

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GILBERTO CARLOS DA SILVA FILHO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE FERIDAS
CONTAMINADAS COM *Escherichia coli* EM RATOS WISTAR**

CRICIÚMA

2026

GILBERTO CARLOS DA SILVA FILHO

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E
OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE FERIDAS
CONTAMINADAS COM *Escherichia coli* EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira

CRICIÚMA

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S586e Silva Filho, Gilberto Carlos da.
Efeitos da associação de nanopartículas de prata e ozonioterapia no tratamento de feridas contaminadas com *Escherichia coli* em ratos Wistar / Gilberto Carlos da Silva Filho. - 2026.
63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2026.
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Ozonioterapia - Uso terapêutico. 2. Nanopartículas metálicas - Uso terapêutico. 3. Ferimentos e lesões - Tratamento. 4. Inflamação. 5. Infecção dos ferimentos. 6. Cicatrização de feridas.
I. Título.

CDD. 22. ed. 615.5

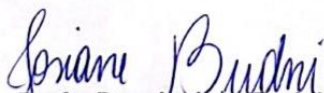
Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

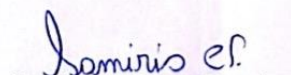


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 505

Com início às 9 (nove) horas do dia 26 (vinte e seis) de março de 2026 (dois mil e vinte e seis), realizou-se, na Sala 204/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **GILBERTO CARLOS DA SILVA FILHO**, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira intitulada “**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE FERIDAS CONTAMINADAS COM E.coli EM RATOS WISTAR**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Prof. Dr. Fernando Russo Costa do Bomfim (Fundação Herminio Ometto – FHO) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 10h (dez) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 26 (vinte e seis) de março de 2026 (dois mil e vinte e seis).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Samiris Albano Pereira
Secretária do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta etapa acadêmica não é apenas o resultado de um esforço individual, mas o fruto do apoio, paciência e colaboração de pessoas e instituições fundamentais em minha jornada.

A Deus, por ser a fonte de toda sabedoria e força. Agradeço pela vida, pela saúde e por iluminar meus caminhos nos momentos de incerteza, permitindo que eu chegasse ao final desta etapa com fé e perseverança.

À minha amada esposa, Ana Teresa, que foi o meu porto seguro durante todo este processo. Obrigado por compreender as ausências, por incentivar meus sonhos e por ser minha maior companheira. Sem o seu amor e suporte incondicional, este trabalho não seria possível.

Às minhas filhas, Helena e Maria Antonia, que são a minha maior motivação. Cada sorriso e cada momento com vocês serviram de combustível para que eu seguisse em frente. Espero que este trabalho sirva de exemplo sobre a importância da dedicação e do estudo.

Ao meu orientador, professor doutor Paulo, por me aceitar no grupo e pela confiança depositada em meu trabalho. Sua orientação, rigor científico e paciência foram essenciais para o meu amadurecimento acadêmico e profissional. É uma honra aprender com sua experiência.

Aos colegas do grupo de pesquisa Proteção e Reparo Tecidual, em especial à Ligia, Laura e Igor. Agradeço pelas discussões científicas que tanto enriqueceram esta pesquisa e pelo auxílio no laboratório que tornaram esse projeto possível.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho, o meu mais sincero obrigado.

RESUMO

A presença de microrganismos viáveis na lesão pode gerar persistência na resposta inflamatória exacerbada, aumentando o estresse oxidativo e levando a um estado inflamatório prolongado, dificultando a regeneração tecidual. Nos Estados Unidos, os gastos anuais com essas lesões ultrapassam 20 bilhões de dólares, enquanto no Reino Unido os custos superam 184 milhões de libras esterlinas. Nesse contexto, o ozônio (O₃) e as nanopartículas de prata reduzidas com curcumina (AgNPs-Cur) destacam-se por suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos terapêuticos da associação dessas terapias na cicatrização de feridas contaminadas por *Escherichia coli* em ratos Wistar. Foram utilizados 60 ratos Wistar machos, distribuídos em cinco grupos experimentais (n=12): I. Ferida Aguda; II. Ferida Contaminada (FC); III. FC+AgNPs-Cur; IV. FC+O₃; V. FC+AgNPs-Cur+O₃. As AgNPs-Cur foram administradas de forma tópica em gel, no volume de 1mL por ferida na concentração de 125 mg/L. O ozônio foi aplicado através de 5 injeções subcutâneas ao redor da ferida, com 100uL na concentração de 25 µg/mL por injeção (totalizando 500uL por animal). As feridas serão induzidas cirurgicamente com um diâmetro de 2cm e, nos grupos FC, contaminadas com *E. coli* na concentração aproximada de 10⁷ UFC/mL. Após 48h da indução da ferida e contaminação, iniciou-se os tratamentos. O período de tratamento durou 10 dias, sendo as AgNPs aplicadas diariamente (24/24h) e o ozônio em dias alternados (48/48h). A aplicação das AgNPs no grupo associado, ocorreram sempre após a aplicação do ozônio. Durante os cinco primeiros dias de tratamento foram realizadas as coletas de Swab das feridas para quantificação das UFC. Após 24h do último dia de tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta das estruturas e análises. Ao avaliar a contração da ferida (%), o grupo FC teve uma diminuição da contração em relação ao grupo Ferida aguda, enquanto que os três grupos tratamentos apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo FC. Na quantificação de UFC, após 24h do primeiro tratamento, foi possível ver diminuição significativa das UFC nos três grupos tratamentos que se manteve até o quarto dia de tratamentos. No quinto dia, apenas os dois grupos com ozônio mantiveram a UFC reduzidas. Tanto as AgNPs como o ozônio foram capazes de diminuir o infiltrado inflamatório, porém quando associados tiveram uma redução mais significativa. Na avaliação histológica de porcentagem de colágeno, apenas o grupo de terapias combinadas obtiveram aumento significativo. Na expressão gênica, apenas os grupos tratados FC+O₃ e FC+AgNPs-Cur+O₃ apresentaram aumento significativo no Nrf2 e HIF-1α. Nas citocinas pró-inflamatórias, nenhum grupo apresentou diminuição significativa, porém nas citocinas anti-inflamatórias o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ apresentou aumento significativo em ambas as citocinas (IL-10 e IL-4). Ao avaliar os oxidantes através do DCF e do Nitrito, todos os tratamentos tiveram reduções significativas em relação ao grupo FC. Ao avaliar os níveis de antioxidantes (SOD e GSH) e dano oxidativo (carbonil e sulfidril), apenas o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ apresentou melhora significativa em relação ao grupo FC. Ao analisar o conjunto dos resultados encontrados, o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ aparentou ter resultados significativos mais consistentes na diminuição de UFC, assim como melhora do estado inflamatório da ferida, quadro redox, diminuição do infiltrado inflamatório, aumento de porcentagem de colágeno e, consequentemente, contração da ferida. Apesar disto, ainda é necessário realizar mais pesquisas para definição de protocolos seguros, com o aprofundamento dos mecanismos moleculares envolvidos através de estudos pré-clínicos e clínicos que permitam validar a efetividade dessa associação terapêutica, visando sua potencial aplicação no manejo de feridas em humanos.

Palavras-chave: Nanopartículas metálicas; Ozonioterapia; Infecção de ferida; Inflamação; Antioxidantes; Cicatrização.

ABSTRACT

The presence of viable microorganisms in the lesion can generate a persistent, exacerbated inflammatory response, increasing oxidative stress and leading to a prolonged inflammatory state, hindering tissue regeneration. In the United States, annual spending on these lesions exceeds \$20 billion, while in the United Kingdom the costs surpass £184 million. In this context, ozone (O₃) and curcumin-reduced silver nanoparticles (AgNPs-Cur) stand out for their antimicrobial and anti-inflammatory properties. The aim of this study is to evaluate the therapeutic effects of the combination of these therapies on the healing of wounds contaminated with *Escherichia coli* in Wistar rats. Sixty male Wistar rats were used, distributed into five experimental groups (n=12): I. Acute Wound; II. Contaminated Wound (CF); III. CF+AgNPs-Cur; IV. CF+O₃; V. CF+AgNPs-Cur+O₃. Topical AgNPs-Cur was administered as a gel, at a volume of 1 mL per wound at a concentration of 125 mg/L. Ozone was applied via 5 subcutaneous injections around the wound, with 100 µL at a concentration of 25 µg/mL per injection (totaling 500 µL per animal). Wounds were surgically induced with a diameter of 2 cm and, in the FC groups, contaminated with *E. coli* at an approximate concentration of 10⁷ CFU/mL. Treatments began 48 hours after wound induction and contamination. The treatment period lasted 10 days, with AgNPs applied daily (every 24 hours) and ozone on alternate days (every 48 hours). In the associated group, AgNPs were always applied after ozone application. During the first five days of treatment, swabs were collected from the wounds for CFU quantification. After 24 hours on the last day of treatment, the animals were anesthetized and euthanized for tissue collection and analysis. When evaluating wound contraction (%), the FC group showed a decrease in contraction compared to the acute wound group, while all three treatment groups showed a significant increase compared to the FC group. In the quantification of CFU, after 24 hours of the first treatment, a significant decrease in CFU was observed in all three treatment groups, which was maintained until the fourth day of treatment. On the fifth day, only the two groups with ozone maintained reduced CFU. Both AgNPs and ozone were able to reduce inflammatory infiltrate, but when combined, they showed a more significant reduction. In the histological evaluation of collagen percentage, only the combined therapy group showed a significant increase. In quantifying gene expression, only the FC+O₃ and FC+AgNPs-Cur+O₃ treated groups showed a significant increase in Nrf2 and HIF-1α. In pro-inflammatory cytokines, no group showed a significant decrease, but in anti-inflammatory cytokines, the FC+AgNPs-Cur+O₃ group showed a significant increase in both cytokines (IL-10 and IL-4). When evaluating oxidants through DCF and Nitrite, all treatments showed significant reductions compared to the FC group. When evaluating antioxidant levels (SOD and GSH) and oxidative damage (carbonyl and sulfhydryl), only the FC+AgNPs-Cur+O₃ group showed significant improvement compared to the FC group. When analyzing the set of results found, the FC+AgNPs-Cur+O₃ group appeared to have more consistent significant results in reducing CFU, as well as improving the inflammatory state of the wound, redox profile, decreasing inflammatory infiltrate, increasing the percentage of collagen and, consequently, wound contraction. Despite this, further research is still needed to define safe protocols, deepening the understanding of the molecular mechanisms involved through preclinical and clinical studies that allow validating the effectiveness of this therapeutic association, aiming at its potential application in the management of wounds in humans.

Keywords: Metal nanoparticles; Ozone therapy; Wound infection; Inflammation; Antioxidants; Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sistema imunológico na cicatrização aguda de feridas. Macrófagos residentes na pele são as primeiras células imunes que respondem a lesões. Quando ativados pelos DAMPs, eles liberam citocinas e quimiocinas para recrutar neutrófilos e monócitos para o local inflamatório. Os monócitos então se diferenciam em macrófagos M1 pró-inflamatórios. Os mastócitos também facilitam a diferenciação de monócitos ao secretar a proteína quimioatraente dos monócitos-1 (MCP-1). Além disso, mastócitos, que são estimulados por queratinócitos, secretam mediadores para promover a vasodilatação que aumentam o recrutamento de células imunológicas. Neutrófilos ativados liberam EROs, armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), grânulos citotóxicos e outros mediadores que promovem e eliminação bacteriana e a epitelização dos tecidos. Macrófagos M2 pró-cicatrizantes contribuem para a reparação dos tecidos e a inibição da inflamação. Os LCs promovem a reparação dos tecidos, embora o mecanismo exato não seja claro. Diversos subconjuntos de células T são encontrados em feridas agudas e são responsáveis pela eliminação bacteriana, modulação das respostas imunes e remodelação tecidual. Fonte: Razyeva et al., 2021. 18
- Figura 2:** Efeitos dos mediadores de ozônio nas vias Nrf2 e NF- κ B. Após a administração, o ozônio reage com biomoléculas, incluindo ácidos graxo poliinsaturados (PUFA) ou membrana plasmática, produzindo hidroperóxidos, aldeídos e H₂O₂. O H₂O₂ entra no citoplasma das células e modula as vias do fator nuclear NF- κ B e interage com resíduos de cisteína do Nrf2. Fonte: Clavo et al., 2021. 21
- Figura 3:** Mecanismo de ação das AgNPs. As nanopartículas de prata interagem com a célula bacteriana, causando uma série de efeitos: (1) inibição da síntese de DNA, (2) inibição da síntese de RNAm, (3) ruptura da membrana celular, (4) inibição da síntese de proteínas, (5) inibição da síntese da parede celular, (6) dano mitocondrial e (7) inibição da cadeia transportadora de elétrons. Esses efeitos são exacerbados pelo estresse oxidativo gerado pela produção de EROs, levando à morte celular. Fonte: Jain et al., 2021. 23
- Figura 4:** Desenho experimental. Fonte: Do autor, 2026. 28
- Figura 5:** Caracterização das AgNPs-Cur. Em A, o gráfico de leitura por espectrofotometria de varredura. Em B, uma imagem representativa das AgNPs-Cur realizada por MET. 35
- Figura 6:** Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de UFC em feridas contaminadas com *E. coli* durante os cinco primeiros dias de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: #p<0,05 v.s grupo Ferida Aguda; *p<0,05 v.s grupo Ferida Contaminada; **p<0,01 v.s grupo Ferida Contaminada; ***p<0,001 v.s grupo Ferida Contaminada e ****p<0,0001 v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey). 36
- Figura 7:** Imagens representativas dos efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de carga bacteriana em feridas contaminadas com *E. coli* durante os cinco primeiros dias de tratamento. Cada ponto nas placas com meio de cultura Mueller Hinton é correspondente a uma UFC de bactéria. 37
- Figura 8:** Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e fator de crescimento em

feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: #p<0,05 v.s grupo Ferida Aguda; *p<0,05 v.s grupo Ferida Contaminada e **p<0,01 v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).....38

Figura 9: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de dano oxidativo (carbonil e sulfidril) e antioxidantes (SOD e GSH) em feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: #p<0,05 v.s grupo Ferida Aguda; *p<0,05 v.s grupo Ferida Contaminada e **p<0,01 v.s grupo FC (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey). 39

Figura 10: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de DCF e Nitrito em feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: #p<0,05 v.s grupo Ferida Aguda; *p<0,05 v.s grupo Ferida Contaminada e **p<0,01 v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey)..... 40

Figura 11: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de Col I, NRF2, VEGF e HIF-1 α através de PCR em feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: #p<0,05 v.s grupo Ferida Aguda; *p<0,05 v.s grupo Ferida Contaminada; **p<0,01 v.s grupo Ferida Contaminada e ***p<0,001 v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey)..... 41

Figura 12: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na análise histológica de infiltrado inflamatório (coloração HE) e porcentagem de área de colágeno (coloração Tricômio de Gomori) de feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Em A, imagens representativas do infiltrado inflamatório com coloração HE (400x); Em B, a contagem média de infiltrado inflamatório; Em C, imagens representativas da área de colágeno com coloração de Tricômio de Gomori (400x); E em D, a porcentagem média da área de colágeno. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: #p<0,05 v.s grupo Ferida Aguda; ***p<0,001 v.s grupo Ferida Contaminada e ****p<0,0001 v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey)..... 43

Figura 13: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na porcentagem de contração de feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: #p<0,05 v.s grupo Ferida Aguda; **p<0,01 v.s grupo Ferida Contaminada e ***p<0,001 v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey). 44

Figura 14: Resumo dos efeitos e dos mecanismos de ação da AgNPs-Cur e ozonioterapia no tratamento de feridas contaminadas por *E. coli*. Fonte: Do autor, 2026. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs – Nanopartículas de Prata

Akt – Proteína Quinase B

ATCC - Coleção de Cultura Tipográfica Americana (do inglês, American Type Culture Collection)

CCL2 – ligante 2 da quimiocina (motivo C-C) (do inglês, chemokine (C-C motif) ligand 2)

Cur – Curcumina

DCFH – 2',7'-diclorofluoresceína

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz (do inglês, Dynamic Light Scattering)

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, Deoxyribonucleic Acid)

DNPB – 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTNB – 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)

ERNs – Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

EGF – Fator de Crescimento Epidermal (do inglês, Epidermal Growth Factor)

ERK1/2 – Quinases Reguladas por Sinal Extracelular 1 e 2 (do inglês, Extracellular Signal-Regulated Kinases)

ELISA – Imunoensaio Enzimático (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

EPM – Erro padrão da média

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês, Fibroblast Growth Factor)

GSH – Glutathiona Reduzida

HE – Hematoxilina e Eosina

HO-1 – Hemoxigenase-1

IL-1 β – Interleucina-1 Beta

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (do inglês, Mitogen-Activated Protein Kinase)

MCP-1 – Proteína Quimioatraente de Monócitos-1 (do inglês, Monocyte Chemoattractant Protein-1)

MMPs – Metaloproteinases de Matriz (do inglês, Matrix Metalloproteinases)

mTOR – Alvo Mamífero da Rapamicina (do inglês, Mammalian Target of Rapamycin)

NETs – Armadilhas Extracelulares dos Neutrófilos (do inglês, Neutrophil Extracellular Traps)

NF- κ B – Fator Nuclear Kappa B (do inglês, Nuclear Factor Kappa B)

RasGAP – Proteína Ativadora da GTPase Ras (do inglês, Ras GTPase Activating Protein)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês, Ribonucleic Acid)

RNAm – RNA Mensageiro

NO – Óxido Nítrico (do inglês, Nitric Oxide)

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês, Platelet-Derived Growth Factor)

PFA – Paraformaldeído

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

SOD – Superóxido Dismutase

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês, Transmission Electron Microscopy)

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador Beta (do inglês, Transforming Growth Factor Beta)

TIMPs – Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (do inglês, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases)

TLRs – Receptores do tipo Toll (do inglês, Toll-like Receptors)

TMB – Tetrametilbenzidina

TNB – Ácido 2-nitro-5-tiobenzoico

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa (do inglês, Tumor Necrosis Factor Alpha)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV Vis – Ultravioleta-visível

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor)

4-HNE – 4-Hydroxynonenal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. FERIDAS CONTAMINADAS E SUA RELEVÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA.....	15
1.2. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS.....	17
1.3. OZÔNIO NA CICATRIZAÇÃO E TRATAMENTO DE FERIDAS	19
1.4. NANOPARTÍCULAS DE PRATA: CICATRIZAÇÃO E SÍNTESE VERDE	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	26
3.2 ANIMAIS	26
3.2.1 Desenho experimental	26
3.2.2 Indução da ferida e contaminação bacteriana	27
3.2.3 Administração dos tratamentos	27
3.2.4 Gerador de ozônio	28
3.2.5 Síntese verde das nanopartículas de prata	29
3.2.6 Eutanásia e coleta de amostras	30
3.3 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS	30
3.5 PROTOCOLO DE HISTOLOGIA.....	30
3.7 RT-QPCR	31
3.8 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO	31
3.9 ANÁLISES OXIDATIVAS	32
3.9.1 Quantificação de oxidantes	32
3.9.2 Marcadores de danos oxidativos	32
3.9.3 Atividades das enzimas antioxidantes.....	33
3.10 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA NA FERIDA.....	33
3.11 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS.....	34
3.12 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS	34
4. RESULTADOS	35
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	35
4.2 CARGA BACTERIANA NA FERIDA	35
4.3 CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS	37
4.4 DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES	39

4.5 OXIDANTES	40
4.6 RT-QPCR	41
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA	42
4.8 CONTRAÇÃO DA FERIDA	44
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO A – CERTIFICADO DO CEUA	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. FERIDAS CONTAMINADAS E SUA RELEVÂNCIA NA SAÚDE PÚBLICA

Uma ferida é uma ruptura na integridade do tecido, comprometendo a estrutura da pele e dos tecidos subjacentes. Pode ser causada por fatores físicos, químicos ou biológicos, desencadeando uma cascata de eventos celulares e bioquímicos que visam à reparação do dano. O processo de cicatrização ocorre em etapas coordenadas, incluindo a resposta inflamatória inicial, a proliferação celular e a remodelação da matriz extracelular para restabelecimento da função tecidual (Mendes et al., 2022).

A presença de microrganismos viáveis na lesão pode interferir nesse processo, caracterizando uma ferida contaminada. Embora nem sempre apresentem sinais clínicos evidentes de infecção, essas lesões podem evoluir para quadros infecciosos quando há um desequilíbrio entre a carga bacteriana, a virulência dos patógenos e a resposta imune do hospedeiro. Nesse contexto, neutrófilos e macrófagos são ativados, liberando citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, fundamentais para conter a proliferação microbiana e evitar a disseminação da infecção (Elvis; Ekta, 2011; Oguz et al., 2011; Ripamonti et al., 2011).

A persistência de uma resposta inflamatória exacerbada pode aumentar o estresse oxidativo e levar a um estado inflamatório prolongado, dificultando a regeneração tecidual. Esse ambiente favorece a formação de biofilmes bacterianos, que protegem os microrganismos da ação do sistema imune e reduzem a eficácia dos antimicrobianos. Além disso, o acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a degradação da matriz extracelular comprometem ainda mais o microambiente da ferida, aumentando o risco de cronificação (Kim et al., 2009; Koca et al., 2011; Jyoti et al., 2013; Ripamonti et al., 2012).

Além disso, há um aumento global na ocorrência de resistência a antibióticos em resposta ao tratamento estabelecido de infecções bacterianas comuns. Cerca de 92,9% das infecções por *Escherichia coli* já apresentam resistência à ciprofloxacina (Watson et al., 2023). Em 2019, as síndromes infecciosas bacterianas (incluindo infecções urinárias, infecções subcutâneas, infecções na corrente sanguínea, etc.) foram associadas a 7,7 milhões de mortes, o que representa cerca de 13,6% de todas as mortes no mundo e sendo considerada a segunda principal causa de morte no mundo (Ikuta et al., 2022). Diante desse cenário, há uma necessidade de desenvolver tratamentos e estratégias terapêuticas eficazes e seguras para combater as bactérias.

Porém, o manejo de feridas contaminadas requer mais do que o simples controle microbiológico. A modulação da resposta inflamatória e o equilíbrio redox são fundamentais para otimizar a cicatrização e evitar a progressão para feridas crônicas. Estratégias terapêuticas que reduzam a produção excessiva de EROs e promovam um ambiente favorável à regeneração celular têm mostrado resultados promissores, contribuindo para uma recuperação tecidual mais eficiente e minimizando complicações de longo prazo (Sato et al., 2025; Akdeniz et al., 2018).

Além do impacto clínico, feridas crônicas representam um desafio financeiro significativo para os sistemas de saúde, devido aos tratamentos prolongados, hospitalizações recorrentes e necessidade de intervenções especializadas. Nos Estados Unidos, os gastos anuais com essas lesões ultrapassam 20 bilhões de dólares, enquanto no Reino Unido os custos superam 184 milhões de libras esterlinas (Norman et al., 2016; Alven; Aderibigbe, 2020). No Brasil, o impacto também é expressivo, com um alto número de amputações decorrentes de feridas crônicas não tratadas adequadamente, agravando a sobrecarga financeira do sistema público e evidenciando a necessidade de estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes (Otaviano et al., 2021).

O tratamento dessas lesões no setor público representa um desafio econômico, considerando os custos elevados da assistência ambulatorial, hospitalar e domiciliar. Estudos apontam que o custo médio total da assistência a pacientes com feridas crônicas pode chegar a US\$ 10,28, sendo a assistência ambulatorial a mais onerosa (US\$ 4,25), seguida pela hospitalar (US\$ 3,87) e domiciliar (US\$ 3,47). Os principais fatores que influenciam esses custos incluem o uso de materiais para curativos, terapias tópicas e mão de obra especializada. Estratégias como a telemedicina vêm se mostrando alternativas viáveis para reduzir atendimentos presenciais, minimizar custos operacionais e melhorar a gestão desses casos no sistema de saúde (Ruiz; Lima, 2022).

Por fim, é essencial reconhecer que a persistência dessas lesões está frequentemente associada a condições clínicas subjacentes, como diabetes e doenças vasculares, que comprometem a resposta cicatricial e aumentam a vulnerabilidade do paciente a infecções recorrentes. A hipoxia tecidual e o déficit circulatório reduzem a oxigenação celular e retardam os processos biológicos essenciais para o reparo tecidual, favorecendo a proliferação de microrganismos patogênicos e o desenvolvimento de complicações graves. Dessa forma, a adoção de estratégias terapêuticas eficazes não só contribui para a redução da incidência de internações e complicações, mas também minimiza os impactos financeiros e sociais associados às feridas crônicas (Wilkinson; Hardman, 2020).

1.2. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS

O reparo tecidual é um processo complexo e altamente coordenado, essencial para restaurar a integridade de um tecido lesionado. Ele ocorre por meio de quatro fases interdependentes: coagulação, inflamação, proliferação e remodelação. O equilíbrio entre essas etapas é fundamental para um reparo eficiente, evitando complicações como inflamação persistente, cicatrização excessiva ou falhas na regeneração (Alven; Aderibigbe, 2020; Verdolino et al., 2021; O'connor et al., 2021; Bay et al., 2021).

Logo após a lesão, o organismo inicia mecanismos imediatos para conter o sangramento e criar um ambiente propício à regeneração celular. A formação do coágulo de fibrina, mediada pela ativação plaquetária, desempenha um papel central, fornecendo uma matriz provisória que facilita a migração de células inflamatórias. Além de atuar como selante biológico, o coágulo libera citocinas e fatores de crescimento, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, que aumentam a permeabilidade vascular e promovem o recrutamento de leucócitos. Paralelamente, mediadores como PDGF, TGF- β e VEGF estimulam a proliferação celular e a angiogênese, preparando o tecido para a próxima fase do reparo (Wilkinson; Hardman, 2020; Guillamat-Prats, 2021; Mendes et al., 2024).

À medida que a resposta inflamatória evolui, neutrófilos atuam na defesa imunológica, liberando enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio. Com a progressão do processo, monócitos recrutados diferenciam-se em macrófagos, cuja conversão do fenótipo M1 (pró-inflamatório) para M2 (reparador) é estimulada por IL 4 e IL-10. Essa transição favorece a secreção de fatores como TGF- β e PDGF, que ativam fibroblastos e promovem a deposição da matriz extracelular, formando o tecido de granulação. Simultaneamente, VEGF intensifica a angiogênese, enquanto FGF e EGF estimulam a proliferação celular e a reepitelização, facilitando a restauração estrutural do tecido (Ferrante; Leibovich, 2012; Aurora; Olson, 2014; Krzyszczyk et al., 2018).

Com o avanço da cicatrização, a matriz extracelular provisória passa por remodelação. O colágeno tipo III, inicialmente depositado, é substituído pelo colágeno tipo I, mais resistente. Miofibroblastos, estimulados por TGF- β 1 e PDGF, promovem a contração da ferida e reforçam a deposição de colágeno. Paralelamente, a regressão da vascularização ocorre pela apoptose de células endoteliais e pela ação moduladora 10 do VEGF. O equilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular é regulado pelas MMPs e seus inibidores (TIMPs), prevenindo a formação de cicatrizes fibróticas (Figura 1) (Ferrante; Leibovich, 2012; Aurora; Olson, 2014; Krzyszczyk et al., 2018).

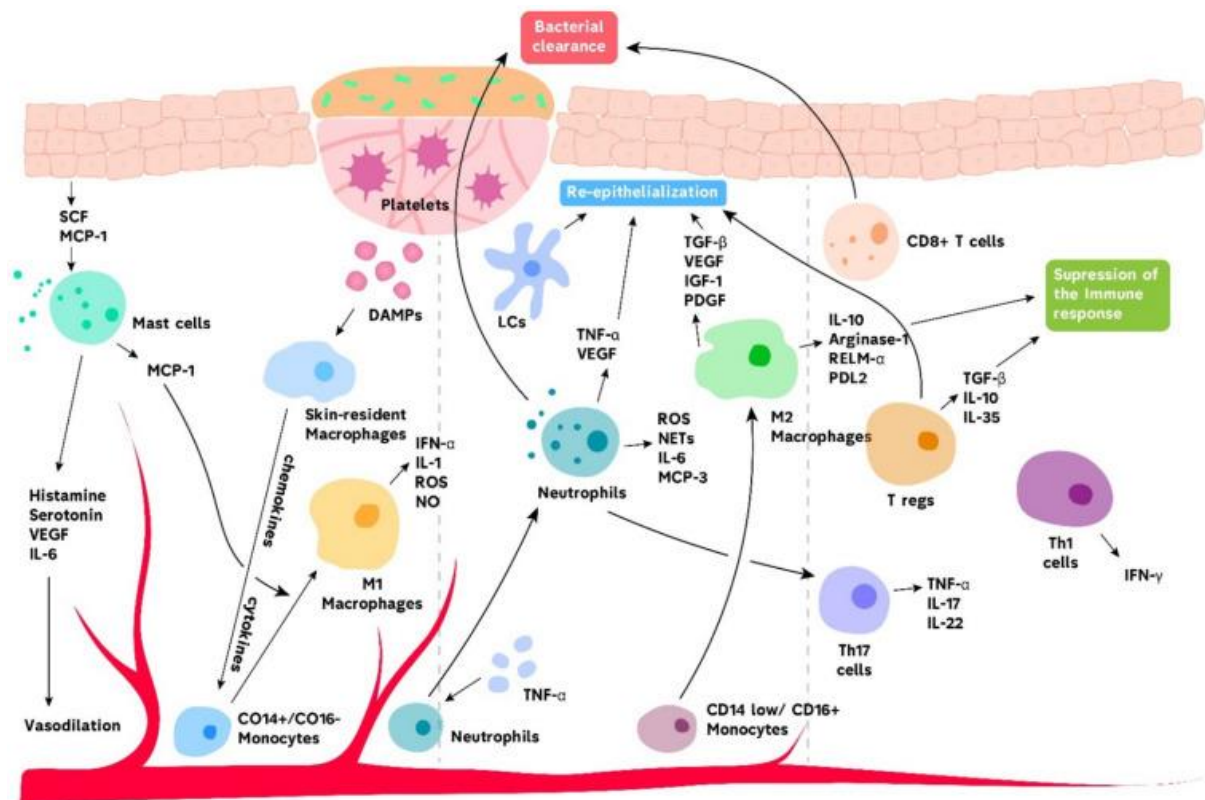


Figura 1: Sistema imunológico na cicatrização aguda de feridas. Macrófagos residentes na pele são as primeiras células imunes que respondem a lesões. Quando ativados pelos DAMPs, eles liberam citocinas e quimiocinas para recrutar neutrófilos e monócitos para o local inflamatório. Os monócitos então se diferenciam em macrófagos M1 pró-inflamatórios. Os mastócitos também facilitam a diferenciação de monócitos ao secretar a proteína quimioatraente dos monócitos-1 (MCP-1). Além disso, mastócitos, que são estimulados por queratinócitos, secretam mediadores para promover a vasodilatação que aumentam o recrutamento de células imunológicas. Neutrófilos ativados liberam EROs, armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), grânulos citotóxicos e outros mediadores que promovem a eliminação bacteriana e a epitelização dos tecidos. Macrófagos M2 pró-cicatrizantes contribuem para a reparação dos tecidos e a inibição da inflamação. Os LCs promovem a reparação dos tecidos, embora o mecanismo exato não seja claro. Diversos subconjuntos de células T são encontrados em feridas agudas e são responsáveis pela eliminação bacteriana, modulação das respostas imunes e remodelação tecidual. Fonte: Razyeva et al., 2021.

A fase de remodelação pode se estender por meses ou anos, determinando a resistência final do tecido reparado. O sucesso da regeneração depende do equilíbrio entre deposição e degradação da matriz extracelular. Quando esse mecanismo é desregulado, podem surgir complicações como fibrose excessiva, cicatrizes hipertróficas ou falha na regeneração, comprometendo a funcionalidade do tecido. Além disso, fatores sistêmicos, como infecções, diabetes e doenças crônicas, podem retardar a cicatrização, prolongando a inflamação e perpetuando a lesão crônica. O entendimento desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes na otimização do reparo tecidual e na prevenção de complicações (Guillamat-Prats, 2021; Verdolino et al., 2021; Razyeva et al., 2021; Wang et al., 2024).

1.3. OZÔNIO NA CICATRIZAÇÃO E TRATAMENTO DE FERIDAS

O ozônio (O₃) é uma molécula composta por três átomos de oxigênio, encontrada naturalmente na atmosfera e gerada artificialmente por descargas elétricas ou radiação ultravioleta. Seu potencial oxidativo é amplamente explorado em aplicações médicas e industriais. Na área da saúde, destaca-se por sua capacidade de interagir com biomoléculas e gerar compostos reativos que influenciam processos biológicos essenciais, como a homeostase celular e a resposta ao estresse oxidativo (Bocci, 2006).

Seu papel na modulação inflamatória é amplamente estudado, apresentando efeitos distintos em processos agudos e crônicos. O ozônio regula citocinas pró e anti inflamatórias, equilibra o sistema redox e modula a atividade do sistema imunológico, favorecendo a resolução da inflamação e a regeneração tecidual. Essas características tornam a ozonioterapia uma abordagem promissora no manejo de feridas complexas e de difícil cicatrização (Bocci et al., 2011; Agrillo et al., 2007; Suh et al., 2019). Nos processos inflamatórios agudos, promove um aumento transitório de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, intensificando o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela fagocitose de patógenos e remoção de debris celulares. Simultaneamente, estimula a produção de EROs e óxido nítrico (NO), que ativam vias intracelulares envolvidas no reparo tecidual. Além disso, o ozônio induz a expressão da heme oxigenase-1 (HO-1), reduzindo o estresse oxidativo e promovendo um ambiente antioxidante favorável à cicatrização (Naik et al., 2016; Souza et al., 2024; Hao et al., 2015).

O controle inflamatório pelo ozônio ocorre de forma bifásica: inicialmente, há uma elevação da resposta pró-inflamatória, ativando a imunidade inata; posteriormente, há uma modulação da inflamação por meio da indução de IL-10 e do fator de transcrição STAT3, promovendo a conversão de macrófagos M1 (pró inflamatórios) para M2 (anti-inflamatórios e reparadores). Esse efeito estimula a síntese da matriz extracelular, a deposição de colágeno tipo III e a angiogênese mediada pelo VEGF, facilitando o reparo tecidual (Bocci et al., 2011).

Nos processos inflamatórios crônicos, a regulação pelo ozônio ocorre de maneira distinta. O excesso de EROs pode causar danos celulares e degradação da matriz extracelular, dificultando a regeneração. Para mitigar esses efeitos, o ozônio induz a expressão da heme oxigenase-1 (HO-1), promovendo um ambiente antioxidante protetor, reduzindo a peroxidação lipídica e limitando a ativação contínua de vias inflamatórias (Bocci et al., 2011). Dessa forma, seu efeito restaurador pode ser particularmente benéfico em feridas de longa duração, onde a inflamação desregulada compromete a cicatrização.

Além de regular a inflamação, o ozônio melhora a microcirculação tecidual. A liberação de óxido nítrico promove vasodilatação e melhora a oxigenação em tecidos hipoxêmicos, um fator essencial para a regeneração tecidual. Esse mecanismo é especialmente relevante em lesões isquêmicas, como úlceras diabéticas, onde a hipoperfusão tecidual prejudica a cicatrização e favorece a formação de biofilmes bacterianos. O ozônio também modula a via do TGF- β , promovendo a deposição de colágeno organizado e reduzindo a formação de fibrose, facilitando a reestruturação do tecido lesionado (Hao et al., 2015).

Diante das limitações das terapias convencionais, a ozonioterapia tem sido investigada como uma estratégia complementar no tratamento de feridas agudas e crônicas. Estudos demonstram que sua exposição controlada reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , ao mesmo tempo em que estimula fatores de crescimento, como VEGF e TGF- β , acelerando a cicatrização (Naik et al., 2016; Suh et al., 2019; Souza et al., 2025). Além disso, suas propriedades antimicrobianas são determinantes para seu uso clínico, demonstrando eficácia contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. Esse efeito ocorre por meio da oxidação de membranas celulares e componentes intracelulares dos microrganismos, inibindo sua proliferação e reduzindo a necessidade do uso prolongado de antibióticos, um fator crítico na contenção da resistência antimicrobiana (Figura 2) (Nogales et al., 2008; Ripamonti et al., 2011; Alven; Aderibigbe, 2020).

A combinação desses efeitos torna a ozonioterapia uma abordagem promissora no tratamento de feridas crônicas associadas a doenças metabólicas, como diabetes mellitus, e lesões decorrentes de terapias antineoplásicas, como radioterapia e quimioterapia. Estudos clínicos indicam que o uso complementar do ozônio pode reduzir significativamente o tempo de cicatrização, melhorar a qualidade do tecido reparado e minimizar complicações infecciosas associadas ao retardo do reparo tecidual (Agrillo et al., 2007). Assim, a ozonioterapia representa uma alternativa inovadora e segura para o manejo de feridas complexas, oferecendo benefícios tanto na redução da carga microbiana quanto na regeneração tecidual, destacando-se como um recurso valioso na prática clínica.

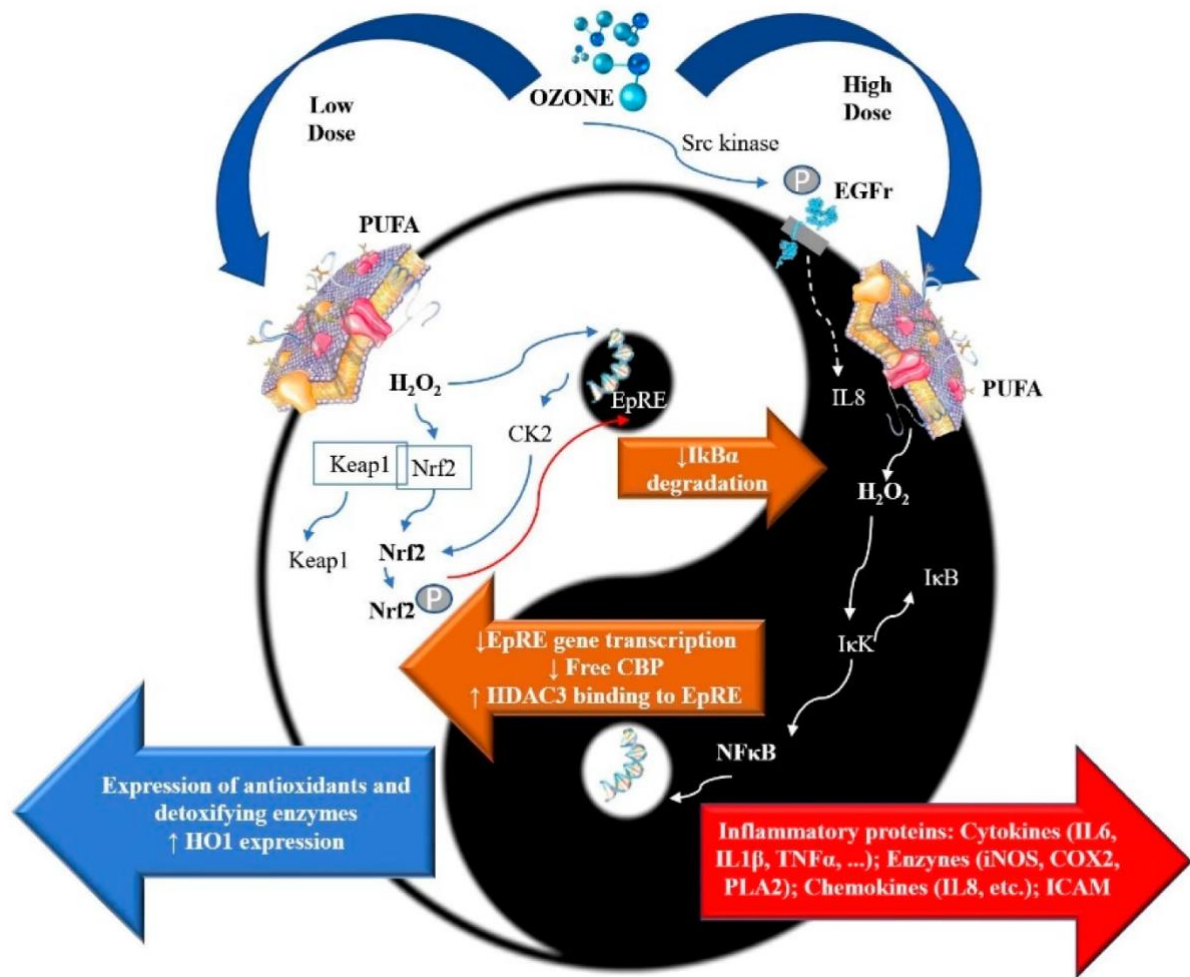


Figura 2: Efeitos dos mediadores de ozônio nas vias Nrf2 e NF-κB. Após a administração, o ozônio reage com biomoléculas, incluindo ácidos graxo poliinsaturados (PUFA) ou membrana plasmática, produzindo hidroperóxidos, aldeídos e H_2O_2 . O H_2O_2 entra no citoplasma das células e modula as vias do fator nuclear NF-κB e interage com resíduos de cisteína do Nrf2. Fonte: Clavo et al., 2021.

1.4. NANOPARTÍCULAS DE PRATA: CICATRIZAÇÃO E SÍNTESE VERDE

A nanotecnologia tem se destacado na pesquisa biomédica, especialmente no tratamento de feridas, devido às suas propriedades avançadas, como maior penetração e distribuição na pele, liberação controlada de fármacos, propriedades antimicrobianas e estímulo à regeneração celular. Dentre os nanomateriais estudados, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm recebido atenção especial por sua eficácia na redução da inflamação, promoção da angiogênese e controle de infecções, sendo consideradas uma abordagem promissora na cicatrização de feridas (Nqakala et al., 2021; Jain et al., 2021; Curtolo et al., 2021; Domingues et al., 2023).

A utilização de materiais em escala nanométrica (1 a 100 nm) confere maior eficácia e especificidade aos tratamentos, otimizando a mobilidade celular ao longo das fases do reparo tecidual (Kumari et al., 2022). Embora a prata já seja utilizada há décadas para fins terapêuticos, sua aplicação na forma nanoparticulada trouxe avanços significativos na redução da toxicidade e minimização do desenvolvimento de resistência bacteriana, quando comparada às formulações convencionais (Nqakala et al., 2021). Além disso, sua atividade antimicrobiana de amplo espectro varia conforme tamanho, forma e concentração, tornando as AgNPs versáteis para o controle de infecções em feridas agudas e crônicas (Choudhury et al., 2020; Pangli et al., 2021; Kim et al., 2025; Shanmugam et al., 2021; Bruna et al., 2022).

Os mecanismos de ação das AgNPs envolvem interações complexas com membranas celulares bacterianas. Inicialmente, essas nanopartículas aderem à superfície celular e são absorvidas por endocitose, desencadeando estresse oxidativo e disfunção metabólica (Pangli et al., 2021; Bruna et al., 2021; Zheng et al., 2024). A liberação de íons de prata aumenta a permeabilidade celular, estimula a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e inibe a replicação do DNA, comprometendo a proliferação microbiana (Talarska; Boruczkowski; Żurawski, 2021). Além disso, sua interação com proteínas sulfidrilas inativa enzimas essenciais para a respiração celular, levando ao colapso metabólico e consequente morte bacteriana (Figura 3) (Krishnan et al., 2020; Choudhury et al., 2020).

Além de sua potente ação antimicrobiana, as AgNPs modulam a resposta inflamatória, promovendo um ambiente favorável à regeneração tecidual. Estudos indicam que essas nanopartículas reduzem a produção de citocinas inflamatórias, induzem apoptose de neutrófilos e favorecem a angiogênese (Nqakala et al., 2021). Esse efeito é potencializado pela ativação da via da proteína p53, responsável por estimular genes pró-apoptóticos (BAX, BAD e BAK), resultando na fragmentação do DNA e morte celular programada. Esse mecanismo auxilia na renovação tecidual e previne a formação de biofilmes resistentes (Gopinath et al., 2010). Comparadas aos antibióticos convencionais, que atuam sobre alvos específicos, as AgNPs interferem em múltiplos processos celulares essenciais, reduzindo significativamente a probabilidade de resistência bacteriana (Bruna et al., 2021).

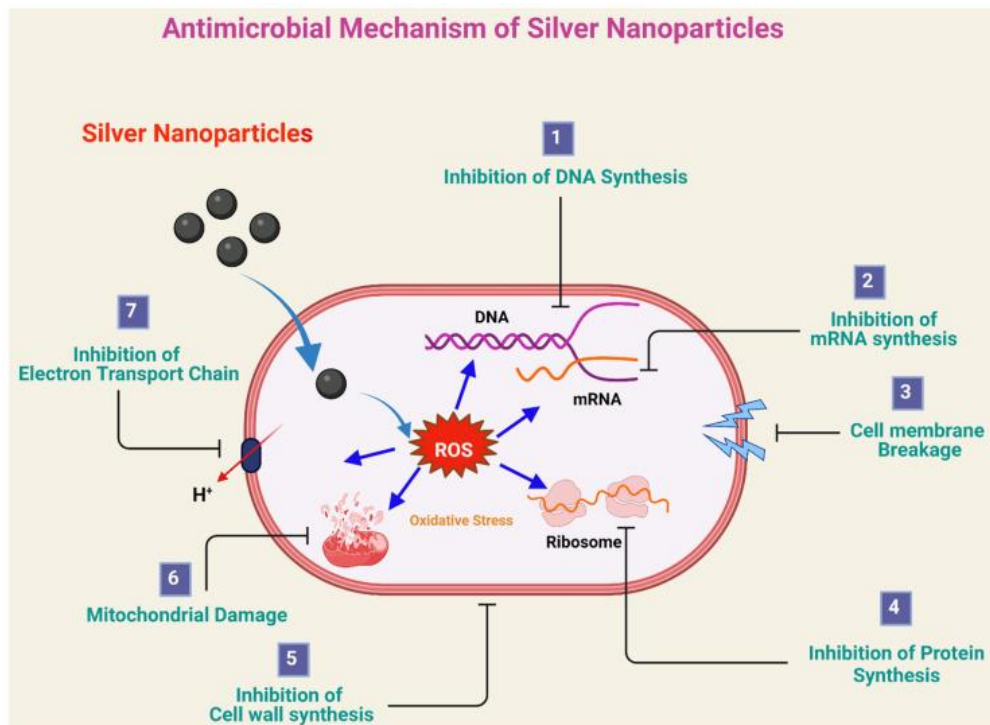


Figura 3: Mecanismo de ação das AgNPs. As nanopartículas de prata interagem com a célula bacteriana, causando uma série de efeitos: (1) inibição da síntese de DNA, (2) inibição da síntese de RNAm, (3) ruptura da membrana celular, (4) inibição da síntese de proteínas, (5) inibição da síntese da parede celular, (6) dano mitocondrial e (7) inibição da cadeia transportadora de elétrons. Esses efeitos são exacerbados pelo estresse oxidativo gerado pela produção de EROs, levando à morte celular. Fonte: Jain et al., 2021.

Diante dessas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e regenerativas, as nanopartículas de prata emergem como uma estratégia terapêutica inovadora para o manejo de feridas. No entanto, para garantir eficiência terapêutica e segurança biológica, é essencial o desenvolvimento de métodos de síntese que reduzam efeitos tóxicos e impactos ambientais. Nesse contexto, a síntese verde de nanopartículas de prata tem sido amplamente estudada como alternativa sustentável e eficiente.

A síntese verde baseia-se no uso de biomoléculas naturais provenientes de plantas, bactérias e fungos, substituindo agentes químicos potencialmente tóxicos. Esse método minimiza impactos ambientais, reduz subprodutos indesejados e confere maior biocompatibilidade às AgNPs (Zhang et al., 2016; Nqakala et al., 2021; Bruna et al., 2021; Haj Bloukh et al., 2021). Além disso, as nanopartículas obtidas por essa via apresentam alta reatividade de superfície e maior estabilidade, potencializando sua ação antimicrobiana e cicatrizante.

O mecanismo pelo qual a síntese verde gera AgNPs envolve redução e estabilização da prata iônica (Ag^+) por compostos bioativos naturais, como polifenóis, flavonoides e proteínas. Esses compostos não apenas facilitam a formação das nanopartículas, mas também

conferem propriedades terapêuticas adicionais, como antioxidantes e anti-inflamatórias (Zhang et al., 2016). Assim, a combinação das AgNPs com biopolímeros bioativos, como quitosana e curcumina, tem mostrado 15 efeitos positivos na angiogênese, proliferação celular e modulação da resposta imune (Shanmugam et al., 2021; Loan Khanh et al., 2019; Ruffo et al., 2022).

Portanto, o presente estudo via avaliar os efeitos do tratamento combinado de ozonioterapia com nanopartículas de prata biossintetizadas com curcumina em um modelo animal de ferida epitelial contaminada por *Escherichia coli*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento combinado de ozônio com nanopartículas de prata (AgNPs) biossintetizadas com curcumina em feridas epiteliais contaminadas por *Escherichia coli* em ratos Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar as colônias bacterianas presentes nas feridas durante os primeiros cinco dias de tratamento com AgNPs e ozonioterapia em ratos Wistar.
2. Dosagens dos níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β) após tratamento de AgNPs-Cur e ozonioterapia em feridas epiteliais contaminadas por *E. Coli* em ratos Wistar;
3. Avaliação dos efeitos das AgNPs-Cur e ozonioterapia na produção de oxidantes (DCFH e NO), danos oxidativos (sulfidril e carbonil) e atividade do sistema antioxidante (SOD e GSH) em feridas contaminadas por *E. coli* em ratos Wistar;
4. Avaliar os efeitos das AgNPs-Cur e ozonioterapia na expressão gênica de Nrf2, Col I, VEGF e HIF-1 α em feridas contaminadas por *E. coli* em ratos Wistar.
5. Quantificação do infiltrado inflamatório e áreas de colágeno através de análises histológicas após tratamento com AgNPs e ozonioterapia em feridas contaminadas por *E. coli* em ratos Wistar;
6. Quantificação da área de contração (%) de tecido epitelial após tratamento de AgNPs-Cur e ozonioterapia em feridas epiteliais contaminadas por *E. Coli* em ratos Wistar;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido à Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, e aprovado sob protocolo nº 28/2025 (ANEXO A) para realização dos procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7).

3.2 ANIMAIS

3.2.1 Desenho experimental

No total, foram utilizados 60 ratos Wistar com as seguintes características: machos com 60 dias de vida, com peso entre 250-300 g, provindos da colônia de reprodução do Biotério da UNESC. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (Comprimento 30 cm x Largura 20 cm x Altura 13 cm), distribuídos em 5 animais por caixa, colocados sobre estantes e sobre os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso. Os ratos receberam dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum*.

Os animais tiveram a região dorsal tricotomizada e logo após induzidos a lesão epitelial aguda e lesão epitelial contaminada com *E. coli*, de acordo com seus respectivos grupos. Foram distribuídos randomicamente em 5 grupos experimentais (n=12) sendo 5 animais para histologia, e o restante foi destinado para análises bioquímicas e moleculares.

- I. **Ferida Aguda;**
- II. **Ferida Contaminada (FC):** Aplicação de *E.coli* ($1,5 \times 10^8$ UFC);
- III. **FC + AgNPs-Cur:** *E. coli* ($1,5 \times 10^8$ UFC) + Nanopartículas de prata reduzidas com curcumina (125mg/L);
- IV. **FC + O₃:** *E. coli* ($1,5 \times 10^8$ UFC) + Ozonioterapia (25 µg/mL);
- V. **FC + AgNPs + O₃:** *E. coli* ($1,5 \times 10^8$ UFC) + Nanopartículas de prata reduzidas com curcumina (125mg/L) e ozonioterapia (25 µg/mL).

3.2.2 Indução da ferida e contaminação bacteriana

A bactéria *Escherichia coli* é amplamente utilizada como organismo modelo em estudos microbiológicos e de avaliação da atividade antimicrobiana de nanomateriais. Isso ocorre porque se trata de uma bactéria Gram-negativa bem caracterizada geneticamente, de fácil cultivo em laboratório e com rápido crescimento, o que permite padronização experimental e alta reprodutibilidade dos resultados. Além disso, sua estrutura de envelope celular, composta por membrana externa rica em lipopolissacarídeos, é representativa de muitas bactérias Gram-negativas patogênicas, tornando-a um modelo adequado para investigar mecanismos de ação de agentes antimicrobianos (Sondi & Salopek-Sondi, 2004; Pineda et al., 2024).

O modelo de lesão epitelial foi induzido como descrito por Mendes (2020). Em todos os animais foi retirado segmento de pele total no dorso dos animais. Os animais foram anestesiados com isoflurano 4%. A região medial-dorsal, entre a linha infraescapular e a cauda, foi removida com uma incisão cirúrgica de forma circular com diâmetro de aproximadamente 2 cm. As feridas foram uniformes em diâmetro, profundidade e localização.

A *Escherichia coli* (ATCC 11775) foi cultivada no dia anterior da indução da ferida em meio de cultura líquido Luria Bertani em estufa a 37°C. No dia da indução da ferida e da contaminação, a *E. coli* foi diluída até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland (absorbância entre 0,08 e 0,10 em comprimento de onda 625 nm) que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ (Kesici et al., 2019).

Nos grupos ferida contaminada, foi aplicado 1 mL de suspensão de *E. coli* ($1,5 \times 10^8$) diretamente sobre o leito da ferida. A utilização de *E. coli* como patógeno modelo é amplamente descrita na literatura para simular feridas infectadas, uma vez que sua presença está associada a processos inflamatórios exacerbados e retardo na cicatrização (Movaffagh et al., 2019).

3.2.3 Administração dos tratamentos

A partir de 48h da indução da ferida, os tratamentos com AgNPs foi aplicado diariamente por dez dias (dia 2 ao dia 13), totalizando 10 aplicações. O tratamento com ozonioterapia foi aplicado no mesmo período (10 dias), porém em dias alternados (48/48h) totalizando 5 aplicações, conforme descrito a baixo (figura 4):

- Ozonioterapia: Injeção subcutânea, com 5 pontos de aplicação ao redor da ferida, aplicando 500 uL por ferida (100uL por ponto) na concentração de 25 µg/mL (12,5 µg/ferida);

- AgNPs-Cur: Aplicação tópica sobre a ferida de 1ml do gel na concentração de 125mg/L, diariamente.

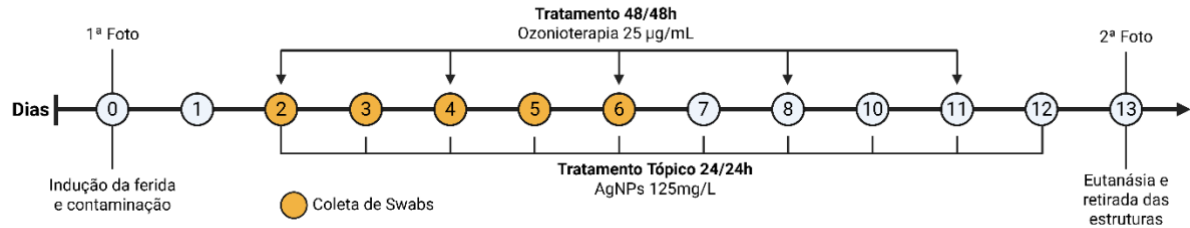


Figura 4: Desenho experimental. Fonte: Do autor, 2026.

O hidrogel AgNPs+Cur foi aplicado de forma tópica sobre a ferida, garantindo sua interação direta com o tecido lesado. O ozônio foi administrado em sequência, após as AgNPs-Cur no grupo associado. A concentração de 125mg/L foi definida por um estudo anterior, em que não apresentou citotoxicidade tanto *in vitro* como *in vivo* (Guzzatti et al., 2025).

A escolha da concentração e volume para a administração subcutânea do gás ozônio baseia-se em evidências científicas que indicam que concentrações entre 10 e 40 µg/mL promovem cicatrização acelerada, modulação inflamatória e angiogênese, sem efeitos citotóxicos. A concentração de 25 µg/mL tem sido apontada como ideal para estimular fibroblastos e formação capilar. Além disso, dose acima de 80 µg já foram associadas a efeitos deletérios, justificando a escolha do intervalo seguro adotado neste estudo. A segurança desse protocolo é confirmada por avaliações histológicas e bioquímicas que demonstram a preservação dos tecidos saudáveis e a ausência de eventos adversos, garantindo que os animais permaneçam vivos e saudáveis ao longo do experimento (Soares et al., 2019; Cardoso et al., 2024; Bocci et al., 2011; Lin et al., 2011).

3.2.4 Gerador de ozônio

Para a realização deste estudo, foi utilizado o gerador de ozônio medicinal Philozon Medplus V (Philozon, Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil), um equipamento projetado para a produção controlada de misturas gasosas de oxigênio e ozônio, de modo a garantir a precisão das concentrações aplicadas. O dispositivo possui registro na ANVISA (nº 80472910001), assegurando sua conformidade com as normas sanitárias e de segurança para uso em experimentação biológica.

O funcionamento do Philozon Medplus V baseia-se na geração de ozônio por meio da descarga elétrica controlada sobre uma corrente de oxigênio puro, um método amplamente descrito na literatura para obtenção de ozônio medicinal com alto grau de pureza e estabilidade. O gás produzido pelo equipamento é imediatamente disponibilizado para aplicação, sem necessidade de armazenamento prévio, uma vez que o ozônio tem uma meia-vida curta e se decompõe rapidamente em oxigênio molecular.

A escolha deste equipamento para o estudo deve-se à sua capacidade de fornecer concentrações ajustáveis de ozônio, garantindo a padronização necessária para a aplicação da dose experimental de 25 µg/mL. A regulação automática do fluxo de oxigênio associada ao controle eletrônico da concentração permitiu uma administração precisa do gás, reduzindo potenciais variações na aplicação. A presença do catalizador interno será um fator relevante para a escolha do dispositivo, pois possibilita a eliminação segura do ozônio residual, minimizando sua dispersão no ambiente e garantindo a integridade dos operadores e do sistema experimental.

3.2.5 Síntese verde das nanopartículas de prata

As AgNPs foram sintetizadas pela redução do sal AgNO₃ com Curcumina e estabilizados com Na₃C₆H₅O₇. Primeiramente, a solução será diluída em etanol (3mg/mL). 1mL de solução de Curcumina será adicionada em 29mL de água deionizada contendo Na₃C₆H₅O₇ (15mg). O pH foi ajustado (pH=11) usando uma solução de NaOH (0,01M). A solução será aquecida (90°C) e mantida sob agitação vigorosa. Em seguida, uma solução de AgNO₃ foi adicionada gota a gota e mantida sob agitação vigorosa até o resfriamento. A solução apresentará um amarelo escuro. A solução de AgNPs foi caracterizada por espectroscopia ultravioleta-visível (UV Vis), em um modelo SpectraMax Plus. As nanopartículas serão medidas na região do visível (390–700 nm). O tamanho e morfologia das nanopartículas foram realizados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) usando um JEM-1011 (100 kV). Uma gota da solução das nanopartículas foi adicionada a uma grade de cobre (300 mesh) coberta com uma fina camada de carbono. A secagem foi realizada em temperatura ambiente (24h) e posteriormente as imagens foram obtidas.

3.2.6 Eutanásia e coleta de amostras

Após 24 horas do último tratamento (Dia 13), os animais foram anestesiados com isoflurano a 4% e submetidos à eutanásia por decapitação na guilhotina. A pele ao redor da ferida foi coletada e armazenada a -80°C para análises bioquímicas e moleculares.

3.3 ANÁLISE DO TAMANHO DAS FERIDAS

O método fotográfico foi utilizado como uma alternativa precisa para a mensuração da área das feridas, sendo uma técnica apropriada para lesões limpas ou contaminadas. Imagens digitais das feridas foram capturadas com resolução de 3264×2448 pixels e analisadas pelo software IMAGEJ® 1.51. As imagens das lesões foram obtidas nos dias 0 e 13 do experimento, permitindo a verificação visual da evolução do processo de cicatrização e a mensuração do tamanho das feridas (área, comprimento e largura), com o cálculo da variação das áreas ao longo do período em porcentagem de contração (%). Todas as mensurações foram realizadas pelo mesmo pesquisador, sendo efetuadas cinco medições por ferida, com posterior cálculo do valor médio.

3.5 PROTOCOLO DE HISTOLOGIA

As amostras de tecido cutâneo foram embebidas em solução de paraformaldeído (PFA) a 10% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) por 24 horas. Posteriormente, foram desidratadas, clareadas e incluídas em parafina, sendo então seccionadas em cortes de $5 \mu\text{m}$ de espessura. Para a avaliação e quantificação do infiltrado inflamatório, foi utilizada a coloração de hematoxilina e eosina (HE), enquanto a quantificação da porcentagem da área de colágeno foi realizada por meio da coloração com tricrômio de Gomori.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA) com aumento de 400x, sendo capturados quatro campos oculares por corte, em um total de cinco animais por grupo. As imagens foram registradas utilizando a câmera Nikon Sight DS-5M-L1 (Melville, NY, EUA) e analisadas por meio do software NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA).

A contagem do infiltrado inflamatório foi realizada utilizando o plugin "Cell Counter" do software ImageJ, considerando a coloração nuclear das células inflamatórias. A quantificação da área de colágeno será determinada por meio do plugin "Colour

Deconvolution", que permite decompor a imagem em três canais de cores, possibilitando a quantificação da porcentagem de coloração azul em relação à área total da amostra.

3.7 RT-qPCR

A análise de expressão gênica de Col I, VEGF, NRF2 e HIF-1 α na ferida foi realizada através de PCR – Real Time. O RNA total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies) e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. O RNA obtido foi solubilizado em 30 μ l de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20°C. O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria em absorbância a 260nm e 280nm. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm estiverem entre 1,8 e 2,0. Logo após, o DNA complementar foi sintetizado através da transcriptase reversa M-MLV, que promove uma fita de DNA complementar a partir de RNA de fita simples. A parte final inclui a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, por meio do sistema do corante SYBR Green, que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação.

3.8 IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

A fim de determinar a concentração de citocinas inflamatórias nos tecidos de interesse, foi realizado um imunoenensaio de imunoabsorvância enzimática (ELISA sanduíche indireto - DuoSet ELISA), utilizando amostras das estruturas avaliadas em duplicata. Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas em tampão. Em seguida, as placas de ELISA foram sensibilizadas com um anticorpo de captura específico (diluição 1:100) e incubadas overnight a 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween 20 e NaCl), bloqueadas com ELISA/ELISPOT Diluent e incubadas por uma hora à temperatura ambiente. As amostras de tecido foram pipetadas em duplicata (100 μ L) sobre os respectivos anticorpos de captura. Após duas horas de incubação, as placas foram submetidas a uma nova lavagem para remoção de ligações inespecíficas. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo de detecção, que se ligará aos antígenos da amostra, formando um sanduíche de anticorpo-antígeno. Após nova incubação à temperatura ambiente e subsequente lavagem, foi adicionada uma solução contendo enzima peroxidase (HRP), seguida da adição do substrato cromogênico

tetrametilbenzidina (TMB), que, na presença da HRP, resultou na formação de uma coloração azul específica. Para interromper a reação, será adicionado 50 µL de ácido sulfúrico diluído por poço. A concentração das citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4) e dos fatores de crescimento (TGF- β) foi determinada por meio da leitura da absorbância a 450 nm em um espectrofotômetro (BIO-RAD, 680).

3.9 ANÁLISES OXIDATIVAS

3.9.1 Quantificação de oxidantes

A produção de hidroperóxidos foi determinada por meio da formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFHDA), resultante da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) por espécies reativas de oxigênio (EROs), conforme descrito por Dong (2010).

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada espectrofotometricamente por meio da quantificação de seu metabólito estável, nitrito. Para mensurar a concentração de nitrito, as amostras foram incubadas com o reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1-(naftil)-etilenodiamina) à temperatura ambiente por 10 minutos, e a absorbância será medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base em uma curva padrão de 0 a 100 nM, utilizando como referência o metabólito nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados são expressos em µmol de nitrito/mg de proteína, conforme metodologia descrita por Chae et al. (2004).

3.9.2 Marcadores de danos oxidativos

O dano oxidativo de proteínas foi determinado mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Foram adicionados 400µL de DNPH (10 mM em 0,5 M H₃PO₄) em 400µL do homogeneizado da amostra, após 10 minutos de incubação, foram adicionados 200µL de NaOH (6 M). A absorbância foi lida em 450nm após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente. A concentração de carbonila foi encontrado usando o coeficiente de absorção molar de 22.000 M⁻¹ cm⁻¹ (Mesquita et al. 2014).

Para a determinação dos grupamentos tióis totais na amostra, foi utilizado o reagente 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato) (DTNB), que reduz os grupos tióis, formando um derivado amarelo (ácido 2-nitro-5-tiobenzoico, TNB), cuja absorbância será mensurada

espectrofotometricamente a 412 nm em um aparelho Spectramax, conforme metodologia descrita por Aksenov e Markesbery (2001).

3.9.3 Atividades das enzimas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina, com medida espectrofotométrica a 480 nm, conforme descrito por Bannister e Calabrese (1987). As amostras de homogenizado de tecido epitelial foram preparadas em tampão de glicina, e volumes de 5, 10 e 15 μ L foram retirados para análise. A reação ocorreu com a adição de 5 mL de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), 175-185 mL de tampão de glicina (0,75 g em 200 mL de água destilada a 32°C, pH 10,2) e 5 μ L de adrenalina (60 mM em água destilada + 15 mL/mL de HCl fumegante). As leituras foram realizadas por 180 segundos, em intervalos de 10 segundos, utilizando um leitor de ELISA a 480 nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados conforme descrito por Hissin e Hilf (1976), com adaptações. O GSH foi quantificado no homogenizado de tecido epitelial após precipitação de proteínas com 1 mL de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra, foi adicionado tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4, e 500 μ M de DTNB. A absorbância foi lida a 412 nm após 10 minutos. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi utilizada para o cálculo dos níveis de GSH nas amostras.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA BACTERIANA NA FERIDA

Para avaliar a eficácia do tratamento das feridas infectadas, foi realizado a quantificação de colônias bacterianas viáveis. Inicialmente, swabs estéreis foram umidificados com soro fisiológico estéril para garantir a máxima coleta de material bacteriano da lesão (n=5). A coleta foi realizada cuidadosamente, passando o swab diretamente sobre a superfície da ferida, assegurando uma amostragem uniforme das bactérias presentes no tecido.

Após a coleta, cada swab foi inoculado em um tubo contendo 10 mL de soro fisiológico estéril, permitindo a suspensão das bactérias no meio líquido para facilitar a subsequente manipulação e cultivo. A suspensão bacteriana foi homogeneizada e utilizada para semeadura em placas de ágar Mueller Hinton. Foi semeado na placa 100 μ L da suspensão

bacteriana homogeneizada e utilizado a técnica de espalhamento, garantindo uma distribuição uniforme das bactérias sobre o meio de cultura.

As placas inoculadas foram incubadas em estufa microbiológica a 36°C por 24 horas. Após o período de incubação, a contagem de colônias bacterianas foi realizada manualmente com o auxílio de uma lupa e contador de colônias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC), e a eficácia dos diferentes tratamentos será avaliada com base na redução da carga bacteriana nos grupos experimentais.

3.11 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS

O teor de proteína foi realizado a partir do homogeneizado da ferida e foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry et al., (1951). Após o reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico (folin fenol) ser adicionado para ligar-se à proteína o reagente foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul e a absorbância foi lida a 750nm.

3.12 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA one-way), seguida do teste post hoc de Tukey, para comparação entre os grupos experimentais. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $p < 0,05$. Foi utilizado o GraphPad Prism 7 como pacote estatístico.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Ao realizar uma espectrometria de varredura (UV-Vis) nas nanopartículas de prata, foi encontrado um pico de absorbância em 430 nm (Figura 5A). Na análise por MET, foi possível observar nanopartículas com uma média de 23 ± 6 nm (Figura 5B).

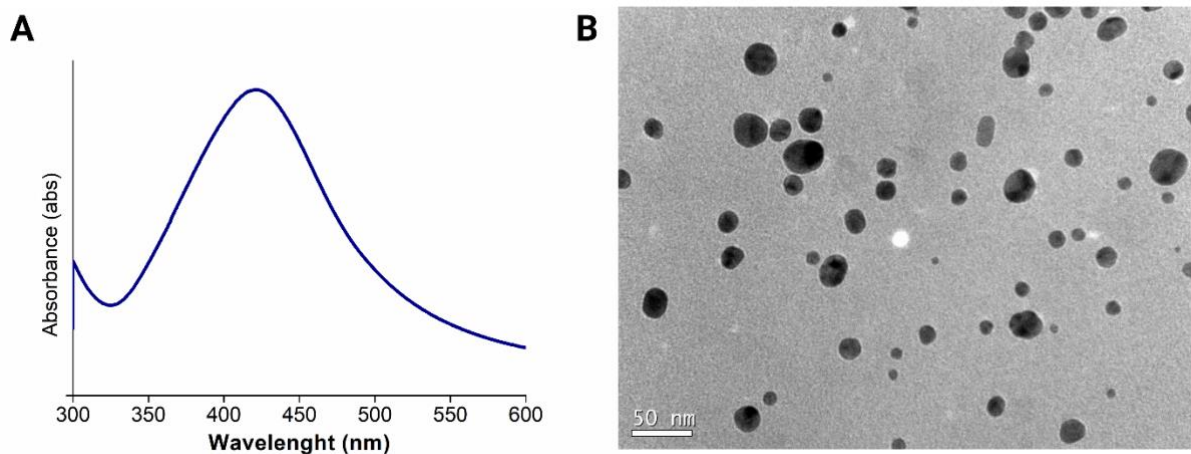


Figura 5: Caracterização das AgNPs-Cur. Em A, o gráfico de leitura por espectrofotometria de varredura. Em B, uma imagem representativa das AgNPs-Cur realizada por MET.

4.2 CARGA BACTERIANA NA FERIDA

Na quantificação da carga bacteriana de *E. coli* na ferida (Figura 6), é possível observar que no dia 1 (6A) os grupos em que houve a indução de *E. coli* estão sem diferença estatística (visto que ainda não havia iniciado os tratamentos). Do dia 2 até o dia 4, os grupos três grupos com tratamento demonstraram uma diminuição significativa em relação ao grupo apenas FC. No dia 5 (6E) apenas os grupos FC+O₃ e FC+AgNPs-Cur+O₃ continuaram demonstrando uma diminuição significativa em relação ao grupo FC.

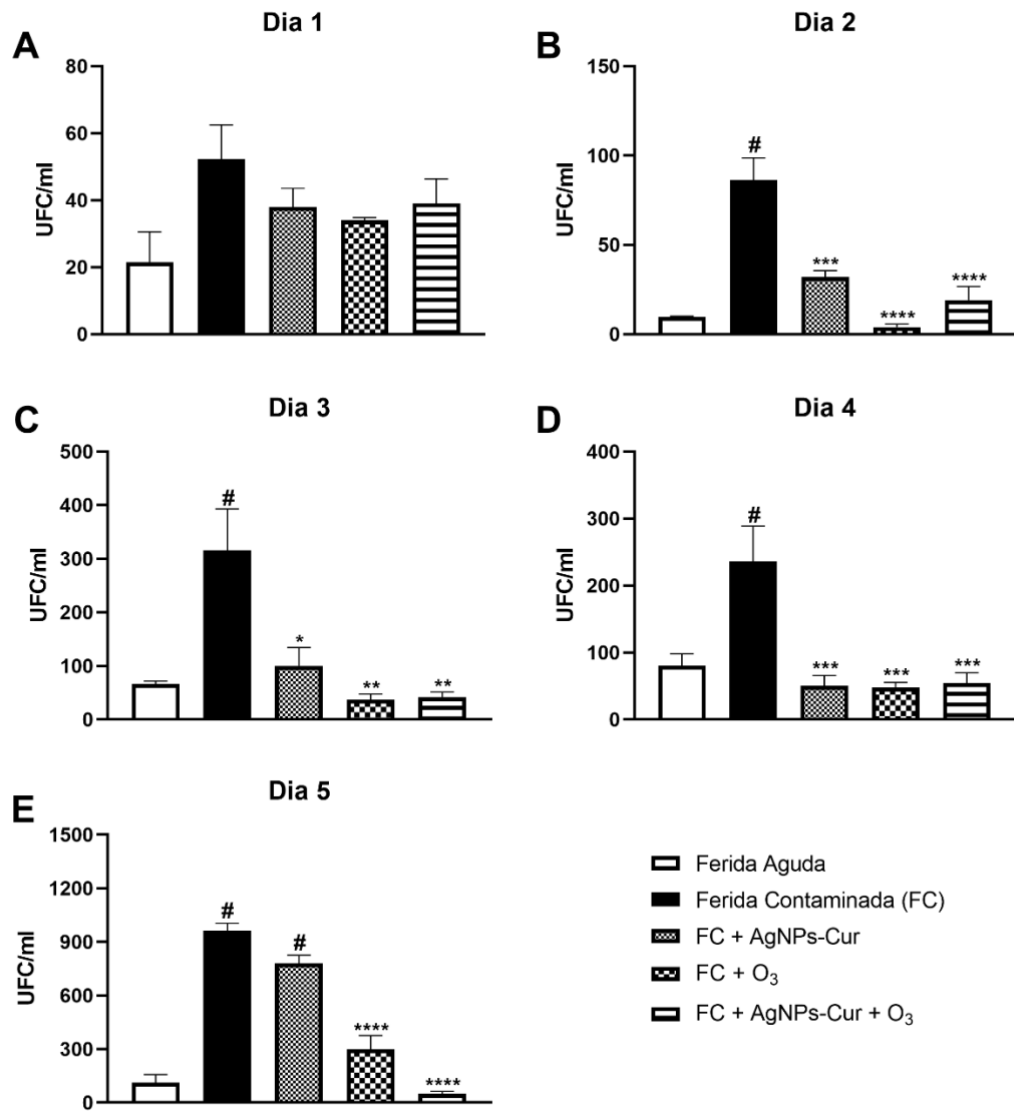


Figura 6: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de UFC em feridas contaminadas com *E. coli* durante os cinco primeiros dias de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: # $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Aguda; * $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Contaminada; ** $p < 0,01$ v.s grupo Ferida Contaminada; *** $p < 0,001$ v.s grupo Ferida Contaminada e **** $p < 0,0001$ v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).

A figura 7 demonstra o crescimento bacteriano nos meios de cultura Mueller Hinton em imagens representativas de cada grupo ao longo dos cinco primeiros dias de tratamento.

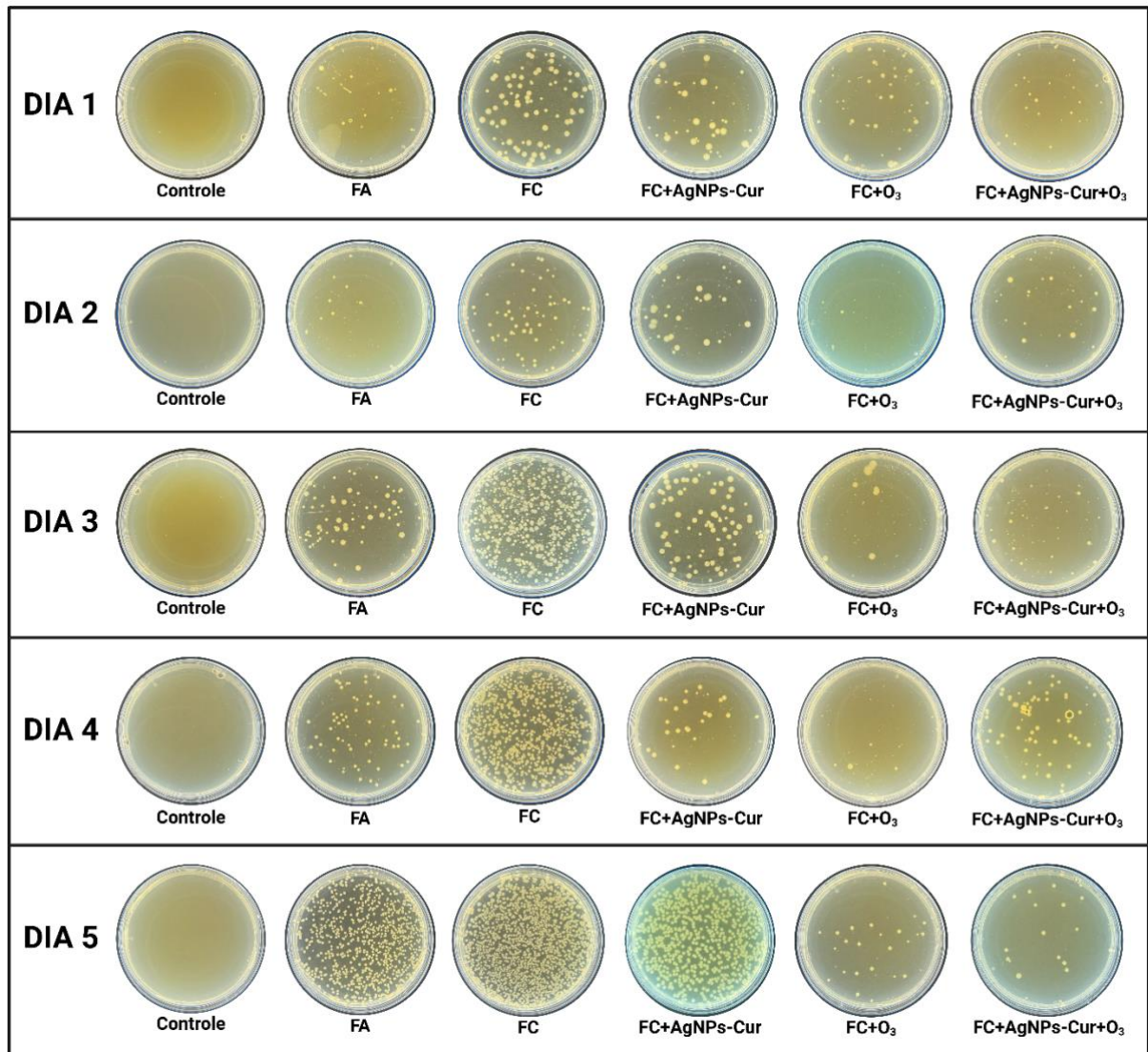


Figura 7: Imagens representativas dos efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de carga bacteriana em feridas contaminadas com *E. coli* durante os cinco primeiros dias de tratamento. Cada ponto nas placas com meio de cultura Mueller Hinton é correspondente a uma UFC de bactéria.

4.3 CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS

Na figura 8, temos a quantificação do conteúdo proteico de citocinas pró e anti-inflamatórias por imunoenensaio enzimático. Na análise das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , o grupo FC apresentou aumento em relação ao grupo Ferida Aguda ($p < 0,05$). Nos grupos com tratamento, o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ foi o único a não apresentar diferença significativa em relação ao grupo Ferida Aguda em ambas as citocinas inflamatórias (Figura 8A e 8B).

Na citocina IL-10 (8C), o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ foi o único a demonstrar aumento significativo em relação ao grupo FC ($p<0,05$). Já na citocina IL-4 (8D), os grupos FC+O₃ e FC+AgNPs-Cur+O₃ demonstraram aumento significativo, tanto em relação com o grupo FC, como também com o grupo Ferida Aguda ($p<0,05$). Na análise do fator de crescimento TGF- β (8E), apenas o grupo FC+AgNPs-Cur demonstrou aumento em relação ao grupo Ferida Aguda ($p<0,05$) e ao grupo Ferida Contaminada ($p<0,01$).

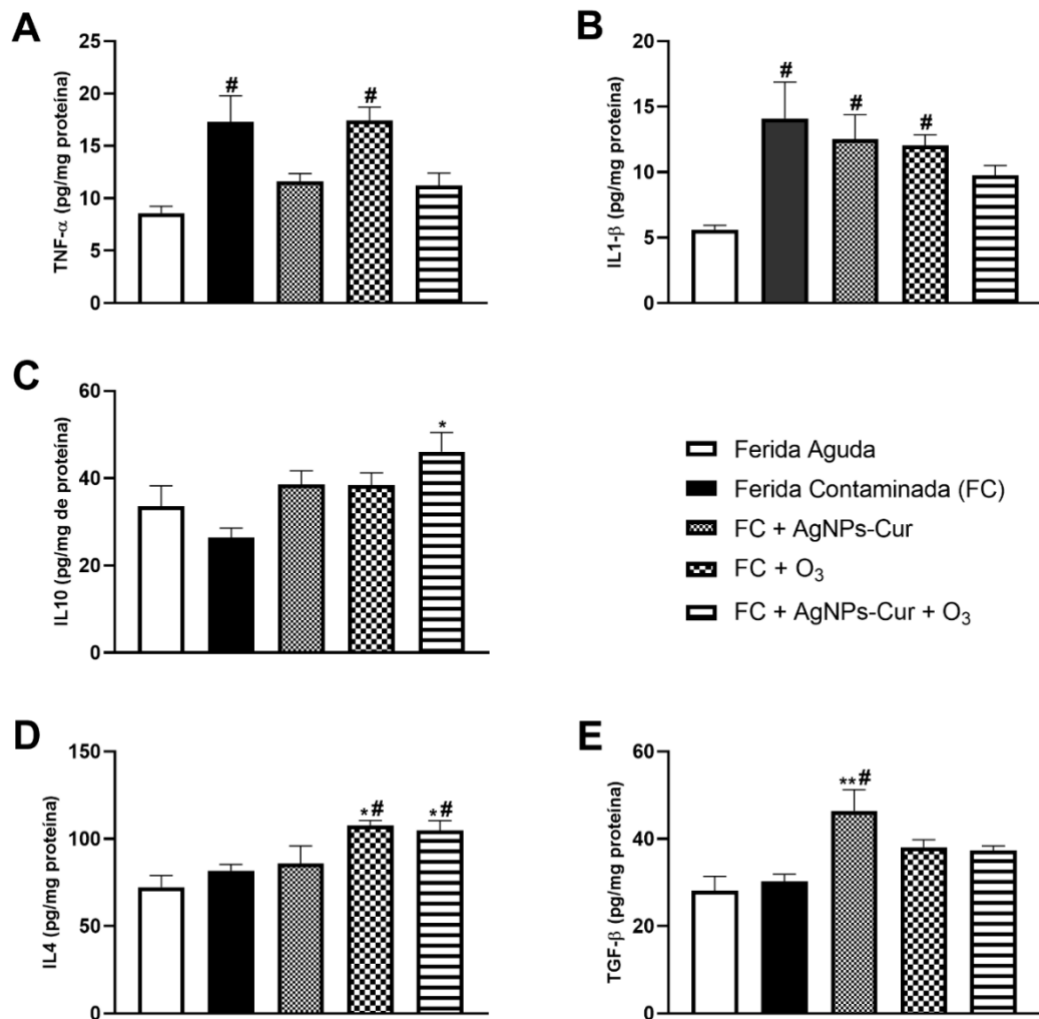


Figura 8: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e fator de crescimento em feridas contaminadas com *E. coli* após o 10^o dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: # $p<0,05$ v.s grupo Ferida Aguda; * $p<0,05$ v.s grupo Ferida Contaminada e ** $p<0,01$ v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).

4.4 DANO OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Ao avaliar o dano oxidativo através do carbonil e do conteúdo de sulfidrila (Figura 9A e 9B), apenas o grupo de tratamento associado FC+AgNPs-Cur+O₃ demonstrou diferença significativas em comparação com o grupo FC, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente. No resultado dos antioxidantes SOD e GSH (Figura 9C e 9D), os resultados apresentam o mesmo perfil, sendo o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ o único a demonstrar aumentos significativos, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente, em comparação com o grupo FC.

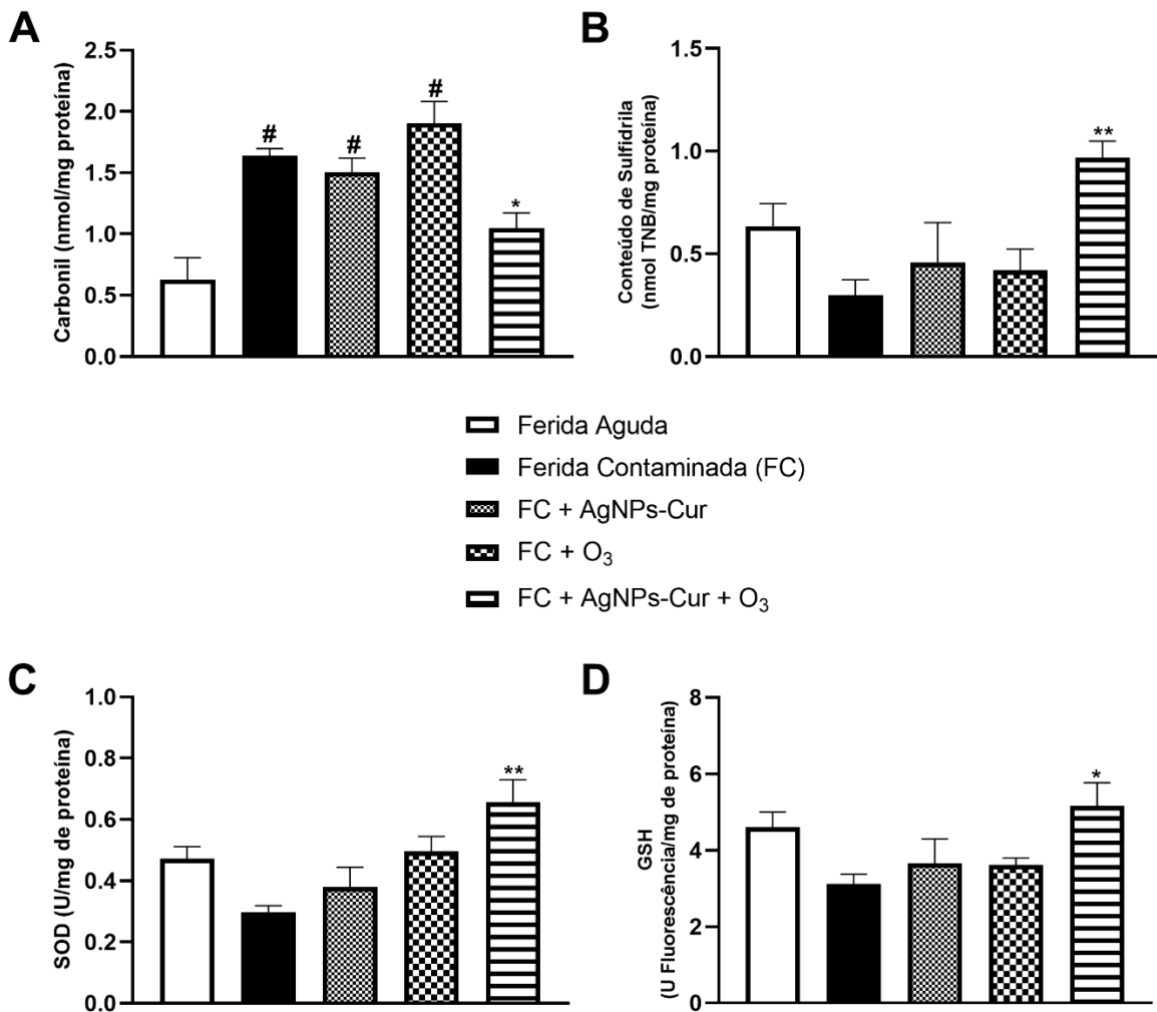


Figura 9: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de dano oxidativo (carbonil e sulfidrila) e antioxidantes (SOD e GSH) em feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: # $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Aguda; * $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Contaminada e ** $p < 0,01$ v.s grupo FC (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).

4.5 OXIDANTES

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio foram avaliadas através da quantificação de DCF e Nitrito (Figura 10). O resultado de DCF (10A) demonstrou um aumento no grupo Ferida Contaminada em relação ao grupo Ferida Aguda ($p < 0,05$), enquanto que todos os grupos com tratamento demonstraram diminuição em relação ao grupo FC ($p < 0,05$). Na avaliação de nitrito (10B), o grupo FC também demonstrou aumento, mas apenas os grupos FC+AgNPs-Cur e FC+AgNPs-Cur+O₃ demonstraram diminuição significativa, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente.

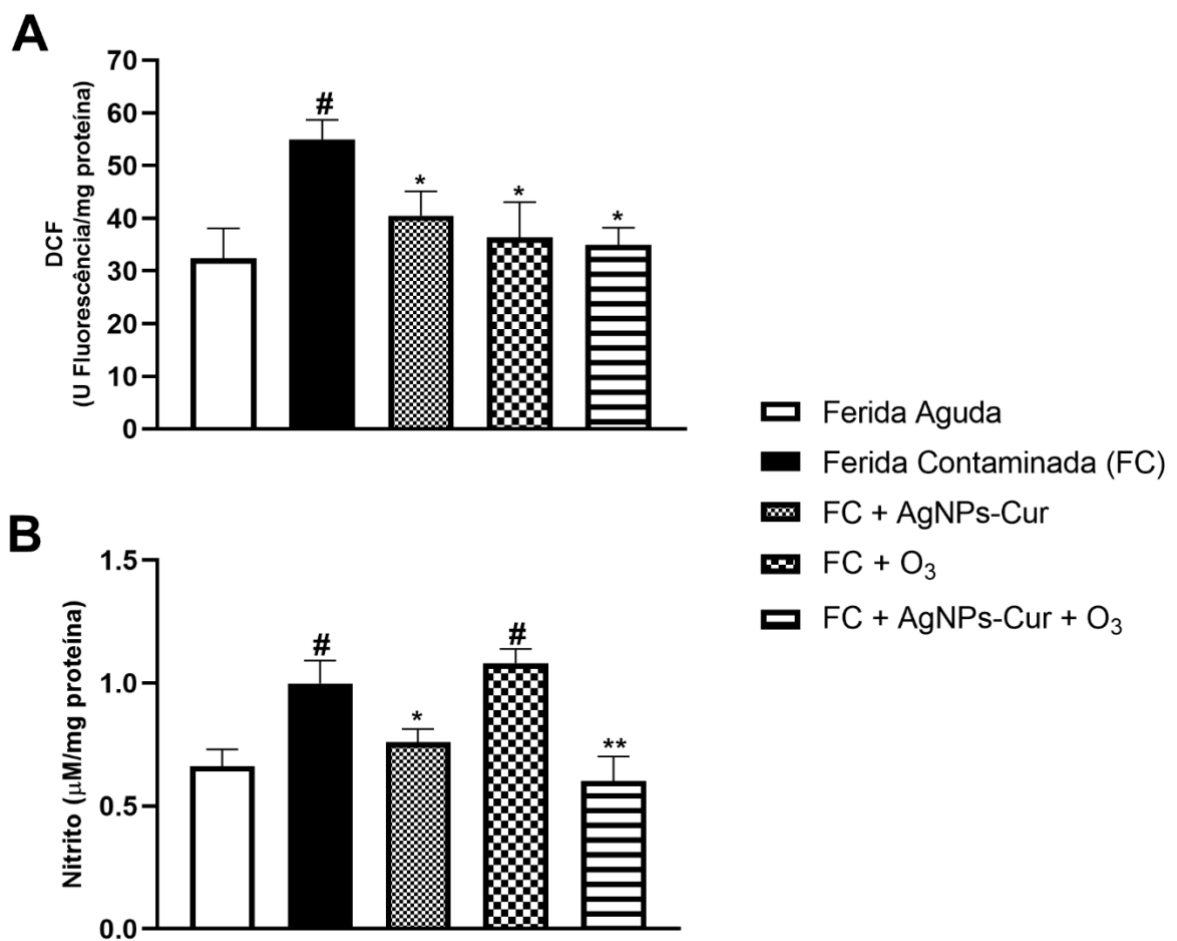


Figura 10: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de DCF e Nitrito em feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: [#] $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Aguda; ^{*} $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Contaminada e ^{**} $p < 0,01$ v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).

4.6 RT-qPCR

Nas análises de expressão gênica relativa de Col I e VEGF, não foi encontrado diferenças estatísticas entre os grupos analisados (Figura 11A e 11C). Ao analisar a expressão de NRF2, foi possível observar uma diminuição no grupo FC em relação ao grupo Ferida Aguda ($p < 0,05$) e aumento significativo dos grupos FC+O₃ ($p < 0,05$) e FC+AgNPs+O₃ ($p < 0,01$) em relação ao grupo FC (Figura 11B). Por último, ao avaliar o HIF-1 α , o grupo FC apresentou uma redução na expressão em comparação ao grupo Ferida Aguda ($p < 0,05$), enquanto que os grupos tratados, FC+O₃ ($p < 0,01$) e FC+AgNPs+O₃ ($p < 0,001$), apresentaram aumento significativo em relação ao grupo FC (Figura 10D).

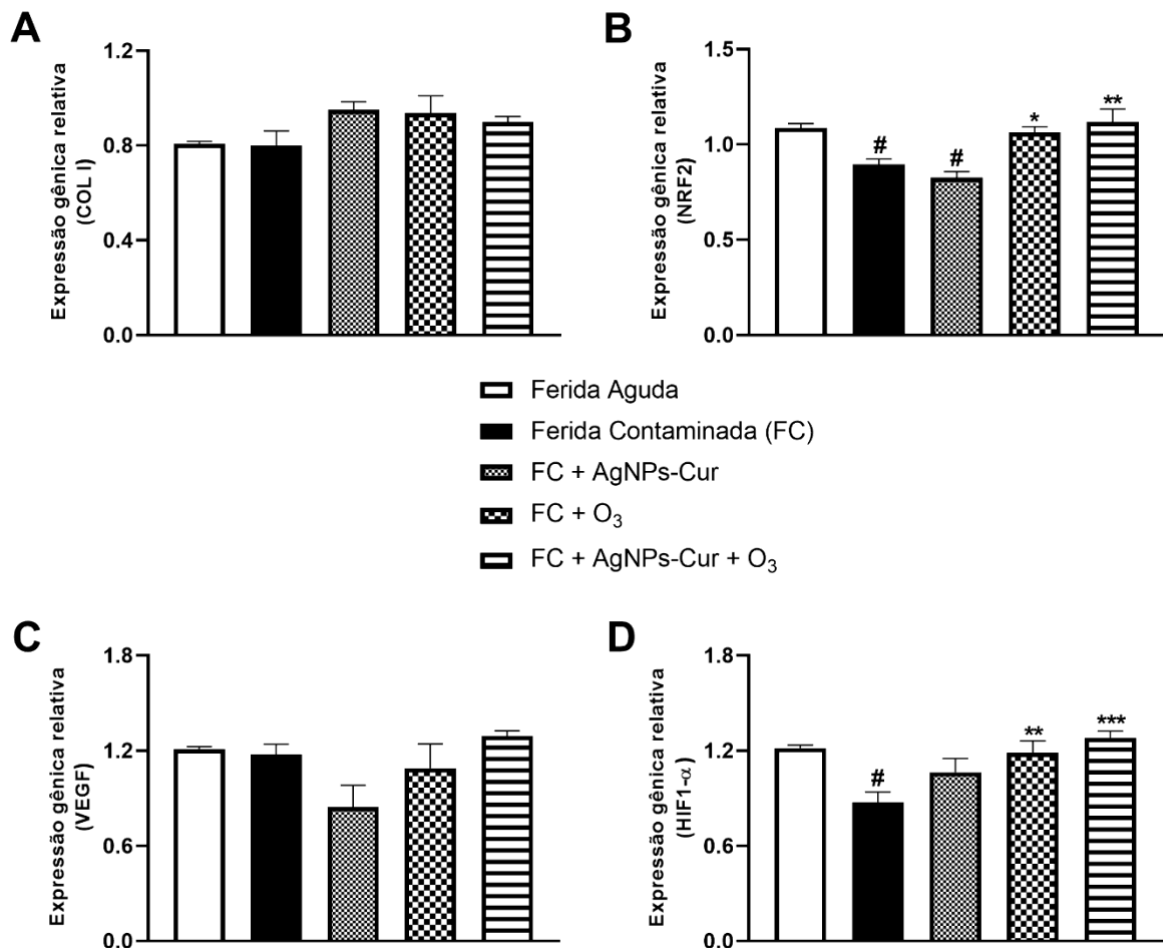


Figura 11: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na quantificação de Col I, NRF2, VEGF e HIF-1 α através de PCR em feridas contaminadas com *E. coli* após o 10^o dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: # $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Aguda; * $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Contaminada; ** $p < 0,01$ v.s grupo Ferida Contaminada e *** $p < 0,001$ v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em relação as análises histológicas da ferida (Figura 12), na quantificação do infiltrado inflamatório (12B) é possível observar um aumento no grupo FC ao comparar com o grupo Ferida Aguda ($p < 0,05$). Nos grupos FC+AgNPs-Cur e FC+O₃ mostram que houve uma diminuição em relação ao grupo FC ($p < 0,001$), já o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ obteve uma diminuição mais significativa ($p < 0,0001$). Na avaliação da porcentagem de área de colágeno (12D), apenas o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ demonstrou um aumento significativo em relação ao grupo FC ($p < 0,0001$).

As imagens representativas de cada grupo estão expostas para ajudar a visualização dos resultados. Juntamente com os gráficos, é possível visualizar o infiltrado inflamatório (12A) e a porcentagem de área de colágeno (12C) das feridas nas imagens representativas.

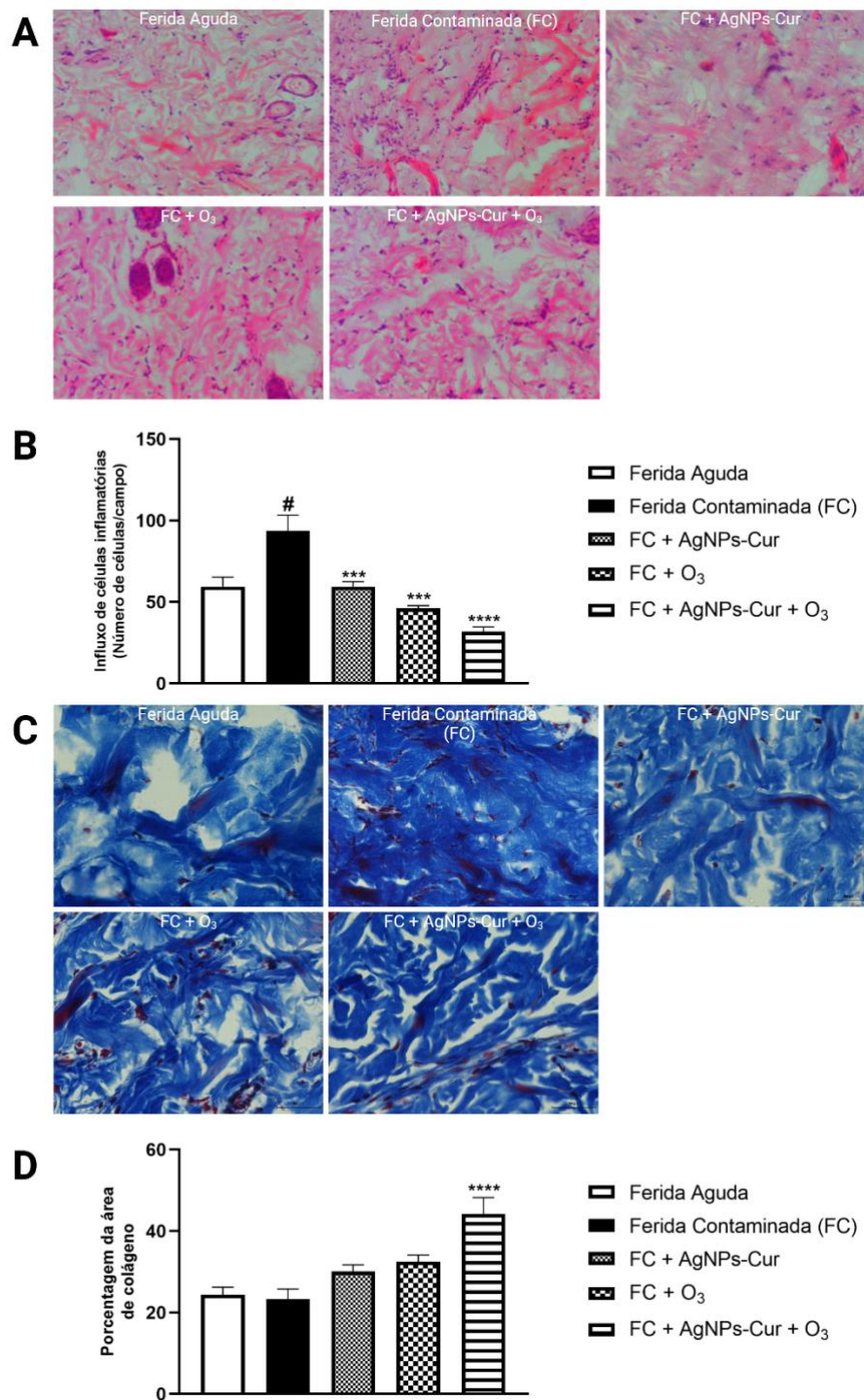


Figura 12: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na análise histológica de infiltrado inflamatório (coloração HE) e porcentagem de área de colágeno (coloração Tricômio de Gomori) de feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Em A, imagens representativas do infiltrado inflamatório com coloração HE (400x); Em B, a contagem média de infiltrado inflamatório; Em C, imagens representativas da área de colágeno com coloração de Tricômio de Gomori (400x); E em D, a porcentagem média da área de colágeno. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: # $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Aguda; *** $p < 0,001$ v.s grupo Ferida Contaminada e **** $p < 0,0001$ v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).

4.8 CONTRAÇÃO DA FERIDA

Em relação ao percentil de contração de ferida (Figura 13) pode-se observar uma diminuição significativo da contração no grupo FC em relação ao grupo Ferida Aguda ($p < 0,05$). Já os grupos tratados tiveram um aumento significativo da contração, sendo que o grupo FC+O₃ teve $p < 0,01$, enquanto que os grupos FC + AgNPs-Cur e FC + AgNPs-Cur+O₃ tiveram maior diferença estatística, com $p < 0,001$.

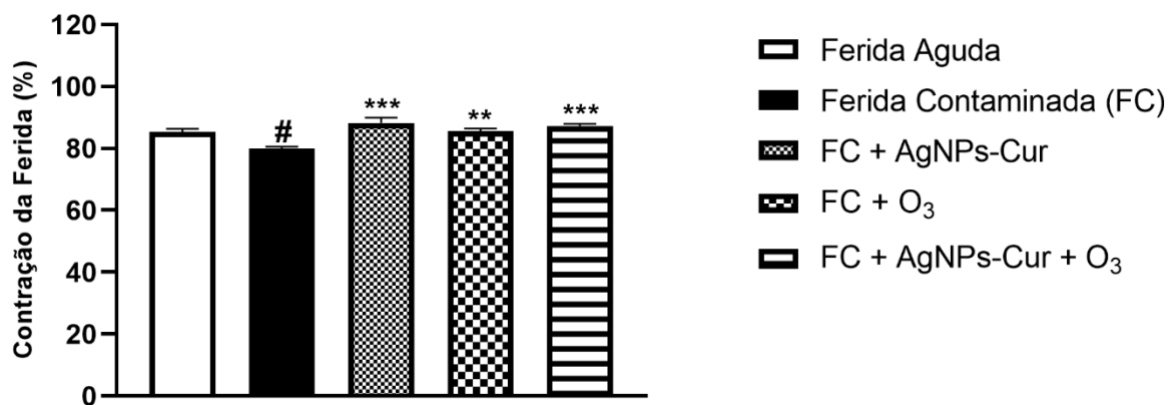


Figura 13: Efeitos do tratamento com AgNPs-Cur, Ozonioterapia e AgNPs-Cur + Ozonioterapia na porcentagem de contração de feridas contaminadas com *E. coli* após o 10º dia de tratamento. Os dados são apresentados em média+EPM, no qual: # $p < 0,05$ v.s grupo Ferida Aguda; ** $p < 0,01$ v.s grupo Ferida Contaminada e *** $p < 0,001$ v.s grupo Ferida Contaminada (ANOVA de uma via seguido de test *post hoc* Tukey).

5. DISCUSSÃO

A infecção em feridas é raramente apontada como a causadora da lesão, porém a presença de patógenos e sua colonização na ferida aberta pode levar a complicações e condições clínicas prolongadas que tem consequências significativas para a saúde e economia. É reconhecido que o risco de infecção aumenta juntamente com o aumento da carga bacteriana, sendo que as cargas microbianas $>10^6$ células viáveis/mL estão associadas ao aumento do risco de infecção. A progressão da infecção na ferida pode gerar um aumento de até 70% no custo do atendimento e argumenta-se que em até 40% dos pacientes, a infecção da ferida é a causa do prolongamento do processo de cicatrização (Dissemond et al., 2025; Hurlow & Bowler, 2022).

As AgNPs e o ozônio já são conhecidas na literatura pelos seus efeitos antimicrobianos e vem sendo muito utilizadas como material de estudo para terapias alternativas de tratamento de feridas contaminadas (Qubtia et al., 2024; Bialomyzy et al., 2025). Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento combinado de ozônio com AgNPs biossintetizadas com curcumina em feridas epiteliais contaminadas por *Escherichia coli* em ratos Wistar.

Para utilização das AgNPs, a caracterização físico-química de nanopartículas de prata é essencial para aplicações biomédicas, pois propriedades como atividade antimicrobiana, estabilidade coloidal e interação com tecidos dependem diretamente do tamanho e da morfologia das nanopartículas (Rai & Yadav & Gade, 2009). Além do tamanho, a morfologia das nanopartículas influencia significativamente seu desempenho biológico. Diferentes geometrias, como estruturas esféricas, prismáticas e bastonetes, apresentam variações na reatividade química e na interação com membranas bacterianas, resultando em diferenças na atividade antimicrobiana (Pal & Tak & Song, 2007). Dessa forma, a utilização combinada de técnicas de caracterização, como microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia UV-Vis, é amplamente recomendada para determinar tamanho, forma e estabilidade das nanopartículas, parâmetros fundamentais para prever seu comportamento em sistemas biológicos (Irvani et al., 2014).

As absorvâncias das nanopartículas de prata foram avaliadas na faixa de luz visível (390–700 nm), alcançando um pico de absorvância de 430 nm, característico de nanopartículas de prata na faixa de tamanho entre 10 e 40nm, e confirmado através da microscopia eletrônica (Guzzatti et al., 2025; Zhang et al., 2016; Asif et al., 2022). Uma pesquisa anterior, realizada por Guzzatti et al. (2025), já havia demonstrado que nanopartículas de prata com este tamanho

e morfologia esférica não apresentam citotoxicidade *in vitro* e demonstraram efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, possibilitando a sua aplicação biológica. Estudos também demonstraram que nanopartículas com dimensões na faixa de 20 a 50 nm apresentam elevada área superficial e maior eficiência antimicrobiana, favorecendo seu uso no controle de infecções em feridas (Rai & Yadav & Gade, 2009).

Em um estudo clínico realizado por Bessa et al. (2015), a *E. coli* foi documentada como uma das cinco espécies bacterianas mais comuns causadoras de infecção em feridas hospitalares, também demonstrando resistência a maioria dos antibióticos. A *E. coli* é capaz de induzir inflamação e retardar a cicatrização da ferida através da ativação do sistema imune inato pelos Receptores Tipo Toll (TLRs). Essa família de receptores é capaz de reconhecer diversas moléculas de microorganismos, como o lipopolissacarídeo (LPS), que é uma das moléculas mais abundantes bacteriana (Amemiya et al., 2021). Em seguida, ativar as vias de sinalização fator nuclear- κ B (NF- κ B) ou quinases proteínas ativadas por mitógenos (MAPK) através do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88). As vias de sinalização TLRs-NF- κ B/MAPK são as principais vias envolvidas no processo inflamatório e na resposta da imunidade inata ativada por microrganismos (Shen et al., 2024).

O aumento das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , nos grupos em que houve a aplicação da solução com *E. coli*, pode estar correlacionado com a ativação da via TLRs-NF- κ B/MAPK, que leva a transcrição destas citocinas (Mantsounga et al., 2022). A citocina IL-1 β é capaz de estimular o aumento do infiltrado inflamatório, ativação de macrófagos com fenótipo M1 e liberação de metaloproteases (MMPs) que degradam a matriz extracelular e atrasam a cicatrização (Silva et al., 2022; Zaccaron et al., 2024). Um estudo publicado por Wang et al., (2024) já havia demonstrado a capacidade da *E. coli* de induzir inflamação em feridas, assim como o atraso na cicatrização e produção de colágeno.

Os macrófagos recrutados para o tecido lesado trocam seu fenótipo de acordo com as condições do meio em que se encontram. A presença de LPS, TNF- α e IL-1 β servem de estímulo para a polarização do macrófago M1. Este, é responsável pela produção de diversos mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e intermediários reativos de nitrogênio (NO) e oxigênio (EROs) que os ajudam na limpeza do tecido e defesa contra os microrganismos (Liu et al., 2014).

Quando comparamos os resultados, em geral, do grupo Ferida Contaminada com o grupo Ferida Aguda, é possível observar toda essa reatividade imunológica contra a *E. coli*.

Porém, nos grupos que receberam tratamento com AgNPs-Cur e O₃, foi possível ver mudanças significativas em diversas análises realizadas.

Ultimamente as AgNPs vem sendo muito estudadas pelo seu conhecido efeito antimicrobiano, inclusive com bactérias multirresistentes (El-Kattan et al., 2022; Luanda et al., 2024). Acredita-se que a atividade antimicrobiana das nanopartículas acontece pela liberação de cátions de prata, no qual, esses íons conseguem se fixar na parede celular bacteriana carregada negativamente e levam-na à ruptura, desnaturação proteica e morte celular (Jain et al., 2021). Já o ozônio age invadindo as bactérias, oxidando glicoproteínas e glicolipídios, afetando as funções enzimáticas e danificando o DNA e RNA, perturbando os processos metabólicos e reprodutivos dos microrganismos (Liu et al., 2023). Essa ação já foi amplamente estudada e confirmada por diversas pesquisas (Donato et al., 2024; Blanc et al., 2025; Al Rajhi et al., 2024). No presente estudo, o grupo FC+AgNPs-Cur-O₃ demonstrou uma redução mais significativa e constante ao longo dos dias na quantidade de UFC presentes na ferida, que pode significar que os diferentes mecanismos de ação antimicrobianos das AgNPs e do ozônio podem ter uma ação conjunta para combater a *E. coli* na infecção.

Apesar do foco principal das AgNPs-Cur estarem no seu efeito antimicrobiano, pesquisas, como as realizadas por Sharma et al. (2017) e Wang et al. (2025a), demonstraram algumas atividades biológicas anti-inflamatórias, antioxidantes e pró-cicatrização. Nesses estudos citados, as AgNPs foram capazes de inibir a translocação nuclear do NF- κ B e posteriormente a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6. Essa imunoregulação, exerce papel importante no processo de cicatrização da ferida. Enquanto que o ozônio exerce seu efeito anti-inflamatório, através redução do ligante 2 da quimiocina (motivo C-C) (CCL2), também conhecida como MCP-1, com consequente redução da migração de células inflamatórias para o local da lesão e, diminuição de citocinas pró-inflamatórias (Tartari et al., 2021; Kaneki et al., 2023; Russo et al., 2024).

Na presente pesquisa, apesar de os resultados das citocinas pró-inflamatórias nos grupos tratados não apresentarem diminuição significativa em relação ao grupo FC, o grupo FC+AgNPs-Cur não demonstrou aumento de TNF- α em relação ao grupo Ferida Aguda, enquanto que o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ não teve aumento de TNF- α e IL-1 β . Além disso, o grupo FC+AgNPs-Cur+O₃ apresentou aumento significativo em relação ao grupo FC nas citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4, demonstrando um possível efeito anti-inflamatório já apresentado em um estudo anterior (Guzzatti et al., 2025). Além disso, o efeito anti-inflamatório dos tratamentos pode explicar os resultados dos oxidantes e da contração de ferida, visto que o

processo inflamatório exacerbado está intimamente ligado ao atrasado da cicatrização e aumento da produção de oxidantes (Peña & Martin, 2024).

Constantemente, a ozonioterapia é apresentada na literatura como um tratamento antioxidante e anti-inflamatório em doses terapêuticas, apesar de que, também, oxidante e pró-inflamatória em doses não-terapêuticas. Isso acontece por que após a aplicação do ozônio no organismo, ele produz de forma rápida e transitória o peróxido de hidrogênio, que está associado à ativação da ERK1/2, da P38. O ozônio também foi capaz de regular positivamente a expressão de Nrf2, isso se dá pela capacidade de modificar os resíduos de cisteína Keap1, que resulta na transcrição de genes antioxidantes através do Nrf2, regulando enzimas e peptídeos antioxidantes como a SOD e GSH (Wang et al., 2018; Siniscaldo et al., 2018; Kim & Cha & Surh, 2010). O ozônio também se dissolve no organismo e reage com ácidos graxos, induzindo segundos mensageiros, como o 4-HNE, que, por sua vez, estimulam a autorregulação do sistema oxidante. Os mecanismos antioxidantes do ozônio são baseados na produção de oxidantes em pequenas quantidades para estimular uma resposta antioxidante do organismo (Clavo et al., 2019). Os resultados encontrados na atual pesquisa podem sugerir que a dose utilizada apresentou-se estar na faixa terapêutica, visto a diminuição dos antioxidantes e aumento de citocinas anti-inflamatórias.

As AgNPs-Cur também demonstraram efeitos antioxidantes, isso pode ter ocorrido devido a ação da curcumina em eliminar os radicais livres através da doação de prótons ou elétrons dos grupos fenólicos OH ou CH₂. As AgNPs quando reduzidas com curcumina, contém uma estrutura fenóxica e ligações duplas conjugadas que podem capturar e remover radicais. Além disso, ocorre a regulação positiva do Nrf2, com aumento da expressão de genes antioxidantes, como SOD e GSH (Malek & Arasteh, 2025; Bhatti et al., 2022). Apesar de isoladamente as AgNPs-Cur e a ozonioterapia não terem aumentado SOD e GSH, o grupo associado aumentou, demonstrando um possível sinergismo antioxidante entre as duas terapias.

Oxidantes, como EROs e ERNs, estão envolvidos na defesa imunológica inata contra patógenos invasores, onde essas espécies são produzidas por macrófagos e neutrófilos para destruir os microrganismos. Níveis excessivos dessas espécies reativas causam danos a proteínas, lipídios, carboidratos e DNA das células. Esse dano, gera um estresse contínuo no ambiente da ferida que causa mais inflamação e atraso no reparo e cicatrização (Deng et al., 2019). No presente estudo, ao diminuir a quantidade de *E. coli* na ferida, as AgNPs-Cur e o ozônio, diminuíram o estímulo inflamatório que essa bactéria causa, propiciando uma diminuição do infiltrado inflamatório e citocinas inflamatórias com consequente diminuição de EROs e NO no local da ferida (Alves et al., 2018). A redução de espécies reativas, também

pode ser explicada pelo aumento dos antioxidantes SOD e GSH apresentados pelo grupo FC+AgNPs-Cur+O₃, que agem neutralizando essas espécies reativas (Jomova et al., 2024; Scassellati et al., 2020). Conseqüentemente, o efeito antioxidante também pode ter servido como fator protetivo para melhora dos marcadores de danos oxidativos, carbonil e sulfidrila, apresentados pelo mesmo grupo (Wang et al., 2025b).

No presente estudo, a expressão gênica aumentada de HIF-1 α nos grupos de tratamento com ozônio condizem com diversos estudos de mecanismos já relatados na literatura (Wang et al., 2022; Braidy et al., 2017; Cenci et al., 2022). Um estudo realizado por Wang et al., (2022) utilizou o ozônio como proposta para tratamento de lesão cardíaca, com objetivo de estudar o HIF-1 α . Foi percebido que no grupo tratado com ozônio, houve um aumento na expressão de HIF-1 α , assim como uma melhora na disfunção mitocondrial. A diminuição da disfunção mitocondrial, faz com que uma quantia menor de espécies reativas seja produzida, melhorando o estado redox. Além disso, o HIF-1 α é um fator de transcrição importante envolvido na regulação da resposta à hipoxia e desempenha um papel crucial na sobrevivência celular em meio hipóxico ao alterar o metabolismo energético, a proliferação, a angiogênese e a remodelação vascular, o que o torna importante para o processo de cicatrização epitelial (Zheng et al., 2021).

Um estudo realizado por Younis et al., (2022) encontrou uma possível ação das AgNPs no aumento da expressão do HIF-1 α em feridas diabéticas. Além disso, o estudo encontrou um aumento de fatores de crescimento, como VEGF e TGF- β , que possuem a síntese estimulada pelo HIF-1 α e podem exercer papel importante para a angiogênese e re-epitelização. No presente estudo, apesar de as AgNPs-Cur isoladamente não terem aumentado a expressão de HIF-1 α , quando associadas com ozonioterapia foi possível observar esse efeito. Além disso, ao analisar o TGF- β por ELISA, as AgNPs-Cur obtiveram um aumento significativo e isto pode ter ocorrido devido ao estímulo do HIF-1 α pós tradução do RNAm.

O ozônio também é capaz de auxiliar diretamente na cicatrização através da promoção da agregação plaquetária, com subsequente liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Valacchi & Bocci, 1999). Uma pesquisa realizada por Xiao et al. (2017) demonstrou a capacidade do ozônio de ativar a via PI3K/Akt/mTOR para promover a migração e proliferação de fibroblastos para cicatrização de feridas. Além disso, a ozonioterapia acelera o processo de cicatrização aumentando os níveis de α -SMA e colágeno nos fibroblastos, resultantes da superexpressão de miR-21-5p. O miR-21-5p tem a função de reduzir a expressão de RASA1, conhecida como proteína ativadora da GTPase Ras (RasGAP), responsável por regular a migração de fibroblastos por meio da modulação negativa da

atividade Ras (Figura 14) (Xiao & Wu & Bi, 2021; Liu et al., 2023). De acordo com a literatura, as AgNPs-Cur também demonstram capacidade de aumentar a deposição de colágeno em feridas e promover uma cicatrização mais eficaz (Liu et al., 2022). Na atual pesquisa, as terapias associadas não foram capazes de aumentar a expressão gênica de colágeno I, porém apresentaram maior porcentagem de área de colágeno na análise por histologia. Isto sugere que, no grupo FC+AgNPS-Cur+O₃, o aumento de colágeno na área cicatricial é devido a deposição de colágeno tipo III.

Ao observar o conjunto dos dados das análises, os tratamentos com AgNPs e ozônio apresentaram resultados significativos isoladamente. Porém, quando associados, foram capazes de controlar de forma efetiva a infecção por *E. coli* na ferida, possibilitando cessar o estímulo imune inflamatório contínuo, com conseqüente diminuição de infiltrado inflamatório, citocinas pró-inflamatórias e oxidantes. Esse controle é essencial para estabelecer o estado redox celular, aumentar a produção de colágeno epitelial com conseqüente contração da ferida.

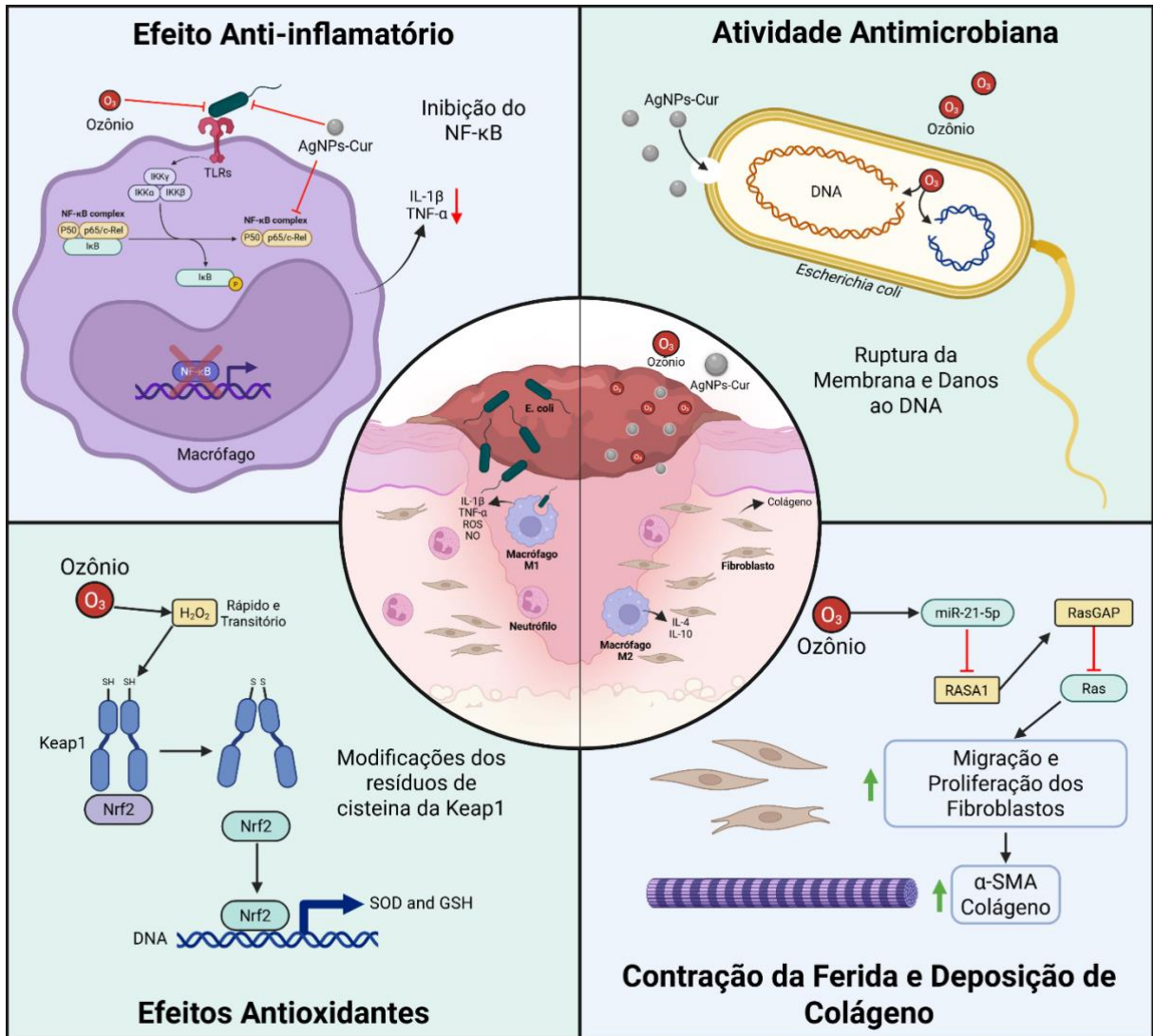


Figura 14: Resumo dos efeitos e dos mecanismos de ação da AgNPs-Cur e ozonioterapia no tratamento de feridas contaminadas por *E. coli*. Fonte: Do autor, 2026.

6. CONCLUSÃO

Dessa forma, os achados reforçam que a associação entre AgNPs e ozonioterapia foi capaz de potencializar mecanismos essenciais da cicatrização, como o controle da carga microbiana e da resposta inflamatória, além da redução do estresse oxidativo. O aumento da expressão gênica de HIF-1 α no grupo associado sugere como um fator chave, com estímulo de proliferação e sobrevivência celular. A convergência dessas ações resultou em um cenário biológico favorável à reparação, refletido no aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos e aceleração da contração das feridas e na melhora global do processo de regeneração tecidual.

Recomenda-se, entretanto, a realização de investigações adicionais para determinar com maior precisão e aprofundamento os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos tratamentos. Também se torna importante avaliar em futuros estudos pré-clínicos possíveis efeitos deletérios que tais tratamentos poderiam causar, objetivando a definição de protocolos seguros para estudos clínicos.

REFERÊNCIAS

- AGRILLO, A.; SASSANO, P.; RINNA, C.; PRIORE, P.; IANNETTI, G. **Ozone Therapy in Extractive Surgery on Patients Treated with Bisphosphonates**. *The Journal of Craniofacial Surgery*, v. 18, n. 5, p. 1068–1070, 2007.
- AKDENIZ, S. S.; BEYLER, E.; KORKMAZ, Y.; YURTCU, E.; ATES, U.; ARAZ, K.; SAHIN, F. I.; TORUN, O. Y. **The Effects of Ozone Application on Genotoxic Damage and Wound Healing in Bisphosphonate-Applied Human Gingival Fibroblast Cells**. *Clinical Oral Investigations*, v. 22, n. 2, p. 867–873, 2018.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. **Changes in Thiol Content and Expression of Glutathione Redox System Genes in the Hippocampus and Cerebellum in Alzheimer's Disease**. *Neuroscience Letters*, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, 2001.
- AL-RAJHI, A. M. H.; ABDELGHANY, T. M.; ALMUHAYAWI, M. S.; ALRUHAILI, M. H.; SADDIQ, A. A.; BAGHDADI, A. M.; AL JAOUNI, S. K.; ALBASRI, H. M.; WAZNAH, M. S.; ALRADDADI, F. A.; SELIM, S. **Effect of Ozonation on the Phytochemicals of Black Seed Oil and Its Anti-Microbial, Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Neoplastic Activities in Vitro**. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 30445, 2024.
- ALVEN, S.; ADERIBIGBE, B. A. **Chitosan and Cellulose-Based Hydrogels for Wound Management**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 24, p. 9656, 2020.
- ALVES, T. F.; CHAUD, M. V.; GROTTTO, D.; JOZALA, A. F.; PANDIT, R.; RAI, M.; DOS SANTOS, C. A. **Association of Silver Nanoparticles and Curcumin Solid Dispersion: Antimicrobial and Antioxidant Properties**. *AAPS PharmSciTech*, v. 19, n. 1, p. 225–231, 2018.
- AMEMIYA, K.; DANKMEYER, J. L.; BERNHARDS, R. C.; FETTERER, D. P.; WAAG, D. M.; WORSHAM, P. L.; DESHAZER, D. **Activation of Toll-like Receptors by Live Gram-Negative Bacterial Pathogens Reveals Mitigation of TLR4 Responses and Activation of TLR5 by Flagella**. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 745325, 2021.
- ASIF, M.; YASMIN, R.; ASIF, R.; AMBREEN, A.; MUSTAFA, M.; UMBREEN, S. **Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and Their Antibacterial Potential**. *Dose-Response*, v. 20, n. 1, p. 15593258221088709, 2022.
- AURORA, A. B.; OLSON, E. N. **Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration**. *Cell Stem Cell*, v. 15, n. 1, p. 14–25, 2014.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. **Assays for Superoxide Dismutase**. *Em: Methods of Biochemical Analysis*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 279–312.
- BAY, C.; CHIZMAR, Z.; REECE, E. M.; YU, J. Z.; WINOCOUR, J.; VORSTENBOSCH, J.; WINOCOUR, S. **Comparison of Skin Substitutes for Acute and Chronic Wound Management**. *Seminars in Plastic Surgery*, v. 35, n. 3, p. 171–180, 2021.

BESSA, L. J.; FAZIL, P.; DI GIULIO, M.; CELLINI, L. **Bacterial Isolates from Infected Wounds and Their Antibiotic Susceptibility Pattern: Some Remarks about Wound Infection: Bacterial Isolates from Infected Wounds and Their Antibiotic Susceptibility Pattern.** *International Wound Journal*, v. 12, n. 1, p. 47–52, 2015.

BHATTI, J. S.; SEHRAWAT, A.; MISHRA, J.; SIDHU, I. S.; NAVIK, U.; KHULLAR, N.; KUMAR, S.; BHATTI, G. K.; REDDY, P. H. **Oxidative Stress in the Pathophysiology of Type 2 Diabetes and Related Complications: Current Therapeutics Strategies and Future Perspectives.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 184, p. 114–134, 2022.

BIAŁOMYZY, A.; KOTRYCH, K.; BOGACZ, A.; PODRALSKA, M.; GÓRSKA, A.; BIAŁECKI, J.; UZAR, I.; CZERNY, B.; KAMIŃSKI, A. **Ozone Therapy and Negative Pressure Wound Therapy in the Treatment of Difficult-to-Heal Wounds in Diabetic Foot Syndrome and Charcot Neuroarthropathy.** *Journal of Clinical Medicine*, v. 14, n. 12, p. 4017, 2025.

BLANC, F. C.; DOMBROWSKI, I. S. A.; DE OLIVEIRA, N. F.; DA SILVA, S. M. F.; MOREIRA, J. C.; SANTOS, C. O.; MIGUEL, M. G. R.; SALVADO, M. G.; DE ARAÚJO PENNA, B.; PINNA, A. E. **Antimicrobial and Antibiofilm in Vitro Effect of Oxygen-Ozone Gas against Staphylococcus Aureus.** *Research in Veterinary Science*, v. 194, n. 105814, p. 105814, 2025.

BOCCI, V. **Is It True That Ozone Is Always Toxic? The End of a Dogma.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 216, n. 3, p. 493–504, 2006.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; HUIJBERTS, M. S. P.; TRAVAGLI, V. **Diabetes and Chronic Oxidative Stress. A Perspective Based on the Possible Usefulness of Ozone Therapy.** *Diabetes & Metabolic Syndrome*, v. 5, n. 1, p. 45–49, 2011.

BRAIDY, N.; IZADI, M.; SUREDA, A.; JONAIJI-JAFARI, N.; BANKI, A.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. **Therapeutic Relevance of Ozone Therapy in Degenerative Diseases: Focus on Diabetes and Spinal Pain.** *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 4, p. 2705–2714, 2017.

BRUNA, T.; MALDONADO-BRAVO, F.; JARA, P.; CARO, N. **Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 7202, 2021.

CARDOSO, R. M. F.; ESTEVES DA SILVA, J. C. G.; PINTO DA SILVA, L. **Application of Engineered Nanomaterials as Nanocatalysts in Catalytic Ozonation: A Review.** *Materials*, v. 17, n. 13, p. 3185, 2024.

CENCI, A.; MACCHIA, I.; LA SORSA, V.; SBARIGIA, C.; DI DONNA, V.; PIETRAFORTE, D. **Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages with Reference to SARS-CoV-2.** *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 871645, 2022.

CHAE, S. Y.; LEE, M.; KIM, S. W.; BAE, Y. H. **Protection of Insulin Secreting Cells from Nitric Oxide Induced Cellular Damage by Crosslinked Hemoglobin.** *Biomaterials*, v. 25, n. 5, p. 843–850, 2004.

CHOUHDURY, H.; PANDEY, M.; LIM, Y. Q.; LOW, C. Y.; LEE, C. T.; MARILYN, T. C. L.; LOH, H. S.; LIM, Y. P.; LEE, C. F.; BHATTAMISHRA, S. K.; KESHARWANI, P.; GORAIN, B. **Silver Nanoparticles: Advanced and Promising Technology in Diabetic Wound Therapy**. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, v. 112, n. 110925, p. 110925, 2020.

CLAVO, B.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; RODRÍGUEZ-ESPARRAGÓN, F.; RODRÍGUEZ-ABREU, D.; GALVÁN, S.; AGUIAR-BUJANDA, D.; DÍAZ-GARRIDO, J. A.; CAÑAS, S.; TORRES-MATA, L. B.; FABELO, H.; TÉLLEZ, T.; SANTANA-RODRÍGUEZ, N.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, L.; MARRERO-CALLICO, G. **Modulation by Ozone Therapy of Oxidative Stress in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: The Background for a Randomized Clinical Trial**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 6, p. 2802, 2021.

CLAVO, B.; RODRÍGUEZ-ESPARRAGÓN, F.; RODRÍGUEZ-ABREU, D.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; LLONTOPO, P.; AGUIAR-BUJANDA, D.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, L.; SANTANA-RODRÍGUEZ, N. **Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects**. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 12, p. 588, 2019.

CURTOLO, G.; ARAÚJO, J. de P.; LIMA, J. A.; BRANDT, J. V.; BITTENCOURT, J. V. S.; VENTURINI, L. M.; SILVEIRA, P. C. L.; ROGERS, S.; FRANZINI, C. M.; DE GOES, V. F. F.; ANDRADE, T. A. M. **Silver Nanoparticles Formulations for Healing Traumatic Injuries in Oral Mucosa of Rats**. *Archives of Oral Biology*, v. 129, n. 105202, p. 105202, 2021.

DENG, Z.; SHI, F.; ZHOU, Z.; SUN, F.; SUN, M.-H.; SUN, Q.; CHEN, L.; LI, D.; JIANG, C.-Y.; ZHAO, R.-Z.; CUI, D.; WANG, X.-J.; JING, Y.-F.; XIA, S.-J.; HAN, B.-M. **M1 Macrophage Mediated Increased Reactive Oxygen Species (ROS) Influence Wound Healing via the MAPK Signaling in Vitro and in Vivo**. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 366, p. 83–95, 2019.

DISSEMOND, J.; REMBE, J.-D.; ASSENHEIMER, B.; BARYSCH-BONDERER, M.; GERBER, V.; KOTTNER, J.; KURZ, P.; MOTZKUS, M.; PANFIL, E.-M.; PROBST, S.; STROHAL, R.; TRABER, J.; SCHWARZKOPF, A. **Systematics, Diagnosis and Treatment of Wound Infections in Chronic Wounds: A Position Paper from WundDACH**. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft [Journal of the German Society of Dermatology]*, v. 23, n. 5, p. 565–574, 2025.

DOMINGUES, J. M.; MIRANDA, C. S.; HOMEM, N. C.; FELGUEIRAS, H. P.; ANTUNES, J. C. **Nanoparticle Synthesis and Their Integration into Polymer-Based Fibers for Biomedical Applications**. *Biomedicines*, v. 11, n. 7, p. 1862, 2023.

DONATO, G. G.; NEBBIA, P.; STELLA, M. C.; SCALAS, D.; NECCHI, D.; BERTERO, A.; ROMANO, G.; BERGAMINI, L.; POLETTI, M. L.; PEANO, A.; ROBINO, P.; NERVO, T. **In Vitro Effects of Different Ozone Preparations on Microorganisms Responsible for Endometritis in the Mare**. *Theriogenology*, v. 219, p. 132–137, 2024.

DONG, J.; SULIK, K. K.; CHEN, S.-Y. **The Role of NOX Enzymes in Ethanol-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Mouse Embryos**. *Toxicology Letters*, v. 193, n. 1, p. 94–100, 2010.

EL-KATTAN, N.; EMAM, A. N.; MANSOUR, A. S.; IBRAHIM, M. A.; ABD EL-RAZIK, A. B.; ALLAM, K. A. M.; RIAD, N. Y.; IBRAHIM, S. A. **Curcumin Assisted Green Synthesis of Silver and Zinc Oxide Nanostructures and Their Antibacterial Activity against Some Clinical Pathogenic Multi-Drug Resistant Bacteria**. RSC Advances, v. 12, n. 28, p. 18022–18038, 2022.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. **Ozone Therapy: A Clinical Review**. Journal of Natural Science, Biology, and Medicine, v. 2, n. 1, p. 66–70, 2011.

FERRANTE, C. J.; LEIBOVICH, S. J. **Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing**. Advances in Wound Care, v. 1, n. 1, p. 10–16, 2012.

GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. **Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019**. Lancet, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, 2022.

GOPINATH, P.; GOGOI, S. K.; SANPUI, P.; PAUL, A.; CHATTOPADHYAY, A.; GHOSH, S. S. **Signaling Gene Cascade in Silver Nanoparticle Induced Apoptosis**. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, v. 77, n. 2, p. 240–245, 2010.

GUILLAMAT-PRATS, R. **The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration**. Cells (Basel, Switzerland), v. 10, n. 7, p. 1729, 2021.

GUZZATTI, M. F. M.; DE MOURA, A. B.; VENTURINI, L. M.; DE ROCH CASAGRANDE, L.; LIMA, I. R.; DA COSTA, C.; DE PIERI, E.; TIETBOHL, L. T. W.; FEUSER, P. E.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; GU, Y.; THIRUPATHI, A.; SILVEIRA, P. C. L. **Biosynthesized Silver Nanoparticles Modulate Inflammation in a Palatine Wound Model**. Clinical and Experimental Dental Research, v. 11, n. 5, p. e70213, 2025.

HAJ BLOUKH, S.; EDIS, Z.; ABU SARA, H.; ALHAMAIDAH, M. A. **Antimicrobial Properties of Lepidium Sativum L. Facilitated Silver Nanoparticles**. Pharmaceutics, v. 13, n. 9, p. 1352, 2021.

HAO, K.; LI, Y.; FENG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; MA, N.; ZENG, Q.; PANG, H.; WANG, C.; XIAO, L.; HE, X. **Ozone Promotes Regeneration by Regulating the Inflammatory Response in Zebrafish**. International Immunopharmacology, v. 28, n. 1, p. 369–375, 2015.

HISSIN, P. J.; HILF, R. **A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues**. Analytical Biochemistry, v. 74, n. 1, p. 214–226, 1976.

HURLOW, J.; BOWLER, P. G. **Acute and Chronic Wound Infections: Microbiological, Immunological, Clinical and Therapeutic Distinctions**. Journal of Wound Care, v. 31, n. 5, p. 436–445, 2022.

IRAVANI, S.; KORBKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. **Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical and Biological Methods**. Research in Pharmaceutical Sciences, v. 9, n. 6, p. 385–406, 2014.

JAIN, A. S.; PAWAR, P. S.; SARKAR, A.; JUNNUTHULA, V.; DYAWANAPELLY, S. **Bionanofactories for Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Toward Antimicrobial Applications**. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 21, p. 11993, 2021.

JOMOVA, K.; ALOMAR, S. Y.; ALWASEL, S. H.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K.; VALKO, M. **Several Lines of Antioxidant Defense against Oxidative Stress: Antioxidant Enzymes, Nanomaterials with Multiple Enzyme-Mimicking Activities, and Low-Molecular-Weight Antioxidants**. *Archives of Toxicology*, v. 98, n. 5, p. 1323–1367, 2024.

JYOTI, A.; SINGH, A. K.; DUBEY, M.; KUMAR, S.; SALUJA, R.; KESHARI, R. S.; VERMA, A.; CHANDRA, T.; KUMAR, A.; BAJPAI, V. K.; BARTHWAL, M. K.; DIKSHIT, M. **Interaction of Inducible Nitric Oxide Synthase with Rac2 Regulates Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generation in the Human Neutrophil Phagosomes: Implication in Microbial Killing**. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 20, n. 3, p. 417–431, 2014.

KANEKI, M.; OHIRA, C.; TAKAHASHI, M.; IWASHITA, N.; TAKAGI, Y.; NAGANE, M.; UCHIYAMA, J.; FUKUYAMA, T. **Therapeutic Potential of Ozone Water Treatment in Alleviating Atopic Dermatitis Symptoms in Mouse Models: Exploring Its Bactericidal and Direct Anti-Inflammatory Properties**. *International Immunopharmacology*, v. 124, n. Pt A, p. 110920, 2023.

KESICI, U.; DEMIRCI, M.; KESICI, S. **Antimicrobial Effects of Local Anaesthetics**. *International Wound Journal*, v. 16, n. 4, p. 1029–1033, 2019.

KIM, H. S.; NOH, S. U.; HAN, Y. W.; KIM, K. M.; KANG, H.; KIM, H. O.; PARK, Y. M. **Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing**. *Journal of Korean Medical Science*, v. 24, n. 3, p. 368–374, 2009.

KIM, J.; CHA, Y.-N.; SURH, Y.-J. **A Protective Role of Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor-2 (Nrf2) in Inflammatory Disorders**. *Mutation Research*, v. 690, n. 1–2, p. 12–23, 2010.

KIM, S.-A.; HYUN, D. H.; RYU, J. H. **In Situ Formation of Silver Nanoparticles-Containing Gallic Acid-Conjugated Chitosan Hydrogels as Antimicrobial Tissue Adhesive Materials**. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 11, p. 720, 2025.

KOCA, U.; SÜNTAR, I.; AKKOL, E. K.; YILMAZER, D.; ALPER, M. **Wound Repair Potential of Olea Europaea L. Leaf Extracts Revealed by in Vivo Experimental Models and Comparative Evaluation of the Extracts' Antioxidant Activity**. *Journal of Medicinal Food*, v. 14, n. 1–2, p. 140–146, 2011.

KRISHNAN, P. D.; BANAS, D.; DURAI, R. D.; KABANOV, D.; HOSNEDLOVA, B.; KEPINSKA, M.; FERNANDEZ, C.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; NGUYEN, H. V.; FARID, A.; SOCHOR, J.; NARAYANAN, V. H. B.; KIZEK, R. **Silver Nanomaterials for Wound Dressing Applications**. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 9, p. 821, 2020.

KRZYSZCZYK, P.; SCHLOSS, R.; PALMER, A.; BERTHIAUME, F. **The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-Wound Healing Phenotypes**. *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 419, 2018.

KUMARI, S.; GOYAL, A.; SÖNMEZ GÜRER, E.; ALGIN YAPAR, E.; GARG, M.; SOOD, M.; SINDHU, R. K. **Bioactive Loaded Novel Nano-Formulations for Targeted Drug Delivery and Their Therapeutic Potential**. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 5, p. 1091, 2022.

- LIN, Q.; CHEN, H.; LU, C.; WANG, B.; ZHANG, Y.; HE, X.; YU, B. **Effects of Ozone on Sciatic Nerve in Rat**. *Interventional Neuroradiology: Journal of Peritherapeutic Neuroradiology, Surgical Procedures and Related Neurosciences*, v. 17, n. 3, p. 281–285, 2011.
- LIU, C.; ZHU, Y.; LUN, X.; SHENG, H.; YAN, A. **Effects of Wound Dressing Based on the Combination of Silver@curcumin Nanoparticles and Electrospun Chitosan Nanofibers on Wound Healing**. *Bioengineered*, v. 13, n. 2, p. 4328–4339, 2022.
- LIU, L.; ZENG, L.; GAO, L.; ZENG, J.; LU, J. **Ozone Therapy for Skin Diseases: Cellular and Molecular Mechanisms**. *International Wound Journal*, v. 20, n. 6, p. 2376–2385, 2023.
- LIU, Y.-C.; ZOU, X.-B.; CHAI, Y.-F.; YAO, Y.-M. **Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases**. *International Journal of Biological Sciences*, v. 10, n. 5, p. 520–529, 2014.
- LOAN KHANH, L.; THANH TRUC, N.; TAN DAT, N.; THI PHUONG NGHI, N.; VAN TOI, V.; THI THU HOAI, N.; NGOC QUYEN, T.; THI THANH LOAN, T.; THI HIEP, N. **Gelatin-Stabilized Composites of Silver Nanoparticles and Curcumin: Characterization, Antibacterial and Antioxidant Study**. *Science and Technology of Advanced Materials*, v. 20, n. 1, p. 276–290, 2019.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent**. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- LUANDA, A.; MANOHAR, M.; CHARYULU, R. N.; BADALAMOOLE, V. **Evaluation of Drug Release Efficiency and Antibacterial Property of a pH-Responsive Dextran-Based Silver Nanocomposite Hydrogel**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 268, n. Pt 2, p. 131783, 2024.
- MALEK, S. Z.; ARASTEH, A. **In Vitro Regulation of Amyloid Production in Alzheimer's Disease via Curcumin-Loaded Silver Nanoparticles with Antioxidant and Acetylcholinesterase-Inhibiting Properties**. *Molecular Neurobiology*, v. 62, n. 10, p. 12883–12893, 2025.
- MANTSOUNGA, C. S.; LEE, C.; NEVERSON, J.; SHARMA, S.; HEALY, A.; BERUS, J. M.; PARRY, C.; CENERI, N. M.; LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F.; CHUN, H. J.; LU, Q.; SELLKE, F.; CHOUDHARY, G.; MORRISON, A. R. **Macrophage IL-1 β Promotes Arteriogenesis by Autocrine STAT3- and NF- κ B-Mediated Transcription of pro-Angiogenic VEGF-A**. *Cell Reports*, v. 38, n. 5, p. 110309, 2022.
- MENDES, C.; DOS SANTOS HAUPENTHAL, D. P.; ZACCARON, R. P.; DE BEM SILVEIRA, G.; CORRÊA, M. E. A. B.; DE ROCH CASAGRANDE, L.; DE SOUSA MARIANO, S.; DE SOUZA SILVA, J. I.; DE ANDRADE, T. A. M.; FEUSER, P. E.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SILVEIRA, P. C. L. **Effects of the Association between Photobiomodulation and Hyaluronic Acid Linked Gold Nanoparticles in Wound Healing**. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 6, n. 9, p. 5132–5144, 2020.
- MENDES, C.; THIRUPATHI, A.; ZACCARON, R. P.; CORRÊA, M. E. A. B.; BITTENCOURT, J. V. S.; CASAGRANDE, L. de R.; DE LIMA, A. C. S.; DE OLIVEIRA, L. L.; DE ANDRADE, T. A. M.; GU, Y.; FEUSER, P. E.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.;

- SILVEIRA, P. C. L. **Microcurrent and Gold Nanoparticles Combined with Hyaluronic Acid Accelerates Wound Healing**. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), v. 11, n. 11, p. 2257, 2022.
- MENDES, C.; ZACCARON, R. P.; CASAGRANDE, L. de R.; VENTURINI, L. M.; DA COSTA, C.; LIMA, I. R.; WERMUTH, T. B.; ARCARO, S.; FEUSER, P. E.; LOCK SILVEIRA, P. C. **Green Synthesis of Gold Nanoparticles in an Animal Model of Chronic Wound Induced with Resiquimod**. *Journal of Drug Targeting*, v. 32, n. 9, p. 1086–1100, 2024.
- MESQUITA, C. S.; OLIVEIRA, R.; BENTO, F.; GERALDO, D.; RODRIGUES, J. V.; MARCOS, J. C. **Simplified 2,4-Dinitrophenylhydrazine Spectrophotometric Assay for Quantification of Carbonyls in Oxidized Proteins**. *Analytical Biochemistry*, v. 458, p. 69–71, 2014.
- MOVAFFAGH, J.; FAZLY BAZZAZ, B. S.; YAZDI, A. T.; SAJADI-TABASSI, A.; AZIZZADEH, M.; NAJAFI, E.; AMIRI, N.; TAGHANAKI, H. B.; EBRAHIMZADEH, M. H.; MORADI, A. **Wound Healing and Antimicrobial Effects of Chitosan-Hydrogel/Honey Compounds in a Rat Full-Thickness Wound Model**. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, v. 31, n. 9, p. 228–235, 2019.
- NAIK, S. V.; K, R.; KOHLI, S.; ZOHABHASAN, S.; BHATIA, S. **Ozone- A Biological Therapy in Dentistry- Reality or Myth?????** *The Open Dentistry Journal*, v. 10, p. 196–206, 2016.
- NOGALES, C. G.; FERRARI, P. H.; KANTOROVICH, E. O.; LAGE-MARQUES, J. L. **Ozone Therapy in Medicine and Dentistry**. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, v. 9, n. 4, p. 75–84, 2008.
- NORMAN, R. E.; GIBB, M.; DYER, A.; PRENTICE, J.; YELLAND, S.; CHENG, Q.; LAZZARINI, P. A.; CARVILLE, K.; INNES-WALKER, K.; FINLAYSON, K.; EDWARDS, H.; BURN, E.; GRAVES, N. **Improved Wound Management at Lower Cost: A Sensible Goal for Australia**. *International Wound Journal*, v. 13, n. 3, p. 303–316, 2016.
- NQAKALA, Z. B.; SIBUYI, N. R. S.; FADAKA, A. O.; MEYER, M.; ONANI, M. O.; MADIEHE, A. M. **Advances in Nanotechnology towards Development of Silver Nanoparticle-Based Wound-Healing Agents**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 20, p. 11272, 2021.
- O'CONNOR, J. T.; STEVENS, A. C.; SHANNON, E. K.; AKBAR, F. B.; LAFEVER, K. S.; NARAYANAN, N. P.; GAILEY, C. D.; HUTSON, M. S.; PAGE-MCCAW, A. **Proteolytic Activation of Growth-Blocking Peptides Triggers Calcium Responses through the GPCR Mthl10 during Epithelial Wound Detection**. *Developmental Cell*, v. 56, n. 15, p. 2160- 2175.e5, 2021.
- OGUZ, E.; EKINCI, S.; EROGLU, M.; BILGIC, S.; KOCA, K.; DURUSU, M.; KALDIRIM, U.; SADIR, S.; YURTTAS, Y.; CAKMAK, G.; KILIC, A.; PURTULOGLU, T.; OZYUREK, S.; CEKLI, Y.; OZKAN, H.; SEHIRLIOGLU, A. **Evaluation and Comparison of the Effects of Hyperbaric Oxygen and Ozonized Oxygen as Adjuvant Treatments in an Experimental Osteomyelitis Model**. *The Journal of Surgical Research*, v. 171, n. 1, p. e61-8, 2011.

- OTAVIANO, M. H.; SALLES, M.; CHING, T. H.; DETTONI, J. L.; COULIBALY, I. G. S.; FUKUNAGA, E. T.; GAMBA, M. A.; MORAES, J. C. de. **Topical Oxygen Jet Therapy (TOJT) for Treating Infected Chronic Surgical Wounds**. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 25, n. 2, p. 101547, 2021.
- PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. **Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia Coli**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, 2007.
- PANGLI, H.; VATANPOUR, S.; HORTAMANI, S.; JALILI, R.; GHAHARY, A. **Incorporation of Silver Nanoparticles in Hydrogel Matrices for Controlling Wound Infection**. *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association*, v. 42, n. 4, p. 785–793, 2021.
- PEÑA, O. A.; MARTIN, P. **Cellular and Molecular Mechanisms of Skin Wound Healing**. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 25, n. 8, p. 599–616, 2024.
- PINEDA, M. E. B.; SÁNCHEZ, D. F. V.; CAYCEDO, P. A. C.; -ROZO, J. C. **Nanocomposites: Silver Nanoparticles and Bacteriocins Obtained from Lactic Acid Bacteria against Multidrug-Resistant Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus**. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 40, n. 11, p. 341, 2024.
- QUBTIA, M.; GHUMMAN, S. A.; NOREEN, S.; HAMEED, H.; NOUREEN, S.; KAUSAR, R.; IRFAN, A.; AKHTAR SHAH, P.; AFZAL, H.; HAMEED, M.; RAISH, M.; RANA, M.; AHMAD, A.; KOTWICA-MOJZYCH, K.; BIN JARDAN, Y. A. **Evaluation of Plant-Based Silver Nanoparticles for Antioxidant Activity and Promising Wound-Healing Applications**. *ACS Omega*, v. 9, n. 10, p. 12146–12157, 2024.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. **Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials**. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.
- RAZIYEVA, K.; KIM, Y.; ZHARKINBEKOV, Z.; KASSYMBEK, K.; JIMI, S.; SAPAROV, A. **Immunology of Acute and Chronic Wound Healing**. *Biomolecules*, v. 11, n. 5, p. 700, 2021.
- RIPAMONTI, C. I.; CISLAGHI, E.; MARIANI, L.; MANIEZZO, M. **Efficacy and Safety of Medical Ozone (O₃) Delivered in Oil Suspension Applications for the Treatment of Osteonecrosis of the Jaw in Patients with Bone Metastases Treated with Bisphosphonates: Preliminary Results of a Phase I-II Study**. *Oral Oncology*, v. 47, n. 3, p. 185–190, 2011.
- RIPAMONTI, C. I.; MANIEZZO, M.; BOLDINI, S.; PESSI, M. A.; MARIANI, L.; CISLAGHI, E. **Efficacy and Tolerability of Medical Ozone Gas Insufflations in Patients with Osteonecrosis of the Jaw Treated with Bisphosphonates-Preliminary Data: Medical Ozone Gas Insufflation in Treating ONJ Lesions**. *Journal of Bone Oncology*, v. 1, n. 3, p. 81–87, 2012.
- RUFFO, M.; PARISI, O. I.; DATTILO, M.; PATITUCCI, F.; MALIVINDI, R.; PEZZI, V.; TZANOV, T.; PUOCI, F. **Synthesis and Evaluation of Wound Healing Properties of Hydro-Diab Hydrogel Loaded with Green-Synthesized AGNPS: In Vitro and in Ex Vivo Studies**. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 12, n. 8, p. 1881–1894, 2022.

RUIZ, P. B. de O.; LIMA, A. F. C. **Average Direct Costs of Outpatient, Hospital, and Home Care Provided to Patients with Chronic Wounds.** *Revista da Escola de Enfermagem da U S P*, v. 56, p. e20220295, 2022.

RUSSO, C.; CURCIO, G.; GRAZIANI, A.; MENCACCI, A.; PIETRELLA, D. **Antibiofilm, Anti-Inflammatory, and Regenerative Properties of a New Stable Ozone-Gel Formulation.** *Pharmaceutics*, v. 16, n. 12, p. 1580, 2024.

SATO, Y.; TANNO, H.; IMAI, T.; KONNO, M.; TAKAYASHIKI, R.; KAMADA, W.; ITO, E.; SONE, I.; KAWAMOTO, S.; ISHI, S.; SATO, K.; ISHII, K.; AOYAGI, T.; IWAKURA, Y.; KANNO, E. **Defect of Dectin-1-Mediated Signaling Promotes Burn Wound Healing through Attenuated Oxidative Stress and Inflammatory Responses.** *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, v. 51, n. 9, p. 107703, 2025.

SCASSELLATI, C.; GALOFORO, A. C.; BONVICINI, C.; ESPOSITO, C.; RICEVUTI, G. **Ozone: A Natural Bioactive Molecule with Antioxidant Property as Potential New Strategy in Aging and in Neurodegenerative Disorders.** *Ageing Research Reviews*, v. 63, n. 101138, p. 101138, 2020.

SHANMUGAM, G.; SUNDARAMOORTHY, A.; SHANMUGAM, N. **Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Leaf Extract of *Salvia Coccinea* and Its Effects of Anti-Inflammatory Potential in Human Monocytic THP-1 Cells.** *ACS Applied Bio Materials*, v. 4, n. 12, p. 8433–8442, 2021.

SHARMA, R. K.; CWIKLINSKI, K.; AALINKEEL, R.; REYNOLDS, J. L.; SYKES, D. E.; QUAYE, E.; OH, J.; MAHAJAN, S. D.; SCHWARTZ, S. A. **Immunomodulatory Activities of Curcumin-Stabilized Silver Nanoparticles: Efficacy as an Antiretroviral Therapeutic.** *Immunological Investigations*, v. 46, n. 8, p. 833–846, 2017.

SHEN, X.; GU, M.; ZHAN, F.; CAI, H.; ZHANG, K.; WANG, K.; LI, C. **Porcine Beta Defensin 2 Attenuates Inflammatory Responses in IPEC-J2 Cells against *Escherichia Coli* via TLRs-NF- κ B/MAPK Signaling Pathway.** *BMC Veterinary Research*, v. 20, n. 1, p. 357, 2024.

SILVA, R. C. L.; SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. S. **Diacerein-Induced Interleukin-1 β Deficiency Reduces the Inflammatory Infiltrate and Immunoexpression of Matrix Metalloproteinase-8 in Periodontitis in Rat Molars.** *Journal of Periodontology*, v. 93, n. 10, p. 1540–1552, 2022.

SINISCALCO, D.; TROTTA, M. C.; BRIGIDA, A. L.; MAISTO, R.; LUONGO, M.; FERRARACCIO, F.; D'AMICO, M.; DI FILIPPO, C. **Intraperitoneal Administration of Oxygen/Ozone to Rats Reduces the Pancreatic Damage Induced by Streptozotocin.** *Biology*, v. 7, n. 1, 2018.

SOARES, C. D.; MORAIS, T. M. L.; ARAÚJO, R. M. F. G.; MEYER, P. F.; OLIVEIRA, E. A. F.; SILVA, R. M. V.; CARREIRO, E. M.; CARREIRO, E. P.; BELLOCO, V. G.; MARIZ, B. A. L. A.; JORGE-JUNIOR, J. **Effects of Subcutaneous Injection of Ozone during Wound Healing in Rats.** *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, v. 37, n. 1–2, p. 95–103, 2019.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. **Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: A Case Study on *E. Coli* as a Model for Gram-Negative Bacteria.** *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.

SOUZA, B. do A. F.; MAGLIA, D. R.; VISIOLI, F. **Efficacy of Ozone Therapy for Oral Mucosa Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 137, n. 6, p. e309, 2024.

SUH, Y.; PATEL, S.; KAITLYN, R.; GANDHI, J.; JOSHI, G.; SMITH, N. L.; KHAN, S. A. **Clinical Utility of Ozone Therapy in Dental and Oral Medicine.** *Medical Gas Research*, v. 9, n. 3, p. 163–167, 2019.

TALARSKA, P.; BORUCZKOWSKI, M.; ŻURAWSKI, J. **Current Knowledge of Silver and Gold Nanoparticles in Laboratory Research-Application, Toxicity, Cellular Uptake.** *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, v. 11, n. 9, p. 2454, 2021.

TARTARI, A. P. S.; MOREIRA, F. F.; PEREIRA, M. C. D. S.; CARRARO, E.; CIDRAL-FILHO, F. J.; SALGADO, A. I.; KERPPERS, I. I. **Anti-Inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis.** *Inflammation*, v. 43, n. 3, p. 985–993, 2020.

VALACCHI, G.; BOCCI, V. **Studies on the Biological Effects of Ozone: 10. Release of Factors from Ozonated Human Platelets.** *Mediators of Inflammation*, v. 8, n. 4–5, p. 205–209, 1999.

VERDOLINO, D. V.; THOMASON, H. A.; FOTTICCHIA, A.; CARTMELL, S. **Wound Dressings: Curbing Inflammation in Chronic Wound Healing.** *Emerging Topics in Life Sciences*, v. 5, n. 4, p. 523–537, 2021.

WANG, L.; CHEN, Z.; LIU, Y.; DU, Y.; LIU, X. **Ozone oxidative postconditioning inhibits oxidative stress and apoptosis in renal ischemia and reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway.** *Drug Design, Development and Therapy*, v. 12, p. 1293–1301, 2018.

WANG, R.; LI, B.; DONG, M.; ZHU, H.; JIN, P.; ZOU, Y. **Targeting Oxidative Damage in Diabetic Foot Ulcers: Integrative Strategies Involving Antioxidant Drugs and Nanotechnologies.** *Burns & Trauma*, v. 13, n. tkaf020, p. tkaf020, 2025a.

WANG, R.; LIU, F.; HUANG, P.; ZHANG, Y.; HE, J.; PANG, X.; ZHANG, D.; GUAN, Y. **Ozone Preconditioning Protects Rabbit Heart against Global Ischemia-Reperfusion Injury in Vitro by up-Regulating HIF-1 α .** *Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, v. 150, n. 113033, p. 113033, 2022.

WANG, X.; HUO, H.; CAO, L.; ZHONG, Y.; GONG, J.; LIN, Z.; XIE, X.; BAO, Z.; ZHANG, P. **Curcumin-Release Antibacterial Dressings with Antioxidation and Anti-Inflammatory Function for Diabetic Wound Healing and Glucose Monitoring.** *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, v. 378, p. 153–169, 2025b.

WANG, X.; XU, Z.; XIA, Y.; CHEN, Z.; ZONG, R.; MENG, Q.; WANG, W.; ZHUANG, W.; MENG, X.; CHEN, G. **Characterization of an Escherichia Coli Phage Tequatrovirus YZ2 and Its Application in Bacterial Wound Infection.** *Virology*, v. 597, n. 110155, p. 110155, 2024.

WATSON, M.; SAITIS, T.; SHAREEF, R.; HARB, C.; LAKHANI, M.; AHMAD, Z. **Shikonin and Alkannin Inhibit ATP Synthase and Impede the Cell Growth in**

Escherichia Coli. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 253, n. Pt 4, p. 127049, 2023.

WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. **The Role of Estrogen in Cutaneous Ageing and Repair**. *Maturitas*, v. 103, p. 60–64, 2017.

XIAO, W.; TANG, H.; WU, M.; LIAO, Y.; LI, K.; LI, L.; XU, X. **Ozone Oil Promotes Wound Healing by Increasing the Migration of Fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway**. *Bioscience Reports*, v. 37, n. 6, p. BSR20170658, 2017.

XIAO, W.-R.; WU, M.; BI, X.-R. **Ozone Oil Promotes Wound Healing via Increasing miR-21-5p-Mediated Inhibition of RASA1**. *Wound Repair and Regeneration*, v. 29, n. 3, p. 406–416, 2021.

YOUNIS, N. S.; MOHAMED, M. E.; EL SEMARY, N. A. **Green Synthesis of Silver Nanoparticles by the Cyanobacteria *Synechocystis* Sp.: Characterization, Antimicrobial and Diabetic Wound-Healing Actions**. *Marine Drugs*, v. 20, n. 1, p. 56, 2022.

ZACCARON, R. P.; DE ROCH CASAGRANDE, L.; VENTURINI, L. M.; BITTENCOURT, J. V. S.; DA COSTA, C.; DE PIERI, E.; THIRUPATHI, A.; REZIN, G. T.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SILVEIRA, P. C. L. **IL-1 β Antagonist Receptor Peptide Associated with Photobiomodulation Accelerates Diabetic Wound Tissue Repair**. *Inflammation*, v. 47, n. 4, p. 1262–1277, 2024.

ZHANG, X.-F.; LIU, Z.-G.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. **Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016.

ZHENG, J.; CHEN, P.; ZHONG, J.; CHENG, Y.; CHEN, H.; HE, Y.; CHEN, C. **HIF-1 α in Myocardial Ischemia-reperfusion Injury (Review)**. *Molecular Medicine Reports*, v. 23, n. 5, 2021.

ZHENG, X.; CHEN, J.; HUANG, X. **Epidermal Sensors Constructed by a Stabilized Nanosilver Hydrogel with Self-Healing, Antimicrobial, and Temperature-Responsive Properties**. *ACS Omega*, v. 9, n. 50, p. 49001–49012, 2024.

ANEXO A – CERTIFICADO DO CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 20/05/2025.

Título do projeto	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DO USO ASSOCIADO DE OZÔNIO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM MODELO ANIMAL DE FERIDAS CONTAMINADAS
Project title	EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF THE COMBINED USE OF OZONE AND SILVER NANOPARTICLES IN AN ANIMAL MODEL OF CONTAMINATED WOUNDS
Número do protocolo Protocol number	28/2025
Pesquisador principal Principal Investigator	PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Pesquisadores Researchers	Paulo Cesar Lock Silveira, Laura de Roch Casagrande, Ligia Milanez Venturini, Rubya Pereira Zaccaron, Bruna Behling Matos, Henrique Ernesto Godinho Bettiol, Marcelo Emilio Beirão, Vitoria Oliveira Silva da Silva, Igor Ramos Lima, Gabrielli Martins, Tommaso de Lira, Gilberto da Silva Filho, Camila da Costa, Alice Machado Clemencia, Isabella Aguiar Cardoso, Vitor Piva Viana, Gabriel Martignago Crispim dos Santos, Suelen Alexia Pereira da Silva, Eduarda de Souza Sivinski
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/05/2025 a 27/05/2026
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250-300 gramas
Número de animais	Masculino 90 / Feminino 0
Procedência	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.