técnicas de histologia e imunohistoquímica.

Até hoje, nenhuma resistência bacteriana ao ozônio foi relatada (Sechi et al., 2001). Com o aumento dos custos médicos e resistência antimicrobiana, a ozonioterapia merece atenção porque não produz resistência e é extremamente barata (Bocci, 1999).

Estudos biológicos e clínicos sobre o efeito do O₃ sobre a pele mostram que ele pode ser tanto tóxico, como seguro, dependendo da sua dosagem, tempo de exposição e capacidade antioxidante do tecido exposto a ele. A utilização do O₃ juntamente com um óleo, mantém o ozônio estável por 2 anos a 4°C e, quando aplicado a infecções cutâneas agudas e crônicas, tem um efeito desinfetante e estimula atividades que levam a uma rápida cicatrização (Valacchi et al., 2005).

Rodríguez et al. (2007) verificaram que a úlcera gástrica induzida por etanol, em ratos, foi reduzida em animais previamente tratados com o óleo de girassol ozonizado e isto ocorreu, parcialmente devido à estimulação de algumas enzimas antioxidantes.

Rodrigues et al. (2004) verificaram o poder cicatrizante do óleo de girassol ozonizado *in vivo* e *in vitro*. No estudo *in vitro* contra *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *S. typhimurium* e *Escherichia coli*, o óleo ozonizado teve o efeito mais significativo contra as cepas. No estudo *in vivo*, realizado em ratos com lesões de pele induzidas e inoculadas com *S. aureus*, o óleo ozonizado demonstrou uma maior rapidez no processo de cicatrização.

Em equinos, a terapia endovenosa com O₃ provocou discreta diminuição da glicose e aumentou os valores de fibrinogênio num estudo realizado com 12 equinos (Haddad et al., 2009).

Até agora a medicina oficial ainda não reconheceu o uso tópico de O₃ e derivados na terapia porque não são rentáveis e estudos clínicos não têm sido publicados em revistas científicas: a terapia permaneceu em mãos de “práticos” e os resultados permanecem anedóticos (Travagli et al., 2010). Bocci (2006) listou alguns problemas que levam a técnica da ozonioterapia a não ser reconhecida. Entre eles estão: poucos trabalhos científicos sólidos, empirismo excessivo, falta de geradores de ozônio precisos, muitos charlatões, toxicidade, desinteresse das autoridades públicas, falta de suporte financeiro, grande número de cientistas céticos e uniformes.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA TERAPIA COM ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NO REPARO DE PELE EM RATOS

RESUMO

Introdução: A dermatologia é uma das especialidades de maior crescimento na medicina veterinária, pois as doenças da pele constituem a maior parte dos atendimentos clínicos em hospitais veterinários. Apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas na compreensão dos diversos fatores e fenômenos envolvidos com o processo de reparação tissular e da evolução da pesquisa produzir novos recursos e tecnologia, muito há de ser descoberto. Até agora a medicina oficial ainda não reconheceu o uso tópico do ozônio (O₃) e seus derivados na terapia, pois poucos estudos clínicos são publicados em revistas científicas. **Objetivo:** Avaliar o poder cicatrizante do óleo de girassol ozonizado em lesão aguda de pele em ratos.

Método: Foram utilizados 100 ratos Wistar fêmeas, provenientes do biotério da PUCPR (CEUA/PUCPR n° 650). Foi retirado um fragmento de pele (2x1cm) do dorso dos animais. Os animais foram divididos em 5 grupos para tratamento da lesão cirúrgica: grupo controle 1 – NaCl 0,9%; grupo controle 2 – NaCl 0,9% + óleo de girassol; grupo O₃ (90) – NaCl 0,9% + óleo de girassol ozonizado (90 g/L – pH 5); grupo O₃ (60) - NaCl 0,9% + óleo de girassol ozonizado (60 g/L - pH 6); grupo gentamicina-NaCl 0,9% + pomada de gentamicina (5mg/g). As lesões foram avaliadas diariamente com relação à dor e a cicatrização. Foram coletadas amostras para cultura e antibiograma no primeiro, quarto e sétimo dia de tratamento. A cada sete dias, cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para análise histológica da pele.

Resultados: A avaliação macroscópica da lesão mostrou uma melhor evolução do processo cicatricial nos animais dos grupos O₃ (90 e 60g/L) (p<0,05) em relação aos demais grupos. O grupo gentamicina apresentou os piores resultados relacionados à cicatrização (p<0,05). 57,3% das amostras foram positivas para *Staphylococcus aureus*, 34,6% para *Staphylococcus pseudintermedius* e 8% para *Staphylococcus sp.* (coagulase negativa). Na avaliação histológica, verificou-se uma melhor colagenização nos animais do grupo O₃ (60) na primeira semana de tratamento (p<0,05) e um maior grau de células mononucleares (p<0,05) no grupo O₃ (90). Piores resultados de colagenização e reepitelização aos 28 dias foram verificados no grupo controle 1 em relação aos demais grupos (p<0,05). **Discussão:** Os animais tratados com óleo de girassol ozonizado 60 e 90 g/L obtiveram uma boa e rápida cicatrização, porém ocorreu uma intensa reação inflamatória nos primeiros dias de tratamento no grupo O₃ (90), provavelmente devido ao pH mais ácido deste grupo. Os animais tratados com a pomada de gentamicina apresentaram um retardo na cicatrização quando comparado com os outros grupos. **Conclusão:** O grupo O₃ (60) apresentou os melhores resultados relacionados à cicatrização de pele em ratos.

Palavras Chave: Dermatologia veterinária; microbiota da pele; ozonioterapia veterinária.

EVALUATION OF THE THERAPY WITH SUNFLOWER OZONISED OIL ON SKIN

HEALING IN RATS

ABSTRACT

Introduction: Dermatology is one of the fastest growing specialties in veterinary medicine because skin diseases constitute the majority of victims in veterinary hospitals. Despite major advances seen in recent decades in understanding the various factors and phenomena involved in the process of tissue repair, and development of research to produce new features and technology, there is much to be had discovered. So far, the official medicine has not yet recognized the topical use of ozone (O₃) and its derivatives in therapy, because few studies are have published in journals. **Objective:** To evaluate the healing power of the ozonized sunflower oil in acute injury in rat skin. **Methods:** 100 female Wistar rats from the vivarium of PUCPR (CEUA/PUCPR n°650) were used. A piece of skin (2x1cm) was removed from the back of the animals. The animals were divided equal into 5 groups (n=20), for the treatment of surgical injury: control group 1 - 0.9% NaCl; control group 2 - NaCl + 0.9 % sunflower oil ; O₃ group (90) - 0.9% NaCl + oil ozonized sunflower (90 g / L - pH 5), group O₃ (60) - 0.9% NaCl + ozonized sunflower oil (60 g / L - pH 6), group gentamicin - NaCl + 0.9 % ointment gentamicin (5 mg / g).The lesions were daily evaluated in relation to pain and healing. Samples were collected for culture and sensitivity in the first, fourth and seventh days of treatment. Every seven days, five animals from each group were sacrificed for histological analysis of the skin. **Results:** The macroscopic lesion showed a better evolution of healing in animals in groups O₃ (90 and 60 g/L) (p < 0.05) compared to the other groups. The gentamicin group showed the worst results related to healing (p <0.05). 57.3 % of the samples were positive for *Staphylococcus aureus*, 34.6% to *Staphylococcus pseudintermedius* and 8% for *Staphylococcus sp.* (coagulase negative). Histological evaluation showed a higher degree of collagen in the first week of treatment on O₃ (60) group (p <0.05) and a higher degree of mononuclear cells (p < .05) in-group O₃ (90). Worst results of collagen and epithelium formation at 28 days were observed in the control group 1 compared to the other groups (p < .05). **Discussion:** Animals treated with ozonized sunflower oil obtained good and rapid healing, but there was an intense inflammatory reaction in the early days of treatment group O₃ (90), probably due to the acidic pH of the ozonated oil. The animals treated with gentamicin ointment had delayed healing, despite the infection was absent. **Conclusion:** The group O₃ (60) showed the best results related to wound healing in rat skin.

Keywords: Veterinary dermatology; Skin microbiota; Veterinary ozonotherapy.

3.1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior e mais explorável órgão do corpo, sendo fundamental para a manutenção da vida (Conceição e Santos, 2011). Lesões de pele são facilmente observadas pelos proprietários. Dessa maneira, a pele tem uma importância econômica significativa na prática veterinária pelo grande número de casos apresentados para avaliação clínica (Hargis, 1998).

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local (Araújo et al, 1998). Após uma lesão, ocorre uma sequência determinada de eventos que levam à correção do defeito e à restauração da superfície da pele (Irion, 2005). É um complexo processo sistêmico que exige do organismo a ativação, produção e inibição de grande número de componentes moleculares e celulares que, em sequência ordenada e contínua, favorecem todo o processo de restauração tissular (Meneghin e Vattimo, 2005).

O processo de cicatrização de feridas passa por três fases antes que seu reparo completo ocorra (Singer e Clark, 1999; Gogia, 2003; Campos et al., 2007; Mendonça e Coutinho-Neto, 2009).

A fase inflamatória, caracterizada por aumento de temperatura tecidual, edema, dor, rubor e perda de função, tem como função impedir a infecção e é essencial para a cicatrização (Susman e Bates-Jensen, 2007). A fase fibroblástica ou proliferativa reconstrói as estruturas danificadas e proporciona força tênsil à ferida (Gogia, 2003). Nesta fase ocorre tanto a reepitelização, como a formação de tecido de granulação (Irion, 2005). A fase de remodelamento ou maturação é a deposição de colágeno de maneira organizada (Campos et al., 2007). Ela modifica a cicatriz imatura para uma madura, a fim de ajustar-se ao tamanho da ferida e também dá forma final à lesão (Gogia, 2003).

A ozonioterapia é uma terapia versátil utilizada em infecções agudas ou crônicas causadas por bactérias, vírus e fungos; doenças isquêmicas; enfermidades ortopédicas; na odontologia; doenças dermatológicas, pulmonares, renais e hematológicas (Bocci, 2004).

A atividade fungicida, bactericida e virostática faz do ozônio um excelente agente de limpeza e desinfecção de feridas, acelerando o processo de cicatrização. O ozônio libera moléculas ativas de oxigênio ao entrar em contato com a pele estimulando o metabolismo celular e, ativa os antioxidantes do próprio organismo (Hansler, 2007).

Contudo, o ozônio é um poderoso oxidante, parecendo um contrassenso propor o seu uso terapêutico (Bocci, 1999). Surpreendentemente, um estresse oxidativo calculado (terapia com ozônio) pode corrigir um desequilíbrio causado por uma injúria oxidativa crônica e excessiva (infecções, desordens vasculares, depressão imunológica, doença degenerativa, patologias ortoédicas) (Bocci, 1999).

O ozônio é um composto químico que consiste de 3 átomos de oxigênio, uma forma mais energética do oxigênio atmosférico normal (Bocci, 2006). A ozonioterapia é uma técnica que utiliza o ozônio como agente terapêutico em um grande número de doenças. É uma terapia natural, com poucas contraindicações e efeitos secundários mínimos, se realizada corretamente. A descoberta e o uso médico do ozônio datam de 1840 (Christian Friedrich Schonbein). O precursor do uso do ozônio foi Werner von Siemens, que em 1857 construiu o primeiro tubo de indução para a destruição de micro-organismos (Aboz, 2013).

O ozônio é um gás extremamente reativo, reagindo preferencialmente com ácidos graxos insaturados (Bocci, 2006). Diversas formulações trazem óleos vegetais como soluções líquidas que estabilizam o ozônio. Em reação com óleos, o ozônio quebra a dupla ligação entre os átomos de carbono das moléculas lipídicas, resultando em novas moléculas estáveis. Enquanto o tempo de meia-vida do gás é efêmero, na forma de óleo permite o armazenamento por meses, além de dispensar a utilização do gerador (Guinesi et al., 2011).

É interessante que o ozônio, um gás instável, pode ser estabilizado como um ozonido entre a dupla ligação dos ácidos graxos insaturados e, ao entrar em contato com as substâncias do local onde é aplicado, promove uma esterilização e oxigenação, responsáveis por acelerar a cicatrização (Bocci, 2006).

Ainda é uma questão aberta a maneira como os óleos ozonizados agem (Travagli et al., 2010). Sabe-se que a reação entre os óleos e o ozônio produz vários componentes oxigenados como: hidroperóxidos, ozonidos, aldeídos, peróxidos, diperóxidos e poliperóxidos, e que há um decréscimo gradual de ácidos graxos insaturados com o aumento gradual da ozonização (Díaz et al., 2006). O óleo ozonizado tem sido utilizado no tratamento de feridas crônicas, porém poucos estudos foram feitos em modelos animais em lesões agudas (Kim et al, 2009).

Embora a atividade desinfetante do ozônio fosse conhecida desde os primeiros testes com sua descoberta, o conhecimento sobre as diversas propriedades farmacológicas são recentes e ainda há muito a ser descoberto (Hansler, 2007). Ele é contraindicado nas situações de gravidez, doença autoimune, hipertireoidismo, anemia, intoxicação por álcool, infarto, hemorragia, AVC (acidente vascular cerebral) e miastenia (Saini, 2011).

Este trabalho tem como objetivo avaliar o poder cicatrizante do óleo de girassol ozonizado em lesões de pele induzidas cirurgicamente em ratas através da avaliação macroscópica e microscópica.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais, ambiente e grupos

O estudo foi realizado com 100 ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) provenientes do biotério central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Os animais tinham média de idade de 75 dias e 240 gramas de massa corporal. Foram alojados em gaiolas individuais forradas com cepilho (Figura 1), com fornecimento de água “*ad libitum*” e ração controlada (6 pellets/dia). O local possuía climatização de 21-23°C e iluminação artificial das 7h às 18h. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da PUCPR, tendo como número de protocolo 650.

Os animais foram separados em cinco grupos, de 20 animais cada, para tratamento da lesão cirúrgica durante 28 dias: Grupo controle 1 – a lesão foi limpa

diariamente com NaCl 0,9%; Grupo controle 2 – limpeza diária com NaCl 0,9% e aplicação de óleo de girassol; Grupo O₃ (90) – limpeza diária com NaCl 0,9% e aplicação de óleo de girassol ozonizado (90g de O₃/L de óleo; pH 5); Grupo O₃ (60) - limpeza diária com NaCl 0,9% e aplicação de óleo de girassol ozonizado (60g de O₃/L de óleo; pH 6); Grupo gentamicina - limpeza diária com NaCl 0,9% e aplicação da pomada de gentamicina (5mg/g).

Figura 1 – Local de alojamento das ratas durante todo o projeto.



3.2.2 Protocolo Anestésico e Procedimento Cirúrgico

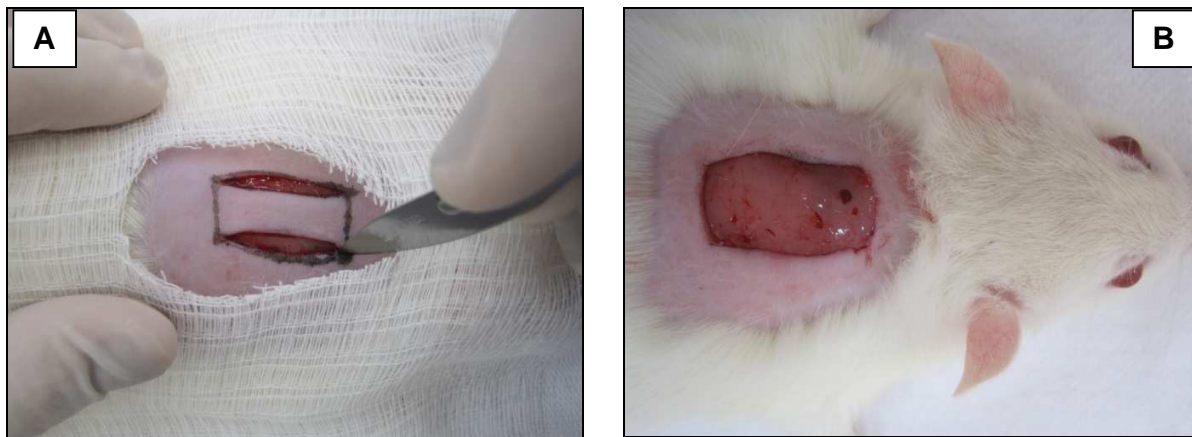
Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas dependências do laboratório de farmacologia veterinária do curso de Medicina Veterinária da PUCPR. O acompanhamento das lesões era realizado mensalmente com somente um grupo, ou seja, 20 animais por vez.

O seguinte protocolo anestésico foi utilizado: cetamina 75 mg/kg e xilazina 10 mg/kg pela via intraperitoneal. A analgesia pós-cirúrgica foi realizada com aplicação de morfina 2,5mg/kg/12h por 2 dias pela via subcutânea.

Os animais foram submetidos à cirurgia para a extração de um fragmento de pele da região dorsal central entre as escápulas, compreendendo 2 cm de comprimento por 1 cm de largura (Figura 2). O procedimento cirúrgico foi realizado em condições estéreis com o seguinte material: pinça anatômica pequena, tesoura e bisturi. Foi

realizada a remoção manual dos pelos da região dorsal torácica das ratas, em seguida foi feita a antissepsia com álcool 70% e o desenho retangular da área de pele a ser removida com auxílio de uma régua e caneta. Após a remoção do fragmento de pele, os animais foram colocados individualmente em suas caixas e o acompanhamento do retorno anestésico realizado no biotério.

Figura 2 – Remoção do fragmento de pele da região dorsal das ratas.



3.2.3 Amostras para cultura e antibiograma

O objetivo da realização da cultura e antibiograma neste estudo foi identificar os micro-organismos presentes na pele dos animais e escolher a pomada antibiótica a ser utilizada em um dos grupos de tratamento.

As amostras utilizadas para cultura e antibiograma foram enviadas ao laboratório de microbiologia da Unidade Hospitalar de Animais de Companhia (UHAC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, e consistiam no *swab* da ferida cirúrgica realizada em cinco animais de cada grupo no primeiro, quarto e sétimo dia após a cirurgia.

Os swabs utilizados para a coleta eram armazenados em tubos de vidro com tampas de rosca esterilizadas e posteriormente identificadas.

Todas as amostras foram inseridas em ágar sangue de carneiro a 5% e em ágar MacConkey. A identificação do micro-organismo isolado foi realizada a partir da observação morfológica da colônia (tamanho, forma, elevação, margem e coloração), leitura da lâmina (microscópio), realização de testes químicos (catalase, oxidase, coagulase) e inserção em ágar manitol. Em seguida, as diferentes colônias bacterianas identificadas eram inoculadas em caldo BHI (meio de cultura líquida) para realização do antibiograma.

Nove discos de antibióticos para culturas de pele foram utilizados: Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC); Cefadroxil (CFD); Cefotaxima (CTX); Enrofloxacina (ENO); Ciprofloxacina (CIP); Clindamicina (CLI); Azitromicina (AZI); Gentamicina (GEN) e Oxacilina (OXA).

3.2.4 Avaliação e acompanhamento das lesões

Os animais foram acompanhados diariamente por para a avaliação dos parâmetros indicadores de dor (apetite, comportamento, postura anti-álgica, dor à palpação) adaptados de Hardie (2002) e de cicatrização (edema, hemorragia, secreção sanguinolenta, secreção purulenta, tecido de granulação, epitelização, cor e tamanho da lesão) em ficha específica (Anexo A), assim como para a limpeza da ferida e aplicação do tratamento respectivo ao grupo e registro fotográfico. Todas as análises macroscópicas e de comportamento foram feitas sempre no mesmo horário e utilizando escalas pré-estabelecidas para dor e cicatrização (Anexo B). Além disso, os animais foram pesados no dia da cirurgia e uma semana após.

Para a medição da ferida foi utilizado um paquímetro digital na escala de milímetros, sendo que o paquímetro era sempre posicionado na região central do comprimento e da largura para averiguar as medidas (Figura 3). As medidas eram feitas antes da limpeza da lesão.

Os registros fotográficos foram realizadas uma vez ao dia antes da limpeza da ferida com a câmera digital Canon PowerShot SD1200IS /10MP / LCD 2.5" posicionada a 20 cm de distância dos animais.

A limpeza da ferida era feita com gaze embebida com 3 mL de solução de cloreto de sódio à 0,9%. A gaze era dobrada e passada três vezes sobre a ferida no sentido craniocaudal. Em seguida era realizada a aplicação de óleo de girassol nos animais do grupo controle 2, de óleo de girassol ozonizado nos animais dos grupos ozônio, ou da pomada no grupo gentamicina. A aplicação dos óleos era feita com o auxílio de uma seringa de 1 mL de maneira que a ferida fosse totalmente encoberta pelo líquido (1 a 3 gotas dependendo do tamanho da lesão) e a pomada era passada com o auxílio de uma haste de algodão.

Figura 3 – Medição do tamanho da ferida com o auxílio de um paquímetro digital.



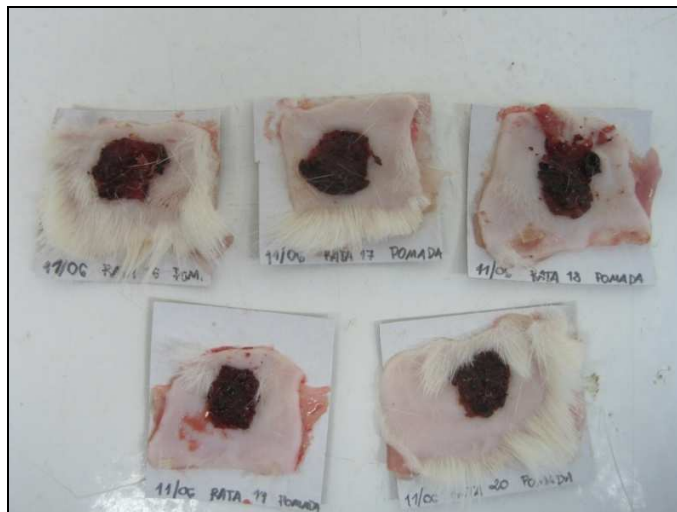
3.2.5 Avaliação microscópica da pele

A cada sete dias, cinco animais de cada grupo eram submetidos à eutanásia com xilazina e cetamina pela via intraperitoneal. O fragmento de pele era retirado com bordas extras de 1 cm além da lesão, fixado em papel cartão para que a amostra de pele se mantivesse distendida, sendo então colocado em solução de formol a 10% por 48 horas (Figura 4). As amostras foram enviadas ao laboratório de histopatologia da PUCPR. Cada fragmento de pele originou três lâminas para microscopia (corte cranial,

corte central e corte caudal da lesão) e foram coradas com Hematoxilina–Eosina e Tricrômico de Mallory.

A análise das amostras de tecido foi realizada pelo patologista sem o conhecimento da identificação dos grupos. Os parâmetros histológicos avaliados foram proliferação vascular, células mononucleares, células polimorfonucleares, colagenização e reepitelização. Os graus atribuídos eram ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3), adaptados de Garros et al. (2006) e Barroso et al. (2010).

Figura 4 – Amostras de pele encaminhadas à histopatologia fixadas sobre o papel cartão.



3.2.6 Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. Os dados são demonstrados em mediana. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* version 5.00 for Windows, San Diego Califórnia, EUA.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Resultados microbiológicos

Houve crescimento bacteriano em ágar sangue de todas as amostras de pele e nenhum crescimento em ágar MacConkey. As colônias eram circulares e planas, possuíam cor branco, cinza ou amarela, independente da espécie de estafilococos, e apresentaram as mesmas características microscópicas: cocos gram-positivos, arredondados, tamanho médio e em vários tipos de disposição, como isoladas, aos pares, em tríades, tétrades ou em cachos.

Destas amostras 57,3% foram positivas para *Staphylococcus aureus*, 34,6% para *Staphylococcus pseudintermedius* e 8% para *Staphylococcus sp.* (coagulase negativa).

Os antibióticos que obtiveram um melhor resultado, contra os micro-organismos presentes na pele, foram a gentamicina, enrofloxacina e ciprofloxacina (Tabela 1).

Diante deste resultado, optou-se pela manipulação da pomada de gentamicina, pela maior facilidade de obtenção do produto e menor custo.

Tabela 1 - Sensibilidade antimicrobiana de colônias bacterianas isoladas da pele de ratas mantidas em biotério.

	AMC	CFD	CTX	ENO	CIP	CLI	AZI	GEN	OXA
S	92,5%	93,75%	93,75%	98,75%	98,75%	86,25%	83,75%	98,75%	85%
PS	5%	2,5%	1,25%	-	-	6,25%	8,75%	-	3,75%
R	2,5%	3,75%	5%	1,25%	1,25%	7,5%	7,5%	1,25%	11,25%

S (sensível); PS (parcialmente sensível); R (resistente). Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC); Cefadroxil (CFD); Cefotaxima (CTX); Enrofloxacina (ENO); Ciprofloxacina (CIP); Clindamicina (CLI); Azitromicina (AZI); Gentamicina (GEN) e Oxacilina (OXA).

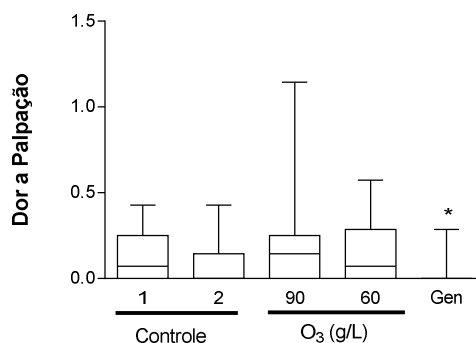
3.3.2 Avaliação clínica e resultados macroscópicos

Na avaliação macroscópica todos os grupos apresentaram processo de cicatrização completo aos 28 dias de tratamento. Houve uma perda de apetite nos dois primeiros dias após a cirurgia em alguns animais, porém todos os animais mantiveram o peso inicial ou engordaram. A formação da secreção purulenta, indicativa de infecção ocorreu a partir do terceiro dia. Além disso, pode-se observar que os animais do grupo O₃ (90) apresentaram uma cicatrização mais acelerada nos sete primeiros dias e que não houve alteração no padrão de cor das lesões em todos os grupos.

Os animais do grupo O₃ (90) e gentamicina, nos sete primeiros dias, apresentaram dermatite por lambedura ao redor da lesão (Figura 6), sendo evidente o incômodo destes animais logo após a aplicação do óleo ozonizado ou da pomada de gentamicina.

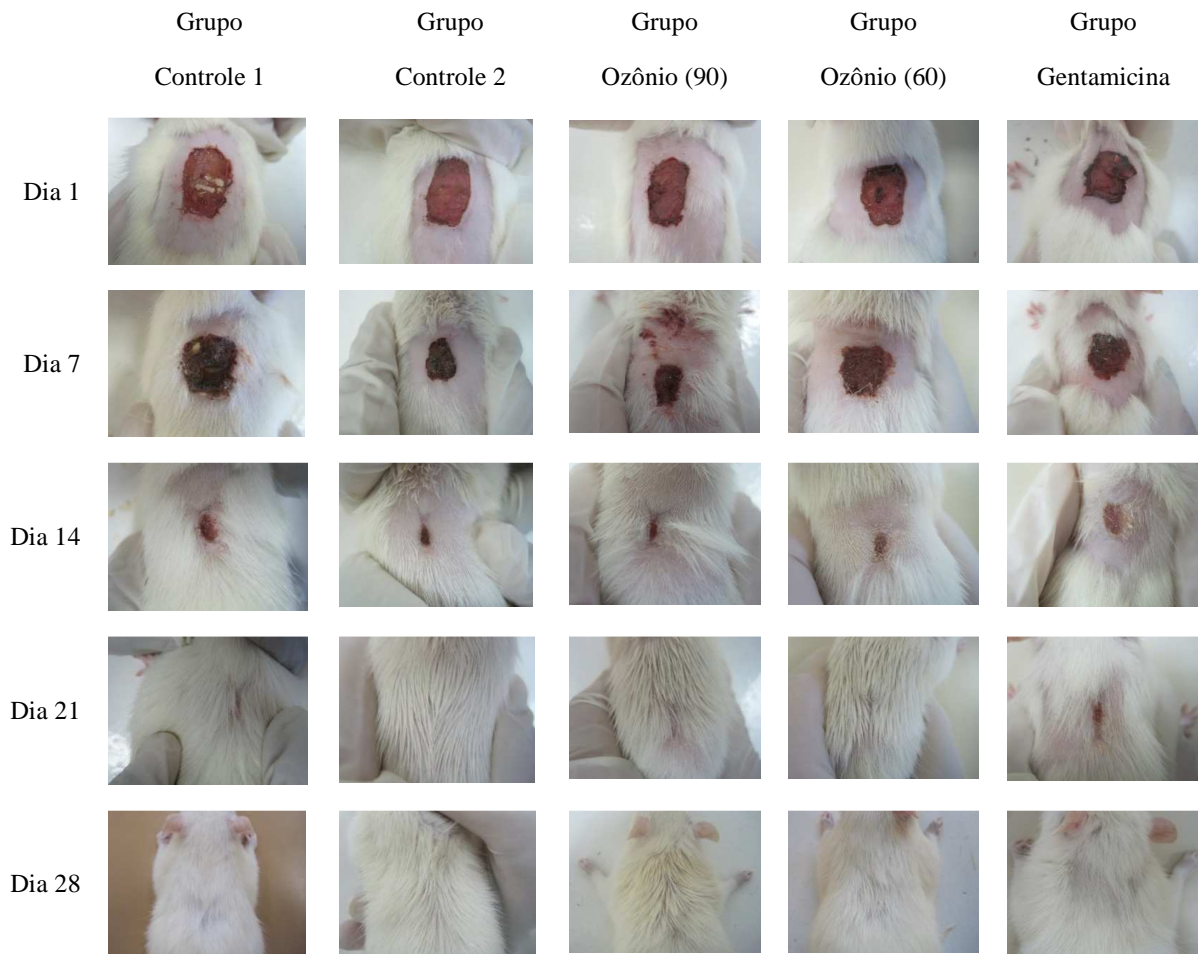
Nos parâmetros relacionados à dor, houve maior sensibilidade dolorosa à palpação, na primeira semana, nos animais do grupo O₃ (90) em relação ao grupo gentamicina ($p < 0,05$) (Figura 5).

Figura 5 – Escore da dor a palpação nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



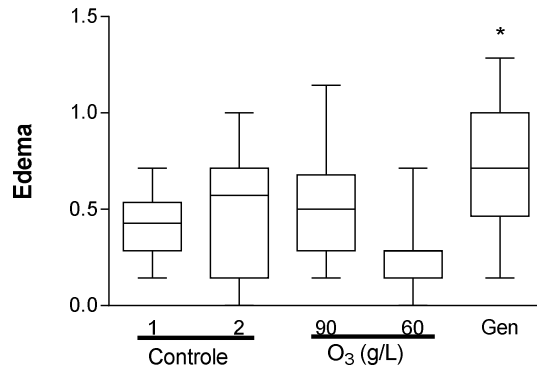
* $p < 0,05$ em relação ao grupo 90 g/L de O₃. As linhas indicam as medianas.

Figura 6 – Evolução do processo de cicatrização das lesões de pele induzida em ratas.



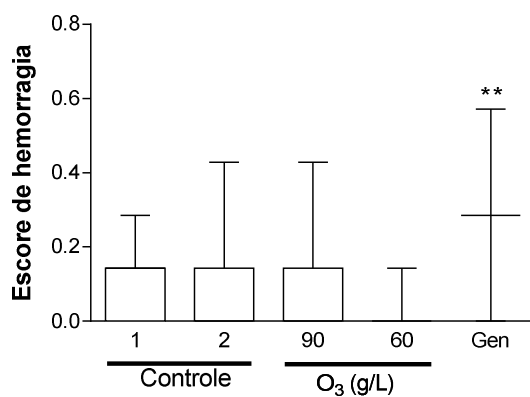
Os animais do grupo gentamicina apresentaram maior edema e hemorragia nos primeiros sete dias de tratamento em relação aos demais grupos ($p < 0,01$) (Figura 7 e 8). Porém, apresentaram menor quantidade de secreção purulenta em relação aos demais grupos ($p < 0,001$) (Figura 9) e tecido de granulação em relação aos grupos O_3 (60) e controle 2 ($p < 0,01$) (Figura 10).

Figura 7 – Escore do edema nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



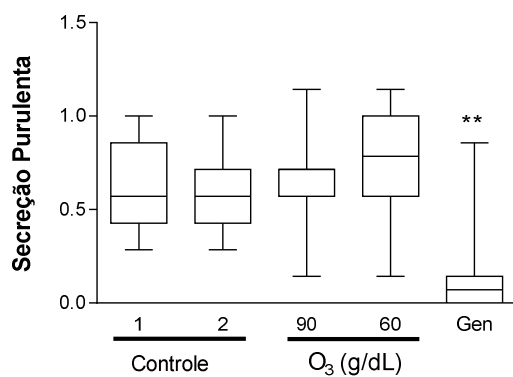
*p<0,01 em relação ao controle. As linhas indicam as medianas.

Figura 8 – Escore da hemorragia nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



** p <0,01 em relação aos demais grupos. As linhas indicam as medianas.

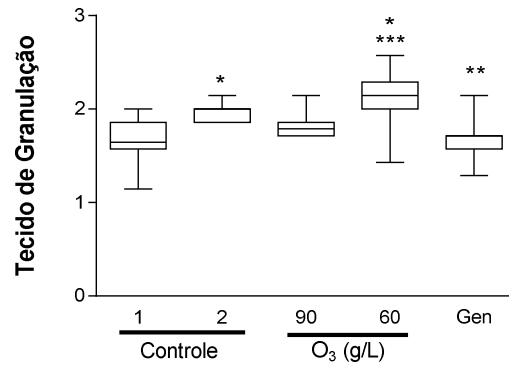
Figura 9 – Escore da secreção purulenta nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



** p <0,001 em relação ao controle (1 e 2) e O₃ (90 e 60g/L). As linhas indicam as medianas.

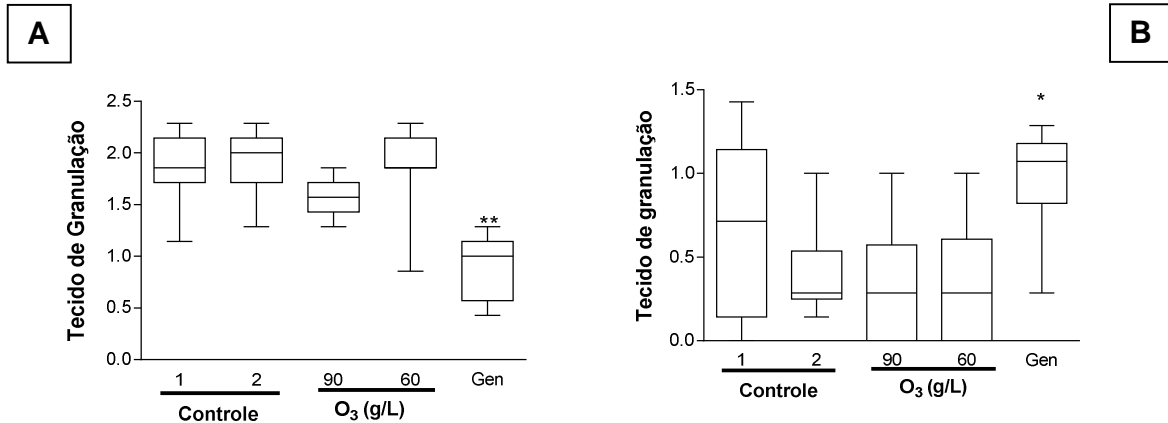
Os animais do grupo O₃ (60) apresentaram maior grau de tecido de granulação nos sete primeiros dias de cicatrização em relação ao grupo O₃ (90) e controle 1 (p<0,01) (Figura 10). Aos 14 dias o grupo gentamicina apresentou os menores escores de tecido de granulação em relação aos grupos controle 1, controle 2 e O₃ (60) (p<0,001) e aos 21 dias os maiores em relação aos grupos O₃ (60 e 90) (p<0,05) (Figura 11).

Figura 10 – Escore do tecido de granulação nos sete primeiros dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



*** p < 0.01 em relação grupo 90 g/L de O₃;
 ** p < 0.01 em relação aos grupos Controle 2 e 60 g/L de O₃;
 * p < 0,01 em relação ao grupo Controle 1.
 As linhas indicam as medianas.

Figura 11 – Escore do tecido de granulação no 14° (A) e 21°(B) dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).

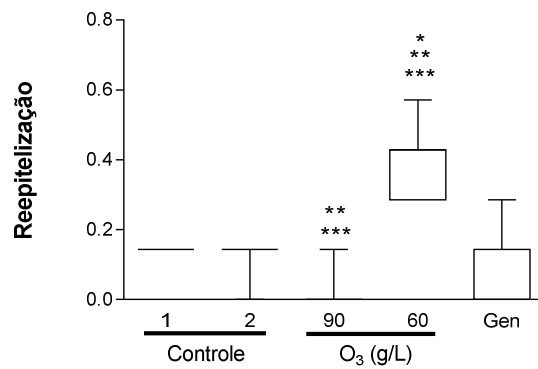


** p < 0.001 em relação aos grupos controle 1, 2 e 60 g/L O₃.
 As linhas indicam as medianas.

* p < 0,05 em relação aos grupos 60 e 90 g/L de O₃.
 As linhas indicam as medianas.

Houve diferença na reepitelização. No 7º dia os grupos que receberam o tratamento com o óleo ozonizado obtiveram os melhores resultados (Figura 12). A partir do 14º dia, melhores resultados foram observados no grupo O₃ (60) em relação aos grupos controle 1, controle 2 e gentamicina (Figura 13). No 21º dia melhores resultados na reepitelização foram observados nos grupos O₃ (60 e 90) e controle 2 em relação ao controle 1 (p<0,01) (Figura 13).

Figura 12 – Escore da reepitelização no 7º dia de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).

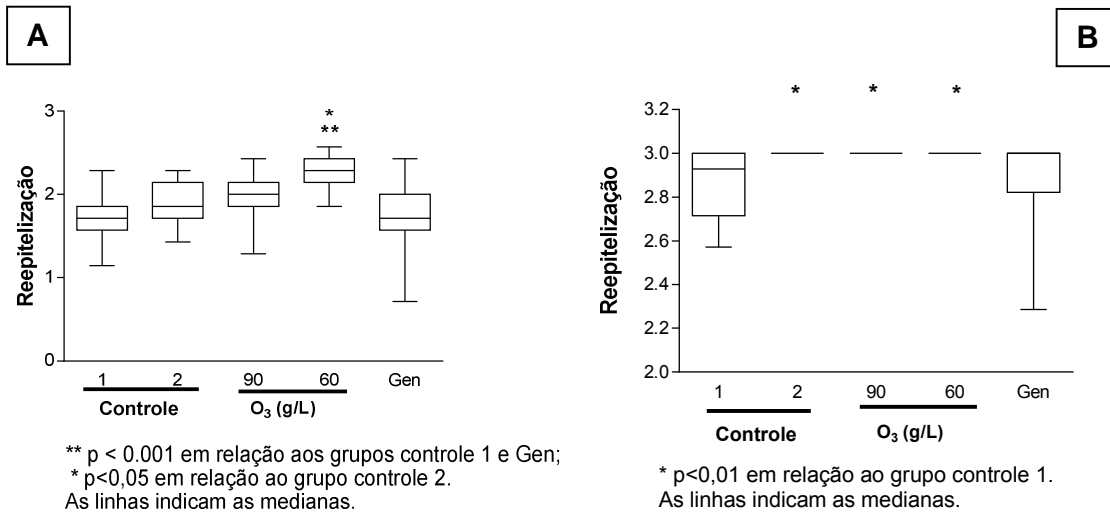


*** p < 0,001 em relação ao grupo Controle 1;

** p < 0,001 em relação ao grupo Controle 2;

* p < 0,001 em relação aos grupos 90 g/L de O₃ e Gen.

Figura 13 – Escore da reepitelização no 14^o(A) e 21^o(B) dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



A área da lesão mostrou maior redução na primeira semana no grupo O₃ (90) em relação aos grupos controle 1 e controle 2 (p<0,01) (Figura 14). O grupo gentamicina apresentou os menores valores de redução da área desde a primeira semana (Figura 14 e 15). Aos 28 dias todos os grupos apresentaram completa cicatrização.

Figura 14 – Área das lesões no 7º e 14º dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L),  leo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).

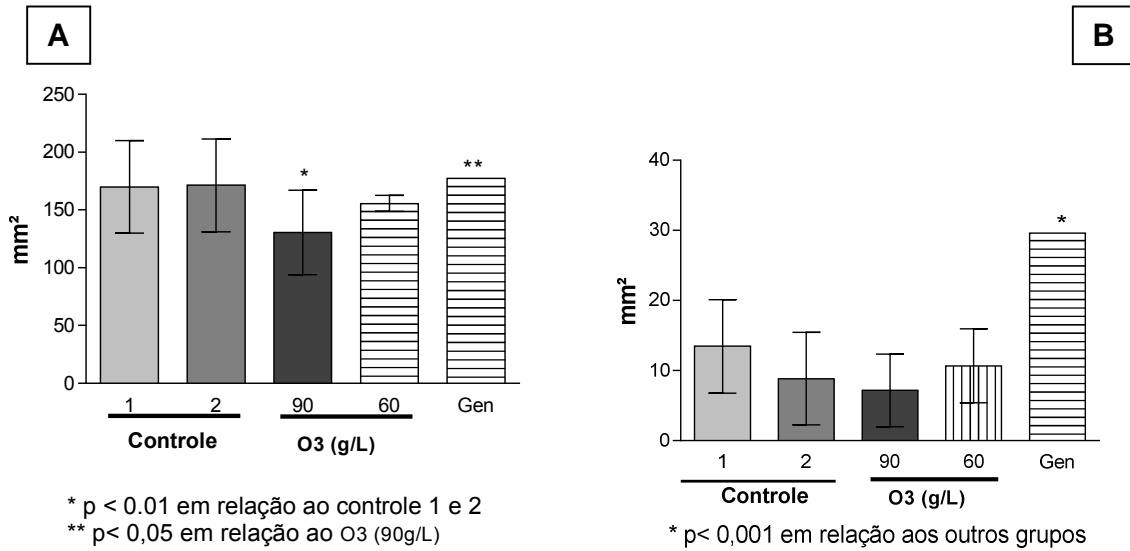
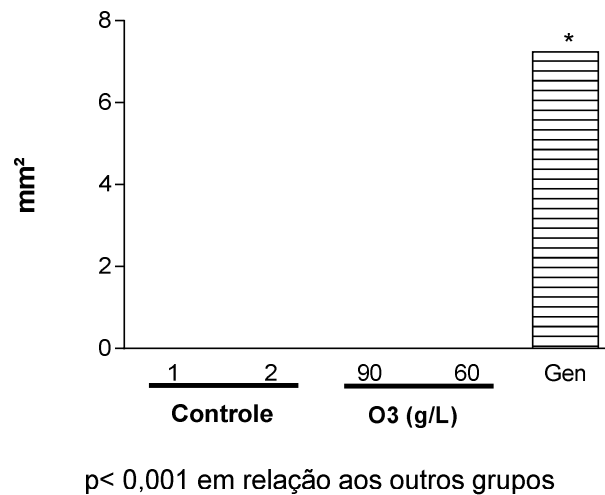


Figura 15 –  rea das lesões aos 21 dias de cicatriza o em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L),  leo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).

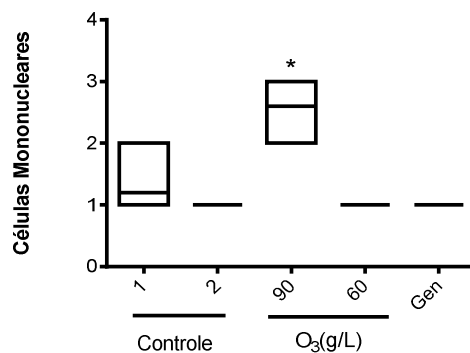


3.3.3 Resultados Histopatológico

Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os grupos, quando foi considerada a proliferação fibroblástica e células polimorfonucleares.

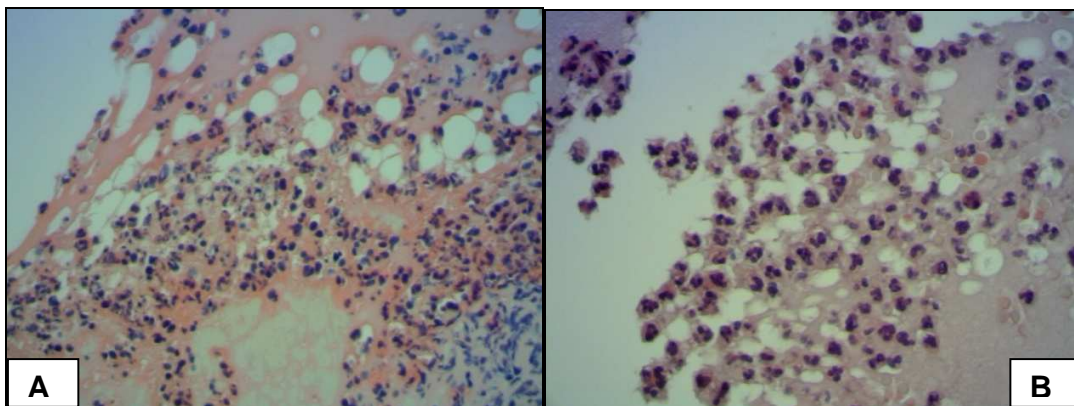
Em relação às células mononucleares notou-se uma maior quantidade aos sete primeiros dias de cicatrização no grupo O_3 (90) em relação aos demais grupos ($p<0,001$) (Figura 16 e 17).

Figura 16 – Escore das células mononucleares encontradas após sete dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O_3 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O_3 60g/L) e gentamicina (Gen).



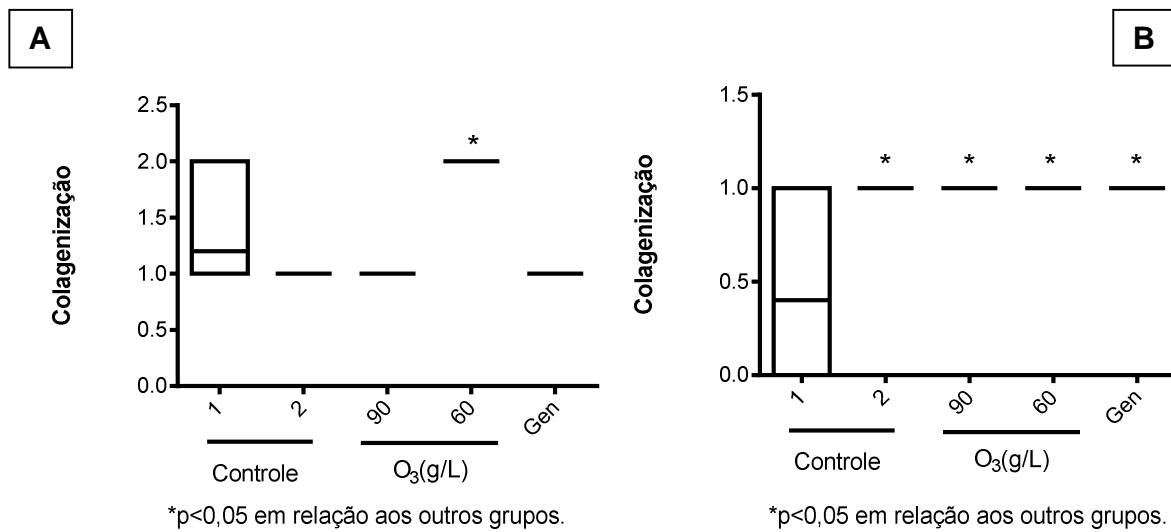
$p<0,001$ em relação aos outros grupos estudados.

Figura 17 - Corte histológico de pele apresentando infiltrado inflamatório aos 7 dias de cicatrização. Lâmina A (ozônio 90) com mais mononucleares que a lâmina B (controle 1). Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



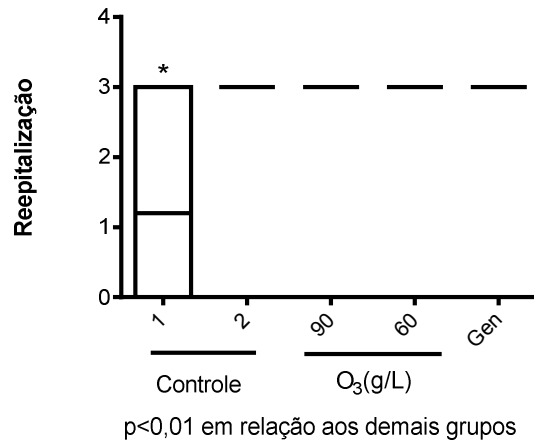
Maiores valores de colágeno foram constatados no 7° dia de cicatrização no grupo O₃ (60) em relação aos demais grupos (p<0,05), e menores no 28° dia de cicatrização no grupo controle 1 em relação aos demais grupos (p<0,05) (Figura 18).

Figura 18 – Escores da colagenização após sete (A) e 28 (B) dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



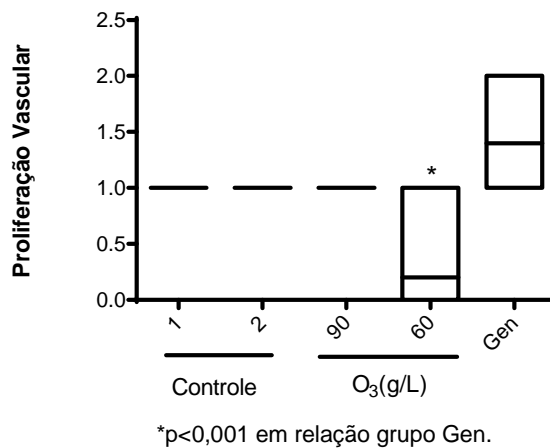
Constatou-se um menor grau de reepitelização nos animais do grupo controle 1 no 28° dia de cicatrização em relação aos demais grupos (p<0,01) (Figura 19).

Figura 19 – Escores da reepitelização após 28 dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



Observou-se uma maior proliferação vascular aos 21 dias de cicatrização no grupo gentamicina em relação ao grupo O₃ (60) (p<0,001) (Figura 20).

Figura 20 – Escores da proliferação vascular após 21 dias de cicatrização em ratos Wistar tratados com NaCl 0,9% (controle 1), óleo de girassol (controle 2), óleo de girassol ozonizado 90 g/L (O₃ 90g/L), óleo de girassol ozonizado 60 g/L (O₃ 60g/L) e gentamicina (Gen).



3.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho optou-se pela utilização do óleo ozonizado pela facilidade de aplicação do produto, por dispensar a necessidade de se ter um gerador de ozônio, por ser estável nesta associação e pelo baixo custo. Na sua condição gasosa, o ozônio possui um tempo de meia-vida de 55 minutos e na água de 10 horas (Hansler, 2007). No óleo, mantém-se estável por 2 anos a 4°C (Valacchi et al., 2005).

Os dados analisados em relação à cicatrização estão de acordo com a revisão realizada por Lima et al. (2012). A microscopia de luz demonstrou importância na avaliação dos resultados, mesmo que, muitas vezes, sua subjetividade seja questionada. Quando realizada por patologistas experientes e imparciais, geram dados importantes de comparação (Campos et al., 2007).

A lesão teve um aumento de tamanho no primeiro dia após a cirurgia. Rezaie et al., (2011) também observaram este dado em seu trabalho. No primeiro dia após a cirurgia ainda não havia a formação da crosta que auxilia na aproximação dos bordos de pele, o que provavelmente contribuiu para o aumento da lesão.

A lesão cirúrgica (remoção do fragmento de pele) permitiu a entrada de patógenos, gerando uma infecção. Os estafilococos isolados da pele dos animais neste estudo estão de acordo com Quinn et al. (2005) e Levinson (2010): cocos gram-positivos esféricos, com aproximadamente 1 μ de diâmetro, organizados em agrupamentos irregulares, em forma de arranjos semelhantes a cachos de uvas, forma predominante, ou encontrados na forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas.

As piодermites têm como principal agente o *Staphylococcus coagulase-positiva* (Hargis, 1998). Mesmo que estes micro-organismos frequentemente constituam parte da microbiota normal, sabe-se que podem gerar infecções oportunistas, quando encontram fatores predisponentes (Koneman, 2008). *Staphylococcus aureus* é isolado de animais que tem contato próximo com pessoas (Ihrke, 2006), além disso, é o agente predominante na pele de ratos (Muller et al., 2001). Neste estudo, a maior parte das amostras teve o *Staphylococcus aureus* isolado. As ratas eram manipuladas diariamente por pessoas para a limpeza das caixas e análises do processo de cicatrização, podendo assim também gerar a predominância deste agente.

Rubin et al. (2011) realizaram um estudo de susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius* isolados de diversas espécies animais, no qual constataram que a maior parte destes micro-organismos eram sensíveis à maioria dos antibióticos testados, sendo que, no estudo os animais das quais as amostras foram obtidas, passavam por um primeiro atendimento no hospital. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho, fato este que pode ser atribuído à ausência de tratamentos prévios dos animais do estudo aos antibióticos testados. Os estafilococos são raramente resistentes à cefalexina, cefadroxil, amoxicilina+ácido clavulânico, oxacilina, gentamicina, tobramicina, enrofloxacin, mupirocina, bacitracina e polimixina B. Quando não é possível a realização de cultura/antibiograma e desconfia-se de infecção por este agente, um destes antibióticos pode ser escolhido (Cox, 2006).

Vale ressaltar que já foi isolado de ratos selvagens o *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (MRSP). Himsforth et al. (2013) isolaram este agente resistente da narina e orofaringe em 2,1% dos ratos testados (n=237).

Foi constatada maior dor à palpação nos animais no grupo O₃ (90) e um maior edema e hemorragia no grupo gentamicina. Estes animais apresentaram uma dermatite por lambadura mais intensa, demonstrando certo desconforto logo após a aplicação do produto. O O₃ (90) apresentava um pH próximo de 5, e uma maior concentração de ozônio, o que pode ter contribuído para o quadro descrito anteriormente. Díaz et al. (2006) constataram que, quanto maior a ozonização do óleo, menor o valor do pH, fato este comprovado no óleo ozonizado com maior concentração e pH mais ácido. Hiporexia foi observada nos dois primeiros dias em todos os grupos e segundo Hardie (2002), o comportamento patente de dor é raro em roedores, mas um consumo alimentar diminuído pode ser observado.

Nas análises macroscópicas realizadas, observou-se um retardo na cicatrização no grupo gentamicina (menor formação de tecido de granulação, mais edema e hemorragia e mais tempo para completo fechamento da lesão). Além disso, uma maior proliferação vascular foi constatada aos 21 dias. A utilização de antissépticos e antibióticos já é conhecida por sua toxicidade celular (Sarabahi, 2012). Trindade et al.

(2010) constataram retardo no aparecimento de miofibroblastos em lesões tratadas com metronidazol. Quando empregados em concentrações adequadas apresentam ação citotóxica e, quando em concentrações muito baixas, podem provocar o aparecimento de resistência e ainda dermatite de contato (Mandelbaum et al., 2003; McHugh et al., 2011).

Apesar dos resultados ruins no processo cicatricial, o grupo gentamicina apresentou uma menor quantidade de secreção purulenta significativa em relação aos demais grupos. A contaminação bacteriana é um processo que retarda a cicatrização, além de trazer maiores custos em tratamento (White et al., 2001). Porém, a resistência antimicrobiana a diversos antibióticos é um problema na medicina veterinária e na medicina humana e constitui um problema de saúde pública (Beco et al., 2013). Relatos desta resistência em animais são descritos há tempos (Hariharan e Barnum, 1974). Além disso, antibióticos tópicos podem causar reações de hipersensibilidade e super-infecções por selecionar bactérias resistentes (White et al., 2001). Desta forma, a sua utilização deve ser feita com precaução.

A contaminação bacteriana baseada na secreção purulenta não foi diferente entre os animais tratados somente com a solução fisiológica, o óleo de girassol e o óleo de girassol ozonizado. Apesar disso, sabe-se do poder bactericida destes componentes. Até hoje nenhuma resistência antimicrobiana ao ozônio foi relatada (Bocci, 1999; Sechi et al., 2001). A atividade fungicida, bactericida e virostática fazem do ozônio um excelente agente de limpeza e desinfecção de feridas (Hansler, 2007). Ele promove uma oxidação da parede celular e inativa esses micro-organismos (Elvis e Ekta, 2011). Pereira et al. (2005) evidenciaram, em seu estudo, que o gás ozônio foi o único que impediu o crescimento bacteriano em laminocultivos com: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*, quando comparado aos gases dióxido de carbono e hélio. Sechi et al. (2001) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo de girassol ozonizado contra diversas espécies de bactérias. O estudo mostrou que o óleo ozonizado se mostrou eficaz contra todas as bactérias testadas e que a *Mycobacteria* foi a mais susceptível. Diversas bactérias testadas eram resistentes a diversos antibióticos. Sabe-se também que os ácidos graxos possuem um efeito

inibidor no crescimento bacteriano (Greenway e Dyke, 1979; Mandelbaum et al., 2003). Manhezi et al. (2008) verificaram, em sua revisão, que os ácidos graxos possui um dos seus usos mais comuns no tratamento de feridas abertas, porém estudos clínicos consistentes são escassos.

A limpeza da ferida foi realizada com gaze embebida com solução fisiológica em todos os grupos antes da aplicação do medicamento. White et al. (2001) e Mandelbaum et al. (2003) recomendam a utilização do soro ou de água corrente para a limpeza de feridas. O acúmulo de secreção na ferida pode prejudicar a cicatrização (Gogia, 2003). Este processo de remoção de exsudato, corpo estranho, tecido necrótico e outras substâncias além de facilitar a absorção do produto aplicado após esta limpeza, também acelera a cicatrização. Porém, microscopicamente somente a limpeza da ferida com solução fisiológica mostrou não promover bons resultados ao final do processo de cicatrização (menores valores de colagenização e reepitelização).

Na primeira semana de cicatrização, o grupo O₃ (90) apresentou maior redução no tamanho da lesão ($p < 0,05$). Resultado semelhante foi encontrado por Kim et al., 2009, em porquinhos-da-índia e por Rodrigues et al., 2004, em ratos. Contudo, a partir do 14º dia este parâmetro se equiparou com os demais grupos, com exceção do grupo gentamicina.

Na primeira semana, o grupo O₃ (90) mostrou um processo inflamatório mais intenso em relação aos demais (maior quantidade de células mononucleares). Este fato pode ser atribuído à dermatite de lambedura presente na primeira semana. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar na ferida (24 horas) e em seguida os macrófagos (48-96 horas) (Balbino et al., 2005; Campos et al., 2007). Desta forma, aos sete dias, espera-se encontrar um maior infiltrado de células mononucleares.

Valacchi et al. (2011) evidenciaram, em seu trabalho, a importância de se determinar níveis adequados de peroxidação dos óleos para a escolha da melhor concentração. Em seu estudo, níveis moderados de peroxidação promoveram uma melhor cicatrização. Houve uma melhor cicatrização no grupo O₃ (60) evidenciada macroscopicamente por uma melhor epitelização até a segunda semana e maior

formação de tecido de granulação e microscopicamente por uma melhor colagenização, além de apresentar uma reação inflamatória menos intensa que o grupo O₃ (90). Bocci (1999) recomenda que um estresse oxidativo calculado e gradual seja realizado na terapia com o ozônio. Segundo Sagai e Bocci (2011) em doses muito baixas, o ozônio pode ser neutralizado pelos antioxidantes plasmáticos e, em doses muito elevadas, pode ser tóxico e gerar uma reação não desejada.

Cardoso et al. (2002) encontraram uma maior neovascularização na avaliação microscópica da pele no grupo que recebeu o óleo ozonizado em seu estudo. Porém, no presente estudo, nenhuma diferença estatística ($p > 0,05$) foi encontrada.

A ozonioterapia ainda é uma técnica pouco conhecida na medicina veterinária. Estudos voltados para a terapia animal ainda são bastante escassos.

Embora o mecanismo de ação do óleo ozonizado ainda não esteja totalmente elucidado, sabe-se que a sua utilização tópica possui efeitos cicatrizantes que vão além do simples controle da infecção. Trabalhos que ajudem a elucidar essa forma de ação podem levar ao encontro de melhores formas terapêuticas. Além disso, poucos trabalhos que relacionem diferentes concentrações do óleo ozonizado com o processo de cicatrização foram realizados. O presente estudo evidenciou essa diferença. O óleo em menor concentração promoveu melhores resultados.

3.5 CONCLUSÃO

O óleo de girassol ozonizado revelou ser de fácil aplicação nos animais, porém possui um odor característico que pode ser um inconveniente para sua comercialização. O óleo de girassol ozonizado na concentração mais baixa (60g de O₃/L de óleo) apresentou o melhor resultado no processo de reparo da pele em ratas podendo ser considerado uma nova opção de tratamento tópico de feridas em animais. Além disso, o uso tópico da pomada de gentamicina retardou o processo de reparação tecidual nas ratas.

CAPITULO 4

4 CONCLUSÃO GERAL

A ozonioterapia tópica demonstrou ser eficaz no auxílio do processo de reparação tissular em ratas, podendo ser considerada como uma nova opção de tratamento em lesões de pele agudas e contaminadas, em animais.

A medicina oficial ainda não reconheceu o uso tópico de O₃ e seus derivados, principalmente pela falta de estudos clínicos consistentes. Poucos trabalhos que relacionem diferentes concentrações do óleo ozonizado com o processo de cicatrização foram realizados. Também ainda são necessários trabalhos que elucidem melhor o seu mecanismo de ação para que se aperfeiçoem melhores formas terapêuticas.

Na medicina veterinária, a técnica da ozonioterapia é pouco conhecida e difundida. Espera-se que novos trabalhos deem continuidade a elucidação desta terapia nos animais.

A busca por novos produtos tópicos, que possam ser utilizados na pele de uma forma segura, eficaz e com baixo custo, será constante e novos produtos deverão surgir à medida que surjam novos problemas e novas dúvidas.

REFERÊNCIAS

Almeida NR, Beatriz A, Micheletti AC, Arruda EJ. Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review. *Orbital Electronic Journal of Chemistry*. 2012. 4(4): 313-326.

Araújo CFR, Souza Filho ZA, Greca FH, Guerreiro MHCPM, Leite AL, Mansur AEC, Kantor DC, Nassif AE. Efeitos do Agarol[®] e do Trigliceril[®] sobre a cicatrização de pele: estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 1994. 13(4): 231-236.

Associação Brasileira de Ozonioterapia (ABOZ) 2013. Associação Brasileira de Ozonioterapia. Disponível em: <http://www.aboz.org.br>.

Bajay HM, Jorge AS, Dantas SRPE. Curativos e coberturas para o tratamento de feridas. In: Jorge AS, Dantas SRPE. *Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas*. São Paulo: Atheneu, 2005. 378 p.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005. 41 (1): 27-51.

Barroso JEM, Ximenes FHB, Leite CR, Mustafa VS, Borges JRJ, Castro MB, Gogoy RF. Comparação entre os efeitos de diferentes tratamentos na cicatrização de pele por segunda intenção em ovinos. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2010. 4 (4): 298-302.

Beco L, Guaguère E, Lorente Méndez C, Noli C, Nuttal T, Vroom M. Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2—antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. *The Veterinary Record*. 2013. 172 (6): 156-160.

Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy future in medicine. *British Journal of Biomedical Science*. 1999. 56: 270-279.

Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation*. 2004. 13 (1): 3-11.

Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Archives of Medical Research*. 2006. 37: 425-435.

Bolton LL, Johnson CL, Fattu AJ. Medicamentos tópicos e agentes farmacológicos na cicatrização. In: Gogia PP. Feridas: tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 192 p.

Bragulla H, Budras KD, Mulling C, Reese S, Konig HE. Tegumento comum. In: Konig HE; Liebich Hans-Georg. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. Porto Alegre: Artmed, 325-378. 2002-2004. 2 v.

Brito AF. Antissépticos e desinfetantes. In: Andrade SF. Manual de terapêutica veterinária. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. 697 p.

Brown M. Estimulação elétrica para o tratamento de feridas. In: Gogia PP. Feridas: tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 192 p.

Campos ACJ, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. ABCD: Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva. 2007. 20 (1): 51-58.

Caquetti A. Ozonioterapia veterinária: propriedades e efeitos. 2010. Disponível em: <<http://www.ozonioterapiaveterinaria.com.br/>>. Acesso em: 25 fev. 2011.

Cardoso CC, Macêdo SB, Carvalho JCT, Dall'aglio R, Ferreira LR, Gomez M, Demartini G, Fraschini F. Azione dell'Ollio Ozonizzato (Bioperoxoil®) nelle Lesioni Chirurgiche dei Modelli Pre-Clinici. International Journal on drugs and therapy. 2002. 19 (1-2): 56-60

Conceição LG, Santos RL. Sistema Tegumentar. In: Santos RL; Alessi AC. Patologia veterinária. São Paulo: Roca, 2011. xii, 892 p.

Cox HU. Staphylococcal Infections. In: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006. xxix, 1387 p.

Cuzzel J, Krasner D. Curativos. In: Gogia P. Feridas – tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: Livraria Editora Revinter Ltda. 2003.

Dantas SRPE. Aspectos históricos do tratamento de feridas. In: Jorge AS, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu, 2005. 378 p.

Díaz MF, Gáston G, Kendra G, Sánchez Y, Tilan J. Evaluación de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del OLEOZON® tópico. REDVET, Revista eletrônica de veterinaria, Cuba. 2006; 7:1-6

Díaz MF, Hernández R, Martínez G, Vidal G, Gómez M, Fernández H, Garcés R. Comparative Study of Ozonized Olive Oil and Ozonized Sunflower Oil. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2006. 17(2): 403-407.

Doughty DB, Sparks-Defriese B. Wound Healing Physiology. In: Bryant RA, Nix, DP. Acute & chronic wounds: current management concepts. 3rd ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. xiv, 56-81.

Dyson M. Ultrassonografia no tratamento de feridas. In: Gogia PP. Feridas: tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 192 p.

Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. Journal of Natural Science Biology and Medicine. 2011. 2 (1): 66-70.

Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Santis-Isolan PMB, Oliveira RM, Arruda ECM. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: Estudo morfológico e histológico. Acta Cirúrgica Brasileira. 2006. 21 (3): 55-65.

Gogia PP. Feridas: tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 192 p.

Greenway DLA, Dyke KGH. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology. 1979. 115:233-245.

Guinesi AS, Andolfatto C, Bonetti Filho I, Cardoso AA, Passaretti Filho J, Farac RV. Ozonized Oils: A qualitative and Quantitative Analysis. Brazilian Dental Journal. 2011. 22(1): 37-40.

Haddad MA, Souza MV, Hincapie JJ, Ribeiro Junior JI, Ribeiro Filho JD, Benjamin LA. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à

ozonioterapia. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009. 61(3):539-546.

Hansler RV. The use of ozone in medicine. 5. ed. Alemanha: Odrei-plublishers, 2007. 176p.

Hargis AM. Sistema Tegumentar. In: Thomson RG, Carlton W, Mcgavin MD. Patologia veterinária especial de Thomson. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 672 p.

Hardie EM. Reconhecimento do comportamento doloroso em animais. In: Hellebrekers LJ. Dor em animais. Utrecht: Manole, 2002. 166p.

Hargis AM, Ginn PE. Integumentary System. In: Thonsom RG; Mcgavin MD; Carlton, W, Zachary JF. Thomson's special veterinary pathology. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 2001. 755 p.

Hariharan H, Barnum DA. Antimicrobial drug susceptibility of certain bacterial pathogens from dogs and cats. The Canadian Veterinary Journal. 1974. 15(4):108-113.

Heit MC, Riviere JM. Quimioterapia das doenças microbianas. In: Adams HR. Farmacologia e terapêutica em veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 1034 p.

Himsworth CG, Patrick DM, Parsons K, Feng A, Weese JS. Methicilin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Rats. Emerging Infectious Diseases. 2013. 19 (1): 169-170.

Huber W. Quimioterapia de doenças microbianas, fúngicas e virais. In: Booth NH, Mcdonald LE. Farmacologia e terapêutica em veterinária. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 997 p.

Ihrke PJ. Integumentary Infections. In: Greene, CE. Infectious diseases of the dog and cat. 3rd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006. xxix, 1387 p.

Irion G. Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores. Rio de Janeiro: LAB, 2005.

Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *Journal of Korean Medical Sciences*. 2009. 24 (3):368-374.

Koneman EW, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Xxv, 1565 p.

Levinson W. *Microbiologia médica e imunologia*. 10^a edição. São Paulo: Editora Artmed, 2010. 664 p.

Lima CRO, Rabelo RE, Moura VMDB, Silva LAF, Tresvenzol LMF. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação. Revisão de literatura. *Revista CFMV*. 2012. 56:53-59.

Mandelbaum SH, Di Santis E, Mandelbaum MH. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Educação Médica Continuada. Anais Brasileiros de Dermatologia*. Rio de Janeiro. 2003 78(4):393-410.

Mandelbaum SH, Di Santis E, Mandelbaum MH. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *Educação Médica Continuada. Anais Brasileiros de Dermatologia*. Rio de Janeiro. 2003 78(5):525-542.

Manhezi AC, Bachion MM, Pereira AL. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2008. 61(5): 620-629.

Martins NLP, Malafaia O, Ribas-Filha JM, Heibel M, Baldez RN, Vasconcelos PRL, Moreira H, Mazza M, Nassif PAN. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu). Estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira, Maranhão*. 2006, 21 (3): 66-75.

McHugh SM, Collins CJ, Corrigan MA, Hill ADK, Humphreys H. The role of topical antibiotics used as prophylaxis in surgical site infection prevention. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011. 66: 693 - 701.

Mendonça RJ, Coutinho-Neto J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009; 84 (3): 257-262.

Meneghin P, Vattimo MF. Fisiopatologia do processo cicatricial. In: Jorge AS, Dantas SRPC. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu, 2005. 31-42 p.

Merck, Veterinary Manual. Philadelphia: Merck& Co. INC, 2005. 2712 p.

Ministério da Saúde. Brasil. Saúde dobra investimento em projetos de produção de plantas medicinais e fitoterápicos; 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>

Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília; 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/>

Muller GH, Kirk RW, Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Muller & Kirk's small animal dermatology. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 2001. 1528 p.

Paulino CA. Antissépticos e desinfetantes. In: Spinosa HS, Górnaiak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897 p.

Pereira MTC; Ribeiro SCA, Carvalho SFM. Revisão sobre o uso do ozônio no tratamento da mastite bovina e melhoria da qualidade do leite. Bioscience Journal. 2003. 19 (2):109-114.

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. 32(1): 12-14.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC, Maguire D. Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas. 1ª edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. Reimpressão 2005. 512 p.

Rezaie A, Loftfollahi B, Mohajeri D, Mousavi G, Nazeri M, Zakhireh S, Mohammadi B. Geometric and Histopathologic Assesment of Lavander Extracts (*Lavandula stoechas*) on Healing of experimental Skin Wounds and its Comparison with Zinc Oxide on Rats. Research Journal of Biological Sciences. 2011. 6(11): 585-589.

Ribeiro SMCP. Soluções antissépticas em curativos. In: Jorge AS, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu, 2005. 378 p.

Rodrigues KL, Cardoso CC, Castellani C, Caputo RL, Tavares Carvalho JC, Fiorini JE, Schneedorf JM. Cicatrizing and antimicrobial properties of na ozonised oil from sunflower seeds. *Inflammopharmacology*. 2004.12 (3): 261-270.

Rodríguez ZZ, Perez LE, Jesus MM, Vázquez GX. Oleozon® como tratamiento de la dermatomycosis del conejo. *REDVET, Revista eletrônica de veterinaria*. 2007. 8 (3):1-4.

Rodríguez ZZ, Álvarez RG, Guanche D, Merino N, Rosales FH, Cepero SM, González SA, Schulz Siegfried. Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators of Inflammation*. 2007; 1: 1-6.

Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *The Canadian Veterinary Journal*. 2011. 52: 153-157.

Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Medical Gas Research*. 2011. 29 (1): 1-18.

Saini R. Ozone therapy in dentistry: A strategic review. *Journal of Natural Science and Biology Medicine*. 2011. 2:151-3.

Sanches, CMS. A utilização do óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) – Relato de Caso. 2008. 38f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Castelo Branco, Itatiba.

Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, Castro HC. *Staphylococcus aureus* : visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2007. 43 (6): 413-423.

Sarabahi S. Recent advances in topical wound care. *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2012. 45 (2): 379-387.

Scott DW, Yager JA. The Skin and Appendages. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. San Diego: Academic Press, 1993. 3v.

Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Duprè I, Pinna A, Mollicotti P, Fadda G, Zanetti S . Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). Journal of Applied Microbiology. 2001. 90 (2): 279-284.

Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. The New England Journal of Medicine. 1999. 341(10): 738-746.

Sisson S; Grossman JD, Getty R. Sisson/Grossman anatomia dos animais domésticos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 2 v.

Sussman C, Bates-Jensen BM. Wound care: a collaborative practice manual. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. xvi, 32, 720 p.

Travagli V, Zanardi I, Vallachi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: A Review. Mediators of Inflammation. 2010. 2010(1):1-9.

Trindade LCT, Biondo-Simões MLP, Sampaio CPP, Farias REF, Pierin RJ, Netto MC. Avaliação do uso tópico do metronidazol no processo de cicatrização de feridas: um estudo experimental. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. 2010. 37(5): 358-363.

Vallachi G, Fortino V, Bocci,V. The dual action of ozone on the skin. British Journal of Dermatology. 2005.153(6):1096-1100.

Vallachi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, Travagli V. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. Wound Repair and Regeneration. 2011. 19:107-115.

White RJ, Cooper R, Kingsley A. Wound colonization and infection: the role of topical antimicrobials. British Journal of Nursing. 2001. 10(9):563-578.

ANEXO A – TABELA DE ACOMPANHAMENTO DIÁRIO

Nº	AP	COMP	PAA	APA	ED	HEM	SS	SP	TG	EPIT	COR	TAMANHO
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												

AP – apetite; COMP – comportamento; PAA – postura anti-álgica; APA – palpação; ED – edema; HEM – hemorragia; SS - secreção sanguinolenta; SP – secreção purulenta; TG – tecido de granulação; EPIT – epitelização; COR – cor; TAMANHO – comprimento x largura.

ANEXO B – PARÂMETROS MACROSCÓPICOS ANALISADOS

Legenda	
ED; HEM; SS; SP; TG; EPIT	
Grau	Característica
0	Ausente
1	Leve
2	Moderado
3	Intenso

Apetite	
Grau	Característica
0	Apetite normal
1	Hiporexia
2	Anorexia

Postura Anti-Álgica	
Grau	Característica
0	Ausente
1	Arqueada
2	Rígida

Palpação	
Grau	Característica
0	Normal - sem reação
1	Dor leve - desconforto
2	Dor moderada
3	Dor intensa

Coloração	
Grau	Característica
VI	Vermelho intenso
VC	Vermelho claro
VE	Vermelho escuro
A	Amarelado
P	Cor da pele do rato

Comportamento	
Grau	Característica
0	Hiperatividade
1	Alerta - normal
2	Apatia
3	Letargia