



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PCF

**AVALIAÇÃO DO USO DE FIBRA OBTIDA POR ELETROFIAÇÃO CONTENDO
ÓLEO OZONIZADO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CAUSADAS POR
Leishmania amazonensis EM MODELO ANIMAL**

DANIELA PATRICIA TRES

CASCAVEL

2024

DANIELA PATRICIA TRES

**AVALIAÇÃO DO USO DE FIBRA OBTIDA POR ELETROFIAÇÃO CONTENDO
ÓLEO OZONIZADO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CAUSADAS POR
Leishmania amazonensis EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli.

Coorientadora: Prof. Dra. Thaís Soprani Ayala.

CASCADEL – PR

2024

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Tres, Daniela Patricia
AVALIAÇÃO DO USO DE FIBRA OBTIDA POR ELETROFIAÇÃO CONTENDO
ÓLEO OZONIZADO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CAUSADAS POR
Leishmania amazonensis EM MODELO ANIMAL / Daniela Patricia
Tres; orientador Rafael Andrade Menolli; coorientadora Thais
Soprani Ayala . -- Cascavel, 2024.
70 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Fibra eletrofiada . 2. leishmaniose cutânea. 3.
ozônioterapia. I. Menolli, Rafael Andrade, orient. II. Ayala
, Thais Soprani , coorient. III. Título.

DANIELA PATRICIA TRES

**AVALIAÇÃO DO USO DE FIBRA OBTIDA POR ELETROFIAÇÃO CONTENDO
ÓLEO OZONIZADO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CAUSADAS POR
Leishmania amazonensis EM MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli.

Coorientadora: Prof. Dra. Thaís Soprani Ayala.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

Universidade Estadual do Oeste do
Paraná – UNIOESTE

Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Gandra

Universidade Estadual do Oeste do
Paraná – UNIOESTE

Prof. Dr. Kelvinson Viana

Universidade Federal da Integração
Latino-Americana – UNILA

BIOGRAFIA RESUMIDA

Daniela Patricia Tres, natural de Rondinha, Rio Grande do Sul, Brasil, nascida em 10 de novembro de 1989, graduou-se em Enfermagem pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Cascavel, tendo finalizado o curso em 13 de dezembro de 2013. Ingressou no Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* – Residência em Gerenciamento de Enfermagem em Clínica Médica e Cirúrgica em março de 2014, finalizando-a em fevereiro de 2016. Em junho de 2021, iniciou as atividades como aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas. Funcionária do município de Cascavel desde 2017, atualmente lotada como Enfermeira Assistencial na Unidade de Pronto Atendimento do Jardim Veneza. Atualmente desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli e coorientada pela Prof. Dra. Thais Soprani Ayala.

*“Permita-me, ó Pai, compreender seus
planos para a minha vida e
entender o tempo que planeja para que
cada acontecimento se apresente”.*

Autor desconhecido.

*Dedico este trabalho a minha família e
meu namorado, que me deram forças
para avançar cada etapa.
Vocês foram fundamentais!*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por saber o tempo de todas as coisas e por nos dar forças a cada amanhecer.

Ao meu pai, **Lauro**, e minha mãe, **Solange**, por todos os ensinamentos, honestidade e amor.

A minha irmã, **Diana**, que me fortaleceu neste processo e em todos os outros da minha vida.

Ao meu namorado, **Nelson**, por todo amor e cuidado comigo, você é especial, agradeço a Deus por ter você na minha vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rafael**, por todo seu conhecimento e paciência, sempre disponível para sanar dúvidas, sempre junto nos experimentos, você é incrível. Obrigada por tudo. Sem você, não teria sido possível.

A minha coorientadora, **Prof. Dra Thais**, obrigada por todo conhecimento, amizade, tranquilidade, paciência e incentivo diário no laboratório. Sem você, não teria sido possível.

Obrigada à técnica de laboratório, **Janaína**, que tornou a vivência no laboratório leve, obrigada por ajudar nos experimentos, você foi fundamental.

As minhas colegas de mestrado, **Scheila e Juliana**, dividimos alegrias, tristezas, incertezas e nos apoiamos.

Obrigada **Carla, Mariana**, pela ajuda nos experimentos. Agradeço a todas **as iniciações científicas** pela colaboração no trabalho.

A minha banca, **Prof. Dr Kelvinson e Prof Dr. Rinaldo**, obrigada pelas considerações e enriquecimento da dissertação.

Ao meu trabalho, que deu sustentabilidade financeira para eu conseguir concluir esta fase.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PCF), por toda estrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho e por me permitir realizar mais este sonho.

AValiação DO USO DE FIBRA OBTIDA POR ELETROFIAÇÃO CONTENDO ÓLEO OZONIZADO NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CAUSADAS POR *Leishmania amazonensis* EM MODELO ANIMAL

RESUMO:

INTRODUÇÃO: A leishmaniose cutânea (LC) é uma doença negligenciada, apresentando aumento de casos anualmente, sendo que as lesões da LC geram cicatrizes severas, com abalos psicossociais aos portadores. Os tratamentos disponíveis atualmente são de custo elevado, nefrotóxicos, hepatotóxicos e com relatos de resistência, além disso, os pacientes por vezes não aderem aos mesmos devido aos efeitos colaterais e posologia. O óleo de girassol ozonizado vem sendo utilizado para tratamento de feridas. A eletrofiação permite o desenvolvimento de nanofibras incorporadas a diversos compostos, que se destacam pelo baixo custo e por ter atividade celular. **OBJETIVO:** Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi testar o óleo de girassol ozonizado incorporado a fibras eletrofiadas, a fim de serem utilizadas em conjunto com o tratamento de referência (antimoniato de meglumina), em lesões cutâneas causadas pela *Leishmania amazonensis*, em modelo animal. **METODOLOGIA:** Estudo experimental, no qual 4 grupos de camundongos fêmeas Balb/C foram infectados com *L. amazonensis*, sendo que o primeiro grupo foi tratado apenas com o antimoniato de meglumina, o segundo foi tratado com antimoniato de meglumina e óleo de girassol ozonizado incorporado à fibra eletrofiada, o terceiro foi tratado com antimoniato de meglumina e óleo de girassol incorporado à fibra eletrofiada, e o quarto grupo não foi tratado. **RESULTADOS:** A concentração de ozônio no óleo e na fibra manteve-se estável. Não houve diferença estatística em relação à produção de óxido nítrico, perda de peso dos animais, secreção de IL-6 e TNF- α , espessura das lesões e contagem de leucócitos nos grupos estudados. Macroscopicamente, o grupo 1 apresentou cicatrização praticamente completa da lesão. Em relação à carga parasitária presente na lesão na pata do animal, observou-se a presença da mesma após 30 dias apenas no grupo 2. Em relação à avaliação da atividade leishmanicida do óleo ozonizado sobre formas amastigotas *in vitro*, houve diferença estatística apenas nos grupos tratados com antimoniato de meglumina e nas concentrações de óleo ozonizado 300 $\mu\text{g/ml}$ e 150 $\mu\text{g/ml}$. Histologicamente, o antimoniato de meglumina apresentou maior espessura da epiderme, sendo significativo perante os demais grupos, apresentou o menor infiltrado de leucócitos. **CONCLUSÃO:** São necessários novos estudos para aprimorar a concentração benéfica do ozônio no óleo, pois na literatura ainda há muitas lacunas e controvérsias sobre o assunto, assim será possível a realização de estudos com resultados promissores *in vivo*.

PALAVRAS-CHAVE: Fibra eletrofiada; leishmaniose cutânea; ozônioterapia.

EVALUATION OF THE ELECTROSPINNING FIBER CONTAINING OZONATED OIL ON WOUNDS CAUSED BY *Leishmania amazonensis* IN AN EXPERIMENTAL MODEL

ABSTRACT:

INTRODUCTION: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected disease, with cases increasing annually, with CL lesions generating severe scars, causing psychosocial shocks to sufferers. The treatments currently available are high cost, nephrotoxic, hepatotoxic and with reports of resistance, in addition, patients sometimes do not adhere to them due to side effects and dosage. Ozonated sunflower oil has been used to treat wounds. Electrospinning allows the development of nanofibers incorporated with various compounds, which stand out for their low cost and cellular activity. **OBJECTIVE:** Therefore, the objective of this work was to test ozonized sunflower oil incorporated into electrospun fibers, to be used in conjunction with the reference treatment (meglumine antimoniate), in skin lesions caused by *Leishmania amazonensis*, in an animal model. **METHODOLOGY:** Experimental study, where 4 groups of female Balb/C mice were infected with *L. amazonensis*, the first group was treated only with meglumine antimoniate, the second was treated with meglumine antimoniate and ozonized sunflower oil incorporated into the fiber electrospun, the third was treated with meglumine antimoniate and sunflower oil incorporated into the electrospun fiber and the fourth group was not treated. **RESULTS:** The ozone concentration in the oil and fiber remained stable. There was no statistical difference in relation to nitric oxide production, animal weight loss, IL-6 and TNF- α secretion, lesion thickness and leukocyte count in the groups studied. Macroscopically, group 1 showed practically complete healing of the lesion. Regarding the parasitic load present in the lesion on the animal's paw, its presence was observed after 30 days, only in group 2. Regarding the evaluation of the leishmanicidal activity of the ozonized oil on amastigote forms in vitro, there was a statistical difference only in the groups treated with meglumine antimoniate and ozonized oil concentrations of 300 $\mu\text{g/ml}$ and 150 $\mu\text{g/ml}$. Histologically, meglumine antimoniate showed greater thickness of the epidermis, being significant compared to other groups, and presented the smallest leukocyte infiltrate. **CONCLUSION:** New studies are needed to improve the beneficial concentration of ozone in oil, as there are still many gaps and controversies in the literature on the subject, so it will be possible to carry out studies with promising results *in vivo*.

KEY WORDS: Electrospun fiber; cutaneous leishmaniasis; ozone therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1 LEISHMANIOSES.....	21
1.2 OZONIOTERAPIA.....	24
1.3 ELETROFIAÇÃO	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	29
3.2 MANUTENÇÃO DOS PARASITAS.....	30
3.3 MANUTENÇÃO E CUIDADO COM OS ANIMAIS.....	30
3.4 OBTENÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO	30
3.5 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE OZÔNIO	30
3.6 OBTENÇÃO DA FIBRA ATRAVÉS DA ELETROFIAÇÃO CONTENDO ÓLEO OZONIZADO E NÃO OZONIZADO	31
3.7 INOCULAÇÃO DOS PARASITAS.....	32
3.8 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	32
3.9 ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO DA LESÃO	33
3.10 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	33
3.11 CULTURA DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> DA PATA LESIONADA – CARGA PARASITÁRIA	33
3.12 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS NA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS.....	34
3.13 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO	34
3.14 DOSAGEM DAS CITOCINAS TNF-A E IL-6.....	35
3.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO OZONIZADO SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS <i>IN VITRO</i>	35
3.16 ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 DOSAGEM DO OZÔNIO NO ÓLEO	37
4.2 ESPESSURA DAS LESÕES	38
4.3 PESO DOS ANIMAIS.....	41
4.4 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	42

4.5 CULTURA DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> DA PATA LESIONADA – CARGA PARASITÁRIA I	45
4.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	46
4.7 DOSAGEM DAS CITOCINAS TNF-A, IL-6	48
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO OZONIZADO SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS <i>IN VITRO</i>	51
4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA	53
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59
7. ANEXOS:	67
7.1 AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Soluções preparadas para eletrofição, desenvolvidas no laboratório da UNIOESTE *campus* Toledo.....32

Tabela 2 – Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199. G1 - infectado e tratado com antimoniato de meglumina. G2 - infectado e tratado com antimoniato de meglumina associado a fibra eletrofiada incorporada com óleo de girassol ozonizado. G3 - infectado e tratado com antimoniato de meglumina associado a fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol. G4 – infectado e não tratado.....46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto da fibra eletrofiada contendo óleo de girassol ozonizado.....32

Figura 2 – Diferença do tamanho da pata infectada em mm, do primeiro para o último dia de experimento. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado; G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado.....38

Figura 3 – Análise morfológica das patas durante o tratamento. Foram selecionadas aleatoriamente as fotos de um camundongo por grupo, comparando e acompanhando a evolução do tratamento entre os dias 0, 7, 14, 21 e 28. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado.....40

Figura 4 – Diferença do peso final para o peso inicial dos camundongos participantes do experimento. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados.41

Figura 5 – Análise dos leucócitos sanguíneos comparando os grupos no início e fim do tratamento. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado.....42

Figura 6 – Análise dos linfócitos no primeiro e último dia experimento. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado.....44

Figura 7 – Dosagem de óxido nítrico em macrófagos murinos após 48 horas da eutanásia. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado; G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Valores de p: G1- G4 > 0,99; G4 – G2: 0,19; G4-G3: 0,32. Não houve diferença estatística nos grupos avaliados.....47

Figura 8 – Dosagem de IL-6 no soro de camundongos infectados com *L. amazonensis*, pelo método de ELISA. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Não houve diferença estatística entre os grupos.....49

Figura 9 – Dosagem de TNF- α no soro de camundongos infectados com *L. amazonensis*, pelo método de ELISA. G1: tratado com antimoníato de meglumina; G2: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Não houve diferença estatística nos dados analisados.....50

Figura 10 – Porcentagem de macrófagos infectados com amastigotas *in vitro* com os seguintes tratamentos: Meio + DMSO; Antimoníato de meglumina 300 $\mu\text{g/ml}$; óleo de girassol não ozonizado; óleo de girassol ozonizado nas seguintes diluições: 300 $\mu\text{g/ml}$; 150 $\mu\text{g/ml}$; 75 $\mu\text{g/ml}$; 37,5 $\mu\text{g/ml}$ e 9,125 $\mu\text{g/ml}$; * Grupos estatisticamente diferentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)52

Figura 11 – Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E no aumento de 200x. G1: tratado com antimoníato de meglumina; G2: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado.....54

Figura 12 – Espessura da epiderme. G1: tratado com antimoníato de meglumina; G2: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. * Significativamente diferente de G3 e G4 ($p < 0,05$) 56

Figura 13 – Infiltrado de leucócitos. G1: tratado com antimoníato de meglumina; G2: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. * Significativamente diferente de G1 e G2 ($p < 0,0001$).....57

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE: Ácidos Graxos Essenciais;

AL: Ácido Linoléico;

ANOVA: Análise de Variância;

AO: Ácido oleico;

BASF: Badische Anilin & Soda Fabrik;

B.O.D.: Biochemical Oxygen Demand;

CCMF: Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas;

CEUA: Comitê de Ética da Utilização de Animais;

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal;

COVID-19: Coronavirus disease 19;

COX2: Ciclo-oxigenase-2;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

EGF: Fatores de Crescimento Epidérmicos;

ELISA: Enzyme Lynked Immunosorbent Assay;

EROs: Espécies Reativas do Oxigênio;

GAPDH: Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase;

H&E: Coloração Hematoxilina – Eosina;

IFN- γ : Interferon Gama;

IGF-1: Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1;

IL-6: Interleucina 6;

IL-1 β : Interleucina 1 β ;

KOH: Hidróxido de Potássio;

LA: Ácido Linolênico;

LC: Leishmaniose Cutânea;

LIAU: Laboratório de Imunologia Aplicada da Unioeste;

LMC: Leishmaniose Mucocutânea;

LV: Leishmaniose Visceral;

LVA: Leishmaniose Visceral Americana;

MDA: Malondialdeído;

MO: Microrganismos;

MP: Macrófagos Peritoneais;

NF- κ B: Fator Nuclear Kappa Beta;

NO: Óxido Nítrico;

Nrf2: Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2, do inglês Nuclear factor erythroid 2-related factor 2;

OMS: Organização Mundial da Saúde;

OPAS: Organização Pan Americana de saúde;

PBAT: Poli Butileno Adipato Co-Tereftalato;

PBS: Solução salina tamponada com fosfato, do inglês Phosphate Buffered Saline;

PCF: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Unioeste;

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas;

PLA: Poli Ácido Láctico ou Polilactato;

PPAR-a: Proliferador de Peroxissoma;

PVPI: Iodopovidona;

RNA_m: Ácido Ribonucleico Mensageiro;

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio;

RPM: Rotações por Minuto;

RPMI: Roswell Park Memorial Institute;

Sb₅₊: Antimoniais Pentavalentes;

SEM: Erro Padrão da Média;

SFB: Soro Fetal Bovino;

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador β ;

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa;

UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná;

VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial.

LISTA DE SIGLAS

°C: Graus centígrados;

CHCl₃: Clorofórmio;

CH₃COOH: Ácido Acético Glacial;

cm: Centímetro;

Ecoflex®: Poli Butileno Adipato Co-Tereftalato – PBAT;

Ecovio®: Polímero Compostável Certificado com Bio-Conteúdo;

g: grama;

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio;

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico;

h⁻¹: Hora;

kV: Kilovolt;

KI: Iodeto de Potássio;

Kg: Quilograma;

M: molar;

mEq: Miliequivalente;

mL: Mililitro;

mm: Milímetros;

m/v: Massa por Volume;

m³: Metro Cúbico;

NaNO₂: Nitrito de Sódio;

Na₂S₂O₃: Tiosulfato de Sódio;

nm: Nanômetro;

O₃: Gás Ozônio;

pg: Picograma;

p/v: Peso por Volume;

v/v: Volume por Volume;

4-HNE: 4-hidroxinonenal;

μL: Microlitro;

μM: Micro Molar;

μg: Micrograma;

®: Marca Registrada.

1. INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses permanecem sendo doenças negligenciadas, afetando populações de baixa renda, com limitado acesso a serviços de saúde. Nas Américas, as leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública devido a sua magnitude, ampla distribuição geográfica, morbidade e mortalidade (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2022).

Em 2018, noventa e dois países ou territórios foram considerados endêmicos ou já haviam relatado casos de leishmaniose cutânea. Atualmente, há mais de 1 bilhão de indivíduos que residem em locais com risco de contrair a doença. Estima-se que 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea ocorram anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION; REGIONAL OFFICE FOR SOUTH-EAST ASIA, 2022).

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies do protozoário, *Leishmania* sp. Este é transmitido aos humanos pela picada de um mosquito fêmea (gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*) (SCHAIBLICH *et al.*, 2022); (NUWANGI *et al.*, 2023).

Os parasitas da *Leishmania* infectam principalmente os fagócitos mononucleares na região do ferimento causado pelos flebotomíneos, podendo ocorrer a disseminação. Esse parasita possui mecanismos para evadir no sistema imunológico do hospedeiro, manipulando respostas inflamatórias das células fagocíticas. Na pele do hospedeiro, uma lesão saliente, não cicatrizada ou autocurada e recorrente pode progredir no local da lesão, podendo ulcerar com bactérias secundárias a lesão (TSAI *et al.*, 2021).

A leishmaniose pode levar a lesões viscerais, cutâneas ou mucosas (BEZEMER *et al.*, 2023).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença crônica e sistêmica que, se não diagnosticada e tratada apropriadamente, pode evoluir a óbito em 90% dos casos. A forma clínica desta patologia envolve o sistema retículo endotelial, apresentando sintomas que podem variar desde uma infecção assintomática, até o aparecimento de sintomas crônicos e sistêmicos, como febre persistente, palidez, perda de peso, astenia, adinamia, associados a hepatoesplenomegalia exuberante (FERREIRA *et al.*, 2024).

A leishmaniose mucocutânea pode apresentar diversas manifestações, como lesões na cavidade oral e nasal, região subglótica, traquéia e cordas vocais. Alguns podem levar à destruição da estrutura facial e, em casos extremos, pode levar à morte (NUWANGI *et al.*, 2023).

A leishmaniose cutânea causa úlceras e lesões nodulares na pele que cicatrizam espontaneamente com cicatrizes ao longo de anos. A leishmaniose mucocutânea úlcera e deforma a membrana das mucosas, não cicatriza espontaneamente e pode ser letal (BEZEMER *et al.*, 2023)

A leishmaniose cutânea é endêmica em 18 países do continente americano. É a forma clínica mais frequente e com maior distribuição geográfica. Cerca de 90% dos casos apresentam lesões localizadas, únicas ou múltiplas e estão associadas a 15 espécies de *Leishmania*. Outras formas clínicas da leishmaniose cutânea são a disseminada (causada principalmente pela *L. braziliensis*) e cutânea difusa (causada na maioria dos casos pela *L. amazonensis* e *L. mexicana*), que representam 5% do total de casos, com tratamento difícil e recidivas frequentes (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2023).

A leishmaniose cutânea, de acordo com a literatura, é considerada um distúrbio dermatológico associado ao estigma e ao sofrimento psicológico. Cicatrizes severas reduzem a qualidade de vida de forma direta e, também, indiretamente, através de um processo de rejeição social e autodepreciação (BENNIS *et al.*, 2018).

O tratamento para a leishmaniose cutânea é complexo, depende da espécie da leishmania, o local de contaminação, forma clínica e idade do paciente (BARBA, 2022).

Desde 1940, os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) são a primeira escolha no tratamento, apesar de sua toxicidade, administração parenteral, custo elevado (IRANPOUR; HOSSEINZADEH; ALIPOUR, 2019); (CASTRO *et al.*, 2023). O uso destas drogas pode levar a arritmias, toxicidade renal, hepatite e pancreatite (BARROSO *et al.*, 2022). A administração do antimoniato de meglumina pode ser realizada de forma parenteral ou intralesional, dependendo das manifestações clínicas (RODRIGUES *et al.*, 2020).

A miltefosina é uma alquilfosfocolina desenvolvida como agente antitumoral e sua atividade leishmanicida foi descoberta posteriormente; atualmente é o único tratamento de via oral eficaz. Os efeitos adversos incluem diarreia, vômito, elevação

transitória de transaminas e disfunção renal leve, observados em mais da metade dos pacientes em tratamento (BARBA, 2022).

A anfotericina B é um agente antifúngico polieno, faz parte da segunda linha de tratamento para as leishmanioses, seu uso é limitado, devido à nefrotoxicidade e reações relacionados à infusão. Para reduzir os efeitos colaterais e aumentar a tolerância do fármaco, são utilizados lipossomas com nanocarreadores para distribuição da Anfoterina B, permitindo maior penetração na pele, liberação controlada do fármaco, deposição do mesmo, direcionamento nas camadas da pele, menor absorção sistêmica e efeitos adversos limitados na administração transdérmica (KHAMESIPOUR *et al.*, 2022).

Termoterapia significa utilizar temperatura para o tratamento de alguns processos, como os inflamatórios. A termoterapia é utilizada em pacientes com leishmaniose cutânea localizada, utilizando compressas térmicas com água quente, raios infravermelhos, ultrassom, eletroterapia, radiação a laser de CO₂ e radiofrequência. A radiofrequência utiliza equipamentos com eletrodos que descarregam 50°C por 30 segundos em lesões, seu uso é limitado devido ao alto custo (GALINDO-SEVILLA, 2022).

Esforços para a produção de vacinas estão sendo realizados, porém até o momento sem sucesso (BAMOROVAT *et al.*, 2023).

A escassez de recursos financeiros é um dos principais fatores que implicam na aderência ao tratamento, principalmente nas leishmanioses (BAMOROVAT *et al.*, 2023).

A complexidade biológica do parasita *Leishmania* e sua interação com o hospedeiro mamífero através de diferentes vias, são fatores que complicam o resultado da doença (NAHIDI *et al.*, 2020). Dessa forma, faz-se necessária a pesquisa por novas alternativas terapêuticas, visando a redução dos efeitos colaterais, da toxicidade e dos custos dos medicamentos já existentes (LUSTOSA *et al.*, 2021).

Recentemente, a terapia combinada utilizando imunomoduladores com compostos anti-*Leishmania* padrão vem aumentando e muitos estudos demonstram os benefícios da coadministração de drogas anti-*Leishmania* com imunoestimulantes **podem diminuir o curso do tratamento**, diminuindo a dose da droga padrão, atrasando ou diminuindo a resistência e aumentando a eficácia do regime terapêutico (TRIPATHI *et al.*, 2017).

O tratamento deve ser fundamentado em diversos âmbitos, como a manifestação clínica, localização das lesões e possibilidade de integração de outros medicamentos do que apenas a eliminação do parasita. O tratamento baseado na modulação do sistema imunológico, em associação aos fármacos tradicionais, uma vez que o parasita pode interferir na via pró inflamatória dos macrófagos, poderia evidenciar uma via alternativa para a promover o completo fechamento das lesões sem deformar a cicatriz (DE SOUZA LIMA; MENOLLI; AYALA, 2023).

1.2 OZONIOTERAPIA

A ozonioterapia foi descoberta em 1840 pelo pesquisador alemão Dr. Christian Friedrich Schoenbein. O físico Dr. Werner Von Siemens, em 1857, desenvolveu o aparelho que transformava o gás ozônio em átomos de oxigênio, todavia no decorrer da Primeira Guerra Mundial o exército alemão utilizou a ozonioterapia para cuidar de seus soldados (LIMA *et al.*, 2022).

No Brasil, foi autorizada a realização da ozonioterapia como procedimento de caráter complementar em 2023 (BRASIL, 2023).

O ozônio é uma molécula instável que consiste em três átomos de oxigênio que podem rapidamente se decompor em oxigênio e átomos de oxigênio atuando com um forte oxidante para matar microrganismos (ZENG; LU, 2018).

O ozônio dissolvido no plasma ou no soro, rapidamente reage, formando espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e produtos da oxidação de lipídeos, contendo 4-hidroxinonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA). Estas moléculas podem regular a sinalização do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) e a via do fator nuclear Kappa B (NF-kB), que é fundamental para a modulação da reação intracelular redutora e o balanço inflamatório (LIU *et al.*, 2022), sendo capaz de agir no metabolismo celular e na regeneração tecidual (CARDOSO *et al.*, 2021).

O ozônio age como modulador do sistema imune, promovendo o recrutamento de leucócitos, peróxido de hidrogênio, liberação de citocinas, aumenta a fagocitose, desde que ative monócitos e linfócitos T, potencializando a capacidade inflamatória (CABRAL *et al.*, 2020).

A terapia com ozônio tem sido utilizada em cerca de 50 processos patológicos, incluindo doenças de pele, hérnia de disco intervertebral, diabetes e complicações,

COVID-19, doenças da mucosa oral, cardiovasculares, cerebrovasculares e câncer. Possui potencial analgésico, antienvhecimento, antitumoral, alivia a resistência à quimioterapia (LIU *et al.*, 2022).

O uso do ozônio estimula a cicatrização das feridas cutâneas devido às suas ações bactericida e fungicida, estimula a angiogênese, aumenta o aporte de oxigênio nas células, seja na aplicação tópica e/ou sistêmica (NOBRE, V.P.C.C.; GEHRING JUNIOR, W.; GAMBA, M.A.; OLIVEIRA, L.S.S.; TAMINATO, 2021).

A ozonioterapia é reconhecida como prática integrativa e complementar de baixo custo e segurança comprovada, que utiliza a aplicação do ozônio por diversas vias de administração, com finalidade terapêutica (NOBRE, V.P.C.C.; GEHRING JUNIOR, W.; GAMBA, M.A.; OLIVEIRA, L.S.S.; TAMINATO, 2021).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial depende da medicina tradicional para as suas necessidades de cuidados de saúde primários (MAHMOUDVAND *et al.*, 2015).

Aproximadamente um terço de todos os medicamentos fitoterápicos tradicionais destinam-se ao tratamento de doenças inflamatórias, em comparação com apenas 1-3 % de medicamentos modernos (LANIA *et al.*, 2019).

Os óleos vegetais são utilizados para condições inflamatórias sistêmicas e cutâneas, principalmente aqueles ricos em ácidos graxos essenciais (AGE) e não essenciais, pois esses compostos (como o ácido alfa-linolênico, linoléico (LA) e oleico (AO)) são necessários para a regulação dos ácidos graxos, composição celular e manutenção da integridade epidérmica (VAUGHN *et al.*, 2018).

Os AL e alfa-linolênico são ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) classificados como essenciais, enquanto os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) como o AO são classificados como não essenciais (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

O óleo de girassol é tradicionalmente utilizado na culinária devido a sua fácil acessibilidade e aos benefícios à saúde. É amplamente preferido em países europeus, no México e em alguns lugares da América do Sul (PETRARU; URSACHI; AMARIEI, 2021).

Os componentes significativos deste óleo são o ácido linoléico (59–65%) (AL) e os ácidos oleicos (30–70%) (AO). Estes representam 48-78% do perfil total de ácidos graxos. Há também uma pequena porcentagem de ácidos palmítico e esteárico (15% para ambos os ácidos graxos) (ZOUMPOULAKIS *et al.*, 2017).

O óleo de girassol também é rico em vitaminas, minerais e fitoquímicos como carotenóides, tocoferóis, fenóis e tocotrienóis com atividade antioxidante. A variação da composição depende da espécie da planta e dos métodos de extração empregados (PETRARU; URSACHI; AMARIEI, 2021).

O uso de óleo de girassol na pele é generalizado e, devido à presença de AL, pode melhorar a função da barreira cutânea, ativando o receptor alfa ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- α), que regula a proliferação de queratinócitos, acelerando o reparo da barreira cutânea, como demonstrado por estudos *in vitro* e modelos animais (VAUGHN *et al.*, 2018).

O óleo de girassol (*Helianthus annuus L.*) contém AGE em sua composição, tais como o AL e o AO que possuem ação sobre a resposta imunológica e seus metabólitos interferem no processo inflamatório. O AL é fundamental no sistema fibrinolítico por seu processo quimiotáxico, que contribui na produção de metaloproteínas, acelerando o processo cicatrizante (TORRES *et al.*, 2021).

Óleos ozonizados consistem em ozônio e ácidos graxos insaturados, sendo que estes últimos mantêm a atividade do ozônio. O óleo ozonizado mantido a 4°C mantêm suas propriedades estáveis e atividades farmacológicas por 2 anos (LIU *et al.*, 2022; ZENG; LU, 2018; VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005).

Óleos ozonizados podem agir em conjunto com o sistema imunológico por meio da melhora da resposta inflamatória, através da liberação de fatores de crescimento epidérmicos (EGF), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator transformador de crescimento, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BRITO, *et al.*, 2022).

O óleo ozonizado facilita a cura das feridas pela inibição da inflamação, suprimindo significativamente a inflamação da injúria dos fibroblastos enquanto promove a função dos fibroblastos e da migração epitelial mesenquimal (XIAO *et al.*, 2017).

Para o tratamento de feridas, o óleo de girassol ozonizado é uma alternativa viável, devido ao baixo custo, facilidade de aplicação e poucos efeitos colaterais (FARINA; ROCHA MOTA, 2022).

1.3 ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação é um procedimento conhecido desde o começo do século XX, mesmo que existam escassos relatos em literatura neste período. Esse conhecimento se atinha aos físicos, o marco no desenvolvimento do método está associado as patentes geradas nas décadas de 1930 e 1940. Em 1969, Taylor detalhou em uma publicação o estudo do jato da solução produzida durante o processo a partir da diferença de potencial do campo elétrico o denominado cone de Taylor (SANTOS, 2020).

A eletrofiação é uma técnica que consiste em extração de fibras ultrafinas por meio de um viscoelástico fluido sob a influência de um forte campo elétrico. As nanofibras têm sido exploradas pela engenharia de tecidos, por sua capacidade de mimetizar a arquitetura da matriz extracelular (XUE *et al.*, 2019).

A eletrofiação se destaca por ser uma técnica de montagem experimental simples e que permite a produção de micro/nanofibras a partir de uma solução polimérica (MIGUEL *et al.*, 2018).

O Ecovio® é um polímero utilizado na produção das membranas poliméricas, comercializado pela empresa Badische Anilin & Soda Fabrik (BASF) é composto por blenda formada de dois polímeros biodegradáveis, o poli (butileno adipato co-tereftalato) – PBAT, produzido pela mesma empresa e cujo nome comercial é Ecoflex®; e o poli (ácido láctico) ou polilactato – PLA, um poliéster alifático. O PLA é análogo a um poliestireno e 14 poli (tereftalato de etileno), com vantagens como plasticidade térmica e rigidez. O PBAT pertence à classe de poliésteres alifáticos aromáticos biodegradáveis e assim como o PLA, possui como vantagem sua rigidez (ANTUNES, 2020).

A técnica de eletrofiação para produção de nanofibras à base de um polímero biodegradável e associadas a um fármaco torna-se uma alternativa promissora para o tratamento de doenças e dores crônicas (CARVALHO, 2019).

As principais vantagens incluem: custo relativamente baixo do sistema, versatilidade, facilidade de processamento e possibilidade de produção de nanofibras com uma ampla gama de morfologias e materiais (MIGUEL *et al.*, 2018).

A capacidade de produzir facilmente materiais nesta escala de tamanho biológico criou um renovado interesse em eletrofiação para aplicações em engenharia de tecidos e entrega de fármacos (JALILI; HOSSEINI; MORSHED, 2005).

A inclusão de fármacos como o cilostazol, eletrofiado ao polímero de Ecovio®, demonstrou ser uma opção para a liberação transdérmica do medicamento. O Cilostazol é utilizado para o tratamento de doença vascular periférica, redução do sintoma de claudicação intermitente, prevenção de acidente vascular cerebral. A associação do medicamento através da eletrofiação ao polímero de Ecovio®, objetiva reduzir os efeitos colaterais e uma utilização mais prática e eficiente (ANTUNES, 2020).

O fármaco aceclofenaco, utilizado para o alívio da dor, associado a membranas produzidas por eletrofiação, demonstrou grande potencial para liberação transdérmica do fármaco *in vitro*, sendo uma alternativa a administração oral, que está associada ao desenvolvimento de úlceras gástricas (CARVALHO, 2019).

A incorporação de óleo essencial em nanofibras por meio da técnica de eletrofiação tem demonstrado redução do tempo de cicatrização de feridas infectadas por bactérias, fungos, além de atividade antioxidante (REZA *et al.*, 2021).

O uso de um tratamento local associado ao sistêmico teria hipoteticamente um efeito aditivo, pois o segundo eliminaria os parasitas circulantes ou remanescentes localizados na periferia da lesão. Oferece a oportunidade de aumentar a taxa de cura se comparada com qualquer outra abordagem terapêutica disponível em monoterapia (ARANA, 2019).

Com base na revisão realizada, o desenvolvimento de um tratamento alternativo por meio de fibra obtida por eletrofiação contendo óleo de girassol ozonizado, em conjunto ao tratamento de referência teriam potencial para cicatrizar feridas causadas por *L. amazonensis*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de cicatrização da fibra obtida por eletrofiação contendo óleo ozonizado em lesões causadas por *Leishmania amazonensis* em modelo animal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar ozonização do óleo de girassol, bem como quantificar a concentração do ozônio no mesmo e sua estabilidade;
- Confeccionar fibras por meio da técnica de eletrofiação e incorporar óleo ozonizado e não ozonizado na mesma, e verificar a concentração de ozônio na fibra contendo óleo ozonizado;
- Induzir a infecção por *Leishmania amazonensis* nas patas dos animais e verificar o sucesso desta com a abertura das lesões;
- Realizar cultura do tecido lesionado e verificar a viabilidade de parasitas presentes nas lesões causadas por *L. amazonensis* em camundongos tratados ou não pela fibra obtida por eletrofiação contendo óleo ozonizado;
- Avaliar histologicamente a presença de infiltrado celular no tecido lesionado em camundongos tratados ou não pela fibra obtida por eletrofiação contendo óleo ozonizado;
- Avaliar os efeitos sistêmicos do tratamento com fibra obtida por eletrofiação contendo óleo ozonizado por meio da cultura de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos infectados por *L. amazonensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. A pesquisa foi aprovada pelo parecer: 11-22/2022 (Anexo I).

3.2 MANUTENÇÃO DOS PARASITAS

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) estéril e 5 µg/mL de hemina, adicionando-se, ocasionalmente, 2% de urina masculina estéril, uma vez que a urina humana estimula o crescimento da leishmania (ARMSTRONG; PATTERSON, 1994). Os parasitas foram mantidos por meio de repiques semanais, a fim de manter sua viabilidade.

3.3 MANUTENÇÃO E CUIDADO COM OS ANIMAIS

Camundongos fêmeas BALB/c, oriundos do Biotério da UNIOESTE, com 6-8 semanas de vida, que receberam dieta padrão em ração comum e água *ad libitum*, foram mantidos em caixas padrão em grupos de 4 animais, com ciclo de claro e escuro de 12 horas.

3.4 OBTENÇÃO DO ÓLEO OZONIZADO

Utilizado óleo de girassol comercial, adicionado 10% de água destilada além de Tween 80 como agente emulsionante. O óleo foi ozonizado a partir de um gerador de ozônio (Ozone & Life, mod. 1.5 RM) acoplado a um tanque de oxigênio por um período de 14 horas a uma concentração de saída de ozônio de 49 microgramas por ml (µg/mL).

3.5 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE OZÔNIO

O procedimento foi realizado segundo (MARTINEZ TELLEZ, G., LEDEA LOZANO, O., & DÍAZ GÓMEZ, 2006), utilizando-se 0,5 g de óleo, ao qual foram adicionados 30 mL de uma mistura 3:2 de Ácido acético glacial (CH₃COOH) e Clorofórmio (CHCl₃), e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio (KI). Após homogeneização, a mistura ficou no escuro por 24 horas. Posteriormente, foram

adicionados 30 mL de água destilada e a mistura foi vagarosamente titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 M até a cor amarela quase desaparecer. Finalmente, adicionamos 5 mL de amido e a titulação continuou até a cor azul desaparecer. Os valores de peróxido (Pv) foram obtidos pela fórmula:

$$PV = 10xV/W$$

Onde V é o volume de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ em mL e W é o peso do óleo em g. Ao final da técnica, o Pv obtido, em mEq/kg, foi convertido em concentração de ozônio em mg/g de óleo, de acordo com Skalska *et al.*, 2009 (SKALSKA *et al.*, 2009). Visto que a densidade de óleos vegetais varia de 920 a 930 kg/m^3 (SAHASRABUDHE *et al.*, 2017), foi considerado 1g de óleo como sendo equivalente a 1 mL, obtendo-se assim a concentração de ozônio estimada em $\mu\text{g/mL}$ de óleo.

3.6 OBTENÇÃO DA FIBRA ATRAVÉS DA ELETROFIAÇÃO CONTENDO ÓLEO OZONIZADO E NÃO OZONIZADO

Para o processo de eletrofiação, soluções de Ecovio® foram preparadas na concentração de 15% (m/v) de polímero, utilizando como solvente uma mistura de clorofórmio e dimetilformamida nas proporções (85/15). Juntamente à solução foram adicionados 10% (v/v) do óleo de girassol, e a solução foi mantida em agitação por 24 horas para garantir total solubilização do polímero. No total, três soluções foram preparadas e serão apresentadas na Tabela 1, quais sejam: uma sem o óleo de girassol (solução 1), uma contendo 10% do óleo de girassol (solução 2) e uma contendo 10% do óleo de girassol ozonizado (solução 3). Após o preparo das soluções, elas foram submetidas ao processo de eletrofiação, sendo utilizados os seguintes parâmetros: fluxo de $1,8 \text{ mL h}^{-1}$; tensão de 15 kV; distância agulha coletor de 15 cm e coletor do tipo rotativo a 1800 rpm. Um total de 5 mL foram eletrofiados para a confecção dos não tecidos com dimensões finais de aproximadamente 15 x 20 cm. As fibras eletrofiadas contendo óleo de girassol ozonizado tiveram suas concentrações de ozônio mensuradas de acordo com o item 3.5.

Tabela 1 – Soluções preparadas para eletrofição, desenvolvidas no laboratório da Unioeste campus Toledo

Solução	Ecovio® (m/m) %	Clorofórmio/DMF (v/v) %	Óleo de Girassol (v/v) %	Óleo de girassol ozonizado (v/v) %
1	15	85/15	-	-
2	15	85/15	10	-
3	15	85/15	-	10

Fonte: A autora (2024).

Figura 1 – Aspecto da fibra eletrofiada contendo óleo de girassol ozonizado



Fonte: A autora (2024)

3.7 INOCULAÇÃO DOS PARASITAS

Para o desenvolvimento do modelo experimental de lesão, os animais receberam a inoculação de uma suspensão de *L. amazonensis* com aproximadamente 1×10^6 parasitas, interdigital da pata posterior direita, por meio de seringa e agulha, sob anestesia com quetamina 50mg/kg e xilazina 5 mg/kg.

3.8 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 4 grupos, cada um contendo 4 animais:

- Grupo I – Animais infectados com *L. amazonensis*, tratados com Antimoniato de meglumina (Glucantime®) intraperitoneal;

- Grupo II - Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com Antimoniato de meglumina (Glucantime®) intraperitoneal associado à fibra contendo óleo de girassol ozonizado sobre o leito da ferida;
- Grupo III - Animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com Antimoniato de meglumina (Glucantime®) intraperitoneal associado à fibra contendo óleo de girassol não ozonizado sobre o leito da ferida;
- Grupo IV - Animais infectados com *L. amazonensis* e não tratados.

3.9 ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO DA LESÃO

O tratamento iniciou quando surgiram as lesões, cerca de 18 semanas após a inoculação. Para isso, nos grupos que receberam o tratamento com fibra, esta foi cortada de modo a cobrir todo o leito da ferida, e foi aplicada todos os dias durante 30 dias. Os grupos submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina receberam a droga diariamente, intraperitoneal, na dose de 50 mg/Kg. Antes de administrar a droga, foi realizada a pesagem dos animais;

Uma vez por semana até o término do tratamento foi mensurado o tamanho da lesão em milímetros, com auxílio de um paquímetro digital. Registros fotográficos foram realizados na mesma periodicidade para avaliar a evolução das lesões.

3.10 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

Antes de iniciar o tratamento, e ao seu término, foi realizada a contagem dos leucócitos sanguíneos dos animais. Para obtenção do sangue, foi realizado um pequeno corte com tesoura na extremidade da cauda e coletado 5 µL de sangue, o qual foi adicionado à 45 µL de líquido de Turk, e as células foram contabilizadas na câmara de Neubauer.

3.11 CULTURA DE PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* DA PATA LESIONADA – CARGA PARASITÁRIA

Após a eutanásia dos animais, 1/4 fragmento da lesão foi retirado de forma asséptica com Iodopovidona (PVPI), com o auxílio de tesoura e pinça, e foi colocado em um microtubo contendo 550 µL de Meio 199 com seu volume previamente pesado. Após a adição do fragmento, o tubo foi novamente pesado a fim de se obter o peso

do tecido. Posteriormente, o fragmento foi depositado em placa de 6 poços, contendo 1,5 mL de Meio 199 e macerado com auxílio do embolo de uma seringa de 10 mL. Após a maceração, o conteúdo foi passado em uma seringa de 1 mL cerca de 20 vezes, com cuidado e evitando pegar partes de tecido, então o material foi acondicionado em tubo de 15 mL estéril, onde foram adicionados mais 2 mL de Meio 199.

Em uma placa de 96 poços, foi adicionado ao primeiro poço 150 µL de meio 199 e 75 µL da suspensão, foi feita então uma diluição seriada utilizando 150 µL de meio e 150 µL da suspensão precedente, obtendo-se os títulos de 1/3, 1/6, 1/12, 1/24, 1/48, 1/96, 1/192 e 1/384. A placa foi embalada com papel filme e incubada em B.O.D a 25°C. A cada 10 dias, até completarem 30 dias, foram observadas em microscópio invertido avaliando-se a titulação conforme a presença de formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis*.

3.12 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS NA CAVIDADE PERITONEAL DE CAMUNDONGOS

Os macrófagos foram obtidos através da exposição do peritônio dos camundongos eutanasiados, com anterior assepsia, seguida de infusão de 10 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) estéril a 4°C na cavidade peritoneal. Em seguida, foi realizada a massagem na região peritoneal para desprendimento dos macrófagos. O PBS foi retirado com a própria agulha e seringa de inoculação e a suspensão resultante foi transferida para um tubo estéril cônico e centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm) por 6 minutos, a 4°C. O “*pellet*” de células obtido após centrifugação foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB. Foi realizada a contagem em câmara de Neubauer e o volume foi ajustado para a concentração de 2×10^5 células por poço, sendo estas então plaqueadas, em triplicata, em placas de 96 poços. Após a incubação por 2 horas, a 37°C sob 5% de dióxido de carbono (CO₂), foram realizados os procedimentos específicos para cada dosagem.

3.13 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO

O método descrito por (GREEN *et al.*, 1982), com modificações, foi utilizado para este processo. As placas foram incubadas a 37°C sob 5% de CO₂ por 24 e/ou

48 horas. A mensuração dos níveis de NO foi realizada pela dosagem de nitrito no sobrenadante, por isso 100 µL do mesmo, de cada poço, foram utilizados para reagir com 100 µL do reagente de Griess (solução 1:1 de naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v)) e após 10 minutos para a estabilização da formação do produto (composto azo) foi realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm. Os dados foram expressos em micro molar (µM), através da curva-padrão obtida com concentrações molares conhecidas de Nitrito de Sódio (NaNO₂) em meio RPMI.

3.14 DOSAGEM DAS CITOCINAS TNF-A E IL-6

A produção da citocina interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) no plasma de camundongos foi detectada pelo método de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), usando kits da Peprtech, Inc® (New Jersey, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

3.15 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO OZONIZADO SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS *IN VITRO*

No fluxo laminar, foram abertas as placas de 24 poços estéreis, com uma pinça foi adicionada uma lamínula redonda (13x13 mm) no fundo de cada poço. Os macrófagos foram coletados assepticamente (conforme item 3.12).

Foram transferidos 100 microlitros para cada poço da placa, exatamente sobre a lamínula até esgotar o tubo Falcon. Foi utilizado um microscópio invertido para observar as células, após foi colocada a placa na estufa de CO₂ por 1-2 horas (37 graus, 5% CO₂).

Após a aderência dos macrófagos, foi adicionado meio de cultura contendo os parasitas. As *Leishmanias* foram preparadas para o inóculo, contando e acertando o número para um inóculo de 5 vezes o número de macrófagos. Neste caso, 1x10⁶ parasita/poço em RPMI 10% de SFB.

Após 6 horas de incubação em ambiente estufa de CO₂ (34°C, 5% CO₂), foi lavado com PBS para retirar parasitas no sobrenadante. Na sequência foram adicionados os tratamentos: antimoniato de meglumina (300µg/ml), óleo não ozonizado contendo a mesma quantidade utilizada na maior concentração de óleo

ozonizado, óleo ozonizado nas concentrações 300, 150, 75, 37,5 e 9,4 µg/mL. Foram realizadas no mínimo duas repetições de cada tratamento.

Após a incubação, foram retirados os sobrenadantes, lavados 1 vez com PBS. Fixados às células com 300 µL de metanol por 5 minutos. Lavados 2 vezes com PBS, corados com Giemsa após 20 minutos e, posteriormente, lavados 3 vezes com água destilada. As lamínulas foram coladas com Entelan em lâminas de vidro identificadas, após foi procedida a contagem dos macrófagos, mínimo de 50 e as amastigotas em seu interior.

3.16 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A técnica histológica utilizada nesse experimento seguiu o protocolo do laboratório de Histologia da UNIOESTE, orientado pelo professor Dr. João Paulo Arruda de Amorim, tal qual descrita a seguir:

Com a completa descalcificação do material, ele foi passado para o processo de inclusão do material em parafina (técnica de inclusão de material em parafina, descrita em ANEXO 7.2).

O material foi processado em cortes histológicos seriados de 5 micrômetros. A lâmina com o material cortado, ainda em parafina, foi fixada em estufa a 80°C durante 24 horas. Após isso, foi desparafinada, hidratada e corada pelas técnicas de coloração Hematoxilina & Eosina (técnica de coloração descritas em ANEXO 7.3).

As análises dos achados histológicos foram realizadas de forma quantitativa por meio de leitura em microscópio (Olympus, modelo CX31), nas objetivas de 20x, avaliando-se o infiltrado de leucócitos e a espessura do epitélio, corados em H&E.

Para as análises histológicas, foi utilizado o programa Image Pro-Plus 6.0 e foram avaliados o tamanho da epiderme em µm e a quantidade de leucócitos presentes na derme do tecido. Para essas análises, foram separados aleatoriamente o material de 2 animais por grupo, foram fotografados pelo menos 6 cortes histológicos de cada pata, com três fotos de cada corte histológico. Para a medição da epiderme, foram escolhidos sete locais aleatórios em cada fotografia. Para a contagem do infiltrado, foram escolhidos nove locais aleatoriamente para as contagens em cada uma das imagens, **compreendo**, em todas as imagens, a mesma área final. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. Quanto à normalidade,

foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk e, sendo considerados paramétricos, foram submetidos à análise estatística pelo teste de ANOVA com pós-teste de Tukey.

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à estatística analítica para comparação das médias, através do teste de ANOVA. Foram utilizados os testes de Tukey paramétrico e o teste t não pareado, adotando o nível de confiança de 95%, tendo significância valores de $p < 0,05$. Foi usado o programa GraphPad Prism, versão 9.0 e Microsoft Excel, ambos para plataforma Windows 10 da Microsoft.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DOSAGEM DO OZÔNIO NO ÓLEO

O ozônio é um gás instável, porém é estabilizado e aplicado através de óleos, cremes e água ozonizada (THERAPY *et al.*, 2021). Não há protocolo definido na literatura a respeito da ozonização de óleos (BRITO JÚNIOR *et al.*, 2022). A dosagem de concentração de ozônio no primeiro dia foi de 76,53 mg/g, 72,71 mg/g no décimo dia e 66,84 mg/g no trigésimo dia, já a concentração de ozônio na fibra após 6 meses foi de 86,96 mg/g. Observa-se que a concentração se manteve estável, corroborando com os resultados já encontrados na literatura (VALACCHI; FORTINO; BOCCI, 2005).

A mesma metodologia foi utilizada para dosar o óleo sem ozônio, onde verificou-se a concentração de 11,74 mg/g.

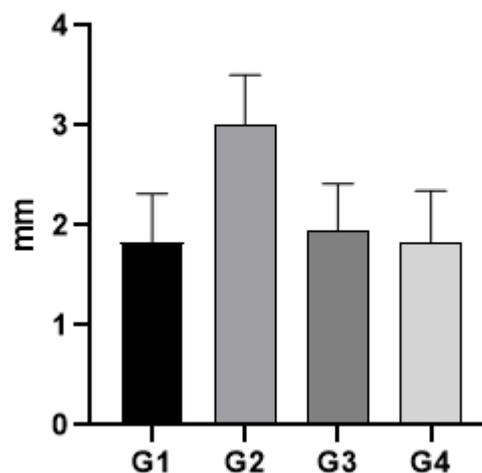
O conhecimento da concentração é importante para justificar possíveis riscos ou benefícios. A baixa concentração pode não desencadear reações oxidativas para ativar vias bioquímicas e efeitos medicinais, a alta concentração pode exceder a capacidade metabólica do sistema antioxidante orgânico, limitando seus benefícios. Não há padronização em relação à concentração ideal de ozônio para obtenção dos benefícios em casa fase de cicatrização das feridas (SANGUANINI *et al.*, 2020).

4.2 ESPESSURA DAS LESÕES

Após a inoculação dos flebotomíneos, as promastigotas infectam fagócitos da pele, transformando-se e multiplicando-se em amastigotas no interior de fagolisossomos. As lesões cutâneas se desenvolvem lentamente através da infecção dos macrófagos, comumente limitada ao local da inoculação. Inicialmente um nódulo se forma e evolui cronicamente, podendo ulcerar conforme a intensificação da reação inflamatória (NORONHA *et al.*, 2023).

Figura 2 – Diferença do tamanho da pata infectada em mm, do primeiro para o último dia de experimento. G1: infectado e tratado com antimoníato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado; G3: infectado e tratado com antimoníato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Não houve diferença significativa entre os grupos

DIFERENÇA DA MEDIDA DAS PATAS DO PRIMEIRO PARA O ÚLTIMO DIA DE EXPERIMENTO



Fonte: A autora (2024).

Apesar de os resultados não apresentarem significância, o grupo 2, tratado com o antimoníato de meglumina associado a fibra eletrofiada contendo óleo de girassol ozonizado, apresentou uma tendência negativa em relação à medida inicial e final das patas, o que pode ser atribuído a vários fatores. Primeiramente, foi realizada a troca diária das fibras, pois elas não se mantinham 24 horas nos membros, os camundongos, durante o tratamento, desenvolveram mecanismos para retirar a fibra das patas, fazendo com que ela agisse por um período curto.

O tempo de infecção e aparecimento das lesões demorou cerca de 5 meses – um tempo maior se comparado a outros trabalhos realizados no nosso laboratório (PIVOTTO, 2021); (CABRAL, 2022). Outro ponto importante se deve à concentração de ozônio na fibra, pois não há padronização neste processo (BRITO JÚNIOR *et al.*, 2022). Assim, há dados controversos na literatura em relação aos benefícios do ozônio *versus* sua concentração (JUBER, 2022); (JORDANA; PAULA; IRRAZABAL, 2021).

Em trabalho utilizando uma concentração equivalente a cerca de 1\3 a utilizada em nosso trabalho, observou-se maior neovascularização durante o reparo tecidual, além de maior deposição de colágeno do tipo I a partir da terceira semana de tratamento (SANGUANINI, 2019).

Já em outro trabalho, utilizando uma concentração um pouco maior da utilizada em nosso trabalho, observou-se melhor efeito sobre a cicatrização nos primeiros sete dias de tratamento, promovendo maior retração e neovascularização na ferida (VALACCHI *et al.*, 2011).

Sendo assim, são necessários mais estudos em relação às concentrações de ozônio e seus benefícios e efeitos deletérios.

O G3 tratado com fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol associado ao antimoniato de meglumina apresentou a segunda maior diferença entre a medida inicial e final no aumento da lesão.

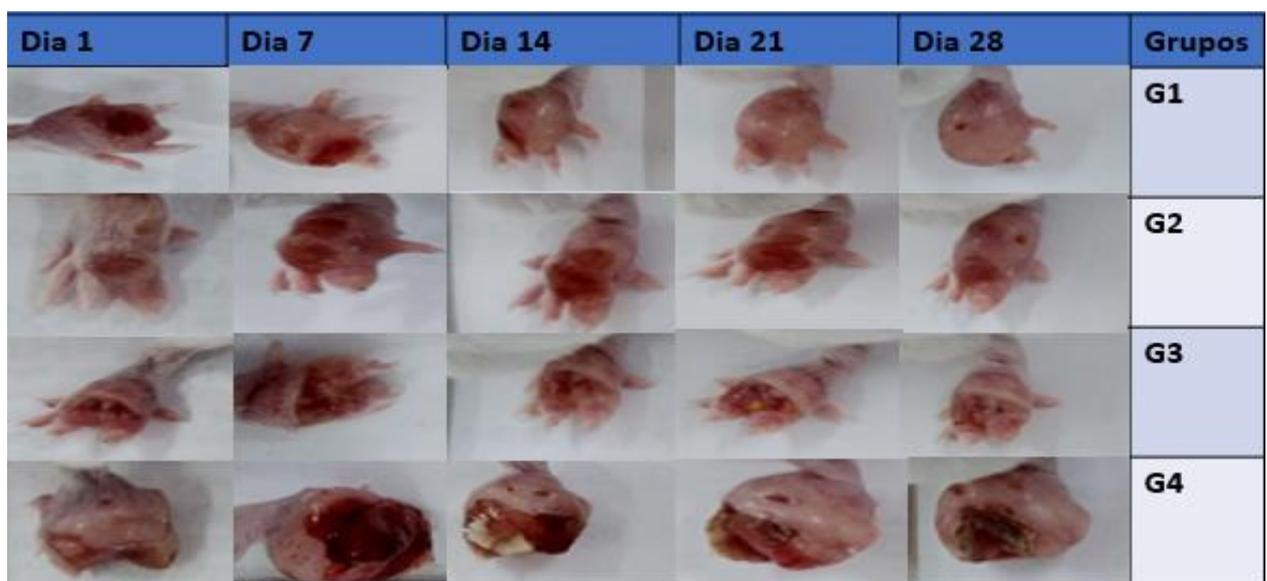
Este óleo contém alta concentração de ácido linoleico, que é um poderoso mediador pró inflamatório, que acelera a cicatrização de feridas, podendo ser utilizado como terapia alternativa na cura de feridas de segunda intenção (MARQUES; PEIXOTO; MESSIAS, 2004). Fato que não foi observado neste estudo, podendo estar relacionado à questão do tempo restrito desta fibra sobre o membro afetado do animal, devido aos mecanismos desenvolvidos pelos mesmos, que retiravam sua fibra, sendo necessária sua aplicação diária.

O G1, tratado somente com o antimoniato de meglumina, obteve a terceira maior diferença entre a medida inicial e final das patas, e isso se deve o mecanismo de ação do fármaco que, de acordo com a bula do medicamento, ainda é incerto, porém presume-se que várias enzimas de *Leishmania spp* sejam inibidas seletivamente. Esses agentes também parecem inibir a fosfofrutoquinase, com subsequente bloqueio da produção de adenosina trifosfato. A inibição destas enzimas leva o parasita à morte.

A menor diferença entre a medida inicial e final se deu no grupo não tratado, resultado que pode ter vindo de uma deficiência deste estudo, em que os grupos apresentavam poucos animais e dentro de cada grupo havia muita diferença da resposta entre eles (fato que pode ser observado na Figura 3 – a qual mostra os aspectos macroscópicos da lesão), onde o pior resultado é do grupo 4. Estatisticamente, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Em relação ao aspecto da lesão, o G1 e o G2 apresentaram os melhores resultados macroscopicamente, nos quais o antimoniatado de meglumina praticamente fechou a lesão do G1, já que seu mecanismo de ação inibe alguns mecanismos de sobrevivência do parasita. Já em relação ao G2, houve uma evolução positiva de cicatrização pela própria ação do antimonial pentavalente associado ao ozônio que auxilia no processo cicatricial. No grupo 3 praticamente houve evolução constante da lesão, apesar de o óleo de girassol possuir ácido linoleico, que acelera a cicatrização de feridas em conjunto com o antimoniatado de meglumina, que interfere no mecanismo de sobrevivência do parasita. Já o G4, houve uma piora progressiva da lesão e desfigurante do membro.

Figura 3 – Análise morfológica das patas durante o tratamento. Foram selecionadas aleatoriamente as fotos de um camundongo por grupo, comparando e acompanhando a evolução do tratamento entre os dias 0, 7, 14, 21 e 28. G1: infectado e tratado com antimoniatado de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoniatado de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoniatado de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado



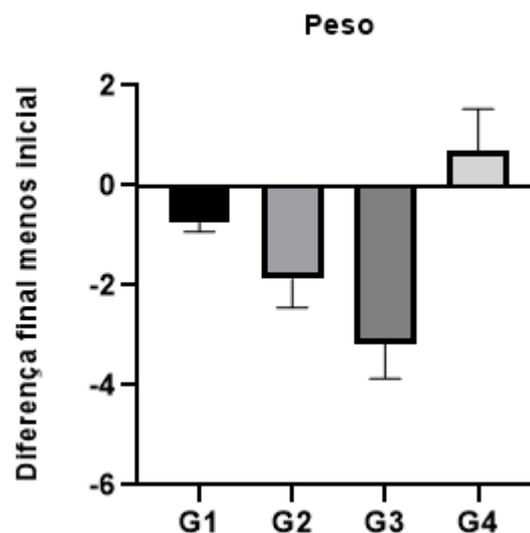
Fonte: A autora (2024).

4.3 PESO DOS ANIMAIS

Observamos que todos os animais submetidos ao tratamento tiveram perda de peso, dado que corrobora com um dos eventos adversos do uso do antimoniato de meglumina, que pode levar à anorexia (FIRDOUS; YASINZAI; RANJA, 2009) e, assim, à perda de peso. Já os animais que não receberam tratamento, ganharam peso ao final do estudo. O baixo aporte energético pode levar a quadros de desnutrição e ineficiência do uso de substratos (LÓPEZ PLAZA; BERMEJO LÓPEZ, 2017).

A desnutrição torna o indivíduo vulnerável a infecção, conseqüentemente deteriora o estado nutricional. Os nutrientes estimulam o sistema imune e participam do processo de cicatrização de feridas. O estado nutricional tem sido associado como risco de desenvolvimento de leishmaniose mucosa, possui influência no curso da leishmaniose tegumentar americana, com um menor percentual de cura das lesões cutâneas e maior tempo de cicatrização das lesões mucosas (SOUZA, 2014).

Figura 4 – Diferença do peso final para o peso inicial dos camundongos participantes do experimento. G1: infectado e tratado com antimoniato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados



Fonte: A autora (2024).

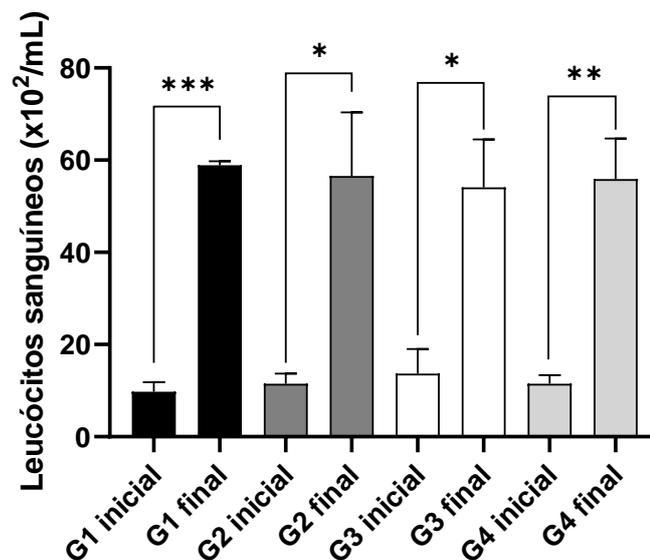
4.4 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS

Os leucócitos polimorfonucleares, neutrófilos, são as primeiras células que migram para o ponto de inoculação da leishmania, mostram-se como importantes na fagocitose destes parasitos, com o auxílio das imunoglobulinas e sistema complemento. Os leucócitos participam da lise dos parasitos, contribuindo para o controle da infecção (LAURENTI, 2010).

No decorrer do processo inflamatório, diversos fatores solúveis estão associados no recrutamento de leucócitos, aumentando a expressão de moléculas de adesão e de quimioatração. Muitos desses mediadores solúveis modulam a ativação de células residentes como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos, e recrutam novas células inflamatórias como monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos; além disso, alguns desses mediadores causam resposta sistêmica (VASCONCELOS, 2017).

Pacientes com leishmaniose podem apresentar febre prolongada, hepatoesplenomegalia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, perda de peso e se não tratados, evoluem para um quadro de caquexia, entre outros sinais e sintomas (GONÇALVES *et al.*, 2022).

Figura 5 – Análise dos leucócitos sanguíneos comparando os grupos no início e fim do tratamento. G1: infectado e tratado com antimoniato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado



Fonte: A autora (2024).

Na análise inicial dos leucócitos, antes do início do tratamento, verificamos que o grupo 3 possuía os animais com maior número de leucócitos, seguido pelo grupo 2, grupo 4, e o menor número foi do grupo 1.

Na análise final dos leucócitos, após a realização dos tratamentos, com exceção do grupo 4, verificamos que o grupo 1, tratado com antimoniato de meglumina, apresentou o maior recrutamento de leucócitos. Estes dados corroboram com a literatura, uma vez que ocasionais, pode ocorrer leucocitose como sendo um dos efeitos do tratamento isolado com o antimoniato de meglumina (PAHO, 2018). Dados que não corroboram com o estudo realizado para averiguar o perfil hematológico de pacientes infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, causadoras da leishmaniose tegumentar americana, tanto antes do tratamento quanto pós-tratamento com antimonial pentavalente, em que dos 15 pacientes avaliados, 14 não apresentaram diferença nos leucócitos e plaquetas antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina (GUERREIRO *et al.*, 2013).

O grupo 2, infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, apresentou o segundo maior recrutamento de leucócitos. Não corroborando com dados da literatura em que a exposição ao ozônio regula a resposta inflamatória, diminuindo a infiltração de leucócitos. Esse efeito anti-inflamatório ocorre devido ao aumento da liberação de TGF- β que, dentre suas funções, reduz a quimiotaxia das células de defesa, limitando a fase inflamatória e levando à proliferativa, sendo ainda responsável pela proliferação fibroblástica e produção de matriz extracelular (SANGUANINI, 2019). Porém, como a fibra eletrofiada contendo óleo de girassol ozonizado estava associada ao tratamento intraperitoneal com antimoniato de meglumina, este aumento de leucócitos pode estar relacionado ao segundo tratamento.

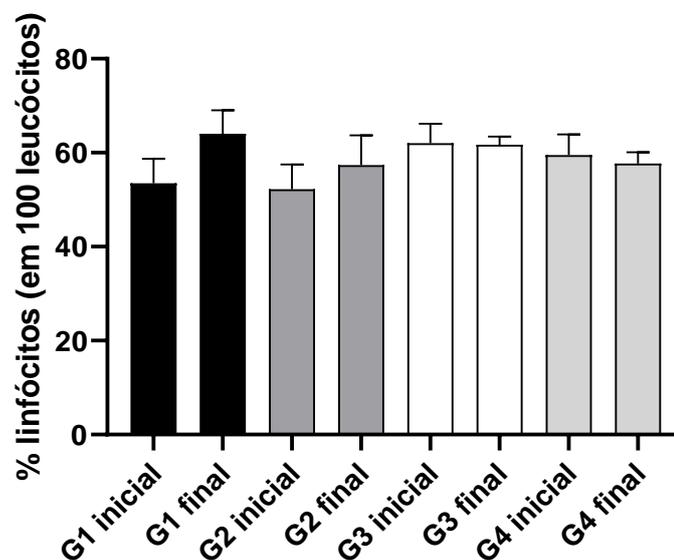
O grupo 4, infectado e não tratado, apresentou o terceiro melhor recrutamento de leucócitos, embora os leucócitos mononucleares sejam as células predominantes no foco inflamatório somente em torno das 72 horas de infecção, as poucas células mononucleares presentes na derme nas primeiras horas após a inoculação de *Leishmania* podem fagocitar os parasitos (LAURENTI, 2010).

O menor recrutamento ocorreu no grupo 3, infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol, apesar

de o ácido linoleico, presente no óleo de girassol, potencializar a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares após lesão tecidual (HARTOP; PROTTEY, 1976).

Houve diferenças significativas dentro do mesmo grupo em relação à contagem inicial para a final. Em relação ao procedimento de verificação do diferencial de leucócitos, verificou-se os seguintes resultados em relação aos linfócitos:

Figura 6 - Análise dos linfócitos no primeiro e último dia experimento. G1: infectado e tratado com antimoniato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado



Fonte: A autora (2024).

Na primeira contagem em que se avaliou o número de linfócitos nos animais infectados por *L. amazonensis*, antes do início do tratamento, observou-se que o grupo 3 apresentou maior porcentagem de linfócitos, seguidos pelo grupo 4, grupo 1, finalmente pelo grupo 2.

Na leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis*, ocorre a diminuição do número de linfócitos, indicando uma forte inibição da resposta imune de células T (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Não houve diferença estatística nos grupos analisados antes do início dos tratamentos. Já no último dia do experimento, observou-se que o grupo 1 infectado e tratado com antimoniato de meglumina apresentou maior porcentagem de linfócitos, dados que corroboram com o estudo, no qual, ao final do experimento, o grupo tratado

com antimoniato de meglumina e o grupo tratado com óleo de girassol ozonizado obtiveram praticamente a mesmo número de recrutamento de linfócitos (CABRAL, 2022).

O grupo 3, infectado e tratado com antimoniato de meglumina, associado a fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol, representou o segundo melhor resultado acerca da porcentagem de linfócitos. O ácido linoleico (LA) é um importante regulador positivo da atividade de células T CD8 +, melhorando a aptidão metabólica, prevenindo a exaustão e estimulando um fenótipo semelhante à memória com funções efetoras superiores (NAVA LAUSON *et al.*, 2023). Seguido pelo grupo 4, infectado e não tratado, corroborando com a literatura em que na leishmaniose cutânea causada por *L. amazonensis*, ocorre diminuição do número de linfócitos, indicando uma forte inibição da resposta imune de células T (SILVEIRA *et al.*, 2009).

O grupo 2, infectado e tratado com antimoniato de meglumina associado a fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, apresentou a menor porcentagem de linfócitos. No sistema imunológico, o ozônio estimula a liberação de citocinas por linfócitos, neutrófilos e monócitos, reestabelecendo a imunidade celular e estimulando a proliferação de linfócitos T e B (BERGER *et al.*, 2018), não corroborando com os achados no estudo em questão.

Não houve diferença estatística nos grupos analisados

4.5 CULTURA DE PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* DA PATA LESIONADA – CARGA PARASITÁRIA I

O cultivo de formas promastigotas após o tratamento da lesão é eficaz para evidenciar a influência dessa intervenção na diminuição de parasitas viáveis, já que, teoricamente, um número menor de células se multiplica menos no decorrer do tempo (PIVOTTO, 2021).

Para a realização deste experimento, foi extraído $\frac{1}{4}$ da pata infectada de cada animal. No primeiro dia portanto, houve crescimento no maior título no grupo 4, infectado e não tratado, seguido do grupo 3 que é a associação do antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol, depois houve um pequeno crescimento no grupo 1, tratado apenas com antimoniato de meglumina, no grupo 2 não houve crescimento, podendo haver uma associação entre o tratamento

interno e externo. No segundo dia de observação não houve crescimento em nenhum dos grupos observados. Já no último dia, apenas houve crescimento do grupo 2.

Tabela 2 – Diluição da cultura de fragmentos das patas infectadas com *L. amazonensis* em meio 199. G1 - infectado e tratado com antimoniato de meglumina. G2 - infectado e tratado com antimoniato de meglumina associado a fibra eletrofiada incorporada com óleo de girassol ozonizado. G3 - infectado e tratado com antimoniato de meglumina associado a fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol. G4 – infectado e não tratado

	Dia 10	Dia 20	Dia 30
G1	1/6	-	-
G2	-	-	1/96
G3	1/192	-	-
G4	1/384	-	-

Fonte: A autora (2024).

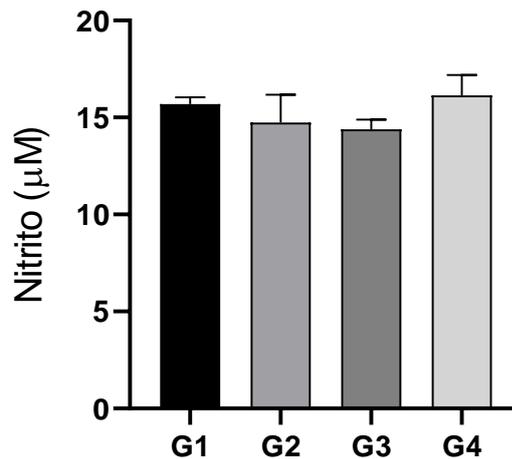
O primeiro resultado pode ser explicado pela ação do antimoniato de meglumina em relação a sua ação, que inibe alguns mecanismos de sobrevivência do parasita, e a sua evolução nos demais dias pode estar relacionada ao seu mecanismo de ação, bem como a falta de adição de meio a cada leitura, levando a escassez de nutrientes para o parasita. O resultado apresentado pelo grupo 2 pode estar associado ao uso do microscópio invertido, podendo ter ocorrido erro na leitura destes dados no dia 10 e 20. Em relação aos grupos 3 e 4, a inexistência de parasitas do dia 20 e 30 pode estar relacionada à escassez de nutrientes, pois não foi adicionado meio a cada leitura.

4.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Muitos mecanismos inatos intracelulares microbicidas controlam a infecção pela *Leishmania*, os macrófagos estão entre as primeiras células imunes envolvidas na eliminação do parasita através da degradação de enzimas fagolisossomais, liberação de citocinas, produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, este último é o mecanismo mais crítico contra parasitas intracelulares fagocitados como a *Leishmania* (NORONHA *et al.*, 2023).

Foi realizada a dosagem de NO dos macrófagos peritoneais 48 horas após o término do experimento *in vivo*.

Figura 7 – Dosagem de óxido nítrico em macrófagos murinos após 48 horas da eutanásia. G1: infectado e tratado com antimoniato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado; G3: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Valores de p: G1- G4 > 0,99; G4 – G2: 0,19; G4-G3: 0,32. Não houve diferença estatística nos grupos avaliados



Fonte: A autora (2024).

O grupo que apresentou maior produção de óxido nítrico foi o grupo 4, infectado e não tratado, dados que não corroboram com a literatura, uma vez que a interação entre o parasita e o hospedeiro desvia a L-arginina para produção de poliaminas e reduz a produção de óxido nítrico e atividade microbicida dos macrófagos (ZANATTA, 2022).

O segundo maior produtor de óxido nítrico foi o grupo 1, que utilizou a antimoniato de meglumina. Os antimoniais produzem citocinas pró-inflamatórias para uma adequada estimulação dos macrófagos. A literatura demonstra em estudo *in vitro*, o aumento do TNF- α , e por consequência dos níveis de óxido nítrico na presença do antimoniato de meglumina (MUNIZ-JUNQUEIRA; DE PAULA-COELHO, 2008).

O terceiro maior produtor de óxido nítrico foi o grupo 2, que utilizou o antimoniato de meglumina em associação com a fibra contendo óleo de girassol ozonizado. O ozônio aumenta a liberação de NO, promove a vasodilatação, induz a gradação de radicais de oxigênio livre, levando a uma mudança nos níveis de enzimas antioxidantes e na atividade do sistema imunológico (MATOS; CASTRO; GOMES,

2021). Apesar do ozônio e do antimoniato de meglumina estimular a produção de NO, este grupo apenas ficou com a terceira melhor produção.

O grupo 3, tratado com antimoniato de meglumina e com a fibra eletrofiada contendo óleo de girassol, obteve a menor produção de óxido nítrico. Dados que corroboram com a literatura, uma vez que o ácido linoleico presente no óleo de girassol age na mediação da resposta inflamatória e na diminuição da produção de óxido nítrico (SILVA, 2013).

Apesar do ozônio possuir atividade imunomodulatória sobre o óxido nítrico, não houve diferença estatística na produção de NO nos grupos estudados.

4.7 DOSAGEM DAS CITOCINAS TNF-A, IL-6

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, atuam na intercomunicação celular, sua liberação acontece devido a diferentes estímulos e interagem com receptores específicos, regulando a função celular e estão relacionadas ao processo inflamatório (BARBOSA *et al.*, 2018).

A IL-6, exerce um efeito pleiotrópico em um amplo espectro de eventos biológicos e participa da resposta imune como uma potente citocina pró inflamatória envolvida na resposta inflamatória aguda, também coordena atividades anti-inflamatórias ou reparadoras essenciais para a resolução da inflamação. Em tecidos lesionados, a IL-6 possui mecanismos para limitar a lesão tecidual, estimulando a angiogênese, produção e organização de colágeno, proliferação de queratinócitos e infiltração de leucócitos (CISTERNA *et al.*, 2021).

Em relação à dosagem de IL-6 no soro de camundongos infectados com *L. amazonensis* pelo método de ELISA, podemos observar que o grupo que recebeu o tratamento com antimoniato de meglumina isoladamente apresentou maior secreção de IL-6, dados que não corroboram com a literatura, uma vez que o antimoniato de meglumina, reduziu a hiperalgesia mecânica e a produção de IL-1b e IL-6 induzida por *L. amazonensis* (DA SILVA *et al.*, 2018).

A segunda maior dosagem de IL-6 foi do grupo 4, infectado e não tratado, dados que corroboram com literatura, em que a infecção por *L. amazonensis* aumenta citocinas pró-inflamatórias/pró-hiperalgésicas como IL-1b, TNF- α e IL-6 (DA SILVA *et al.*, 2018).

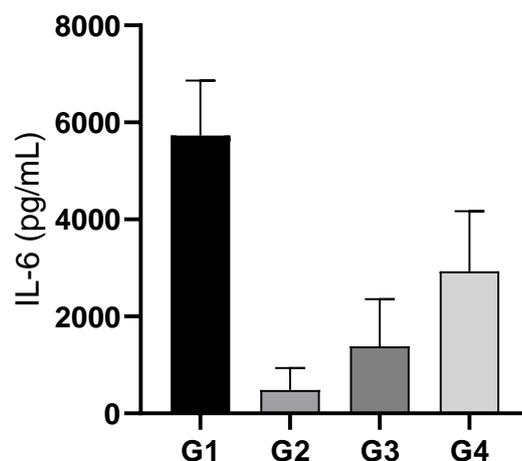
A terceira melhor secreção de IL-6 ocorreu no grupo 3, tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada, contendo óleo de girassol. Dados em conformidade com a literatura, que demonstra que animais tratados com óleo de girassol apresentaram maior expressão de RNAm de IGF-1, leptina, IL-6 e IFN- γ e menores níveis séricos de IL-6 (LANIA, 2018).

O grupo que recebeu antimoniato de meglumina associado com a fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado apresentou menor secreção de IL-6, dados que corroboram com a literatura, em que o ozônio age na inibição das citocinas pró-inflamatórias e melhora a revascularização (COSTA *et al.*, 2018), agindo por meio, por exemplo, da inibição da ativação da NFkB (PEDRONI SILVA *et al.*, 2021). A NFkB ativada é translocada para o núcleo, e isso causa ativação de vias de inflamação intracelular com produção de IL-1 β , IL-6, TNF- α e COX-2, que iniciam a cascata apoptótica (ANZOLIN; BERTOL, 2018).

O ozônio pode modular o acúmulo de neutrófilos localmente, expressão de IL-6, TNF- α , além de aumentar a capacidade antioxidante local (FONSECA *et al.*, 2022).

Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados.

Figura 8 – Dosagem de IL-6 no soro de camundongos infectados com *L. amazonensis*, pelo método de ELISA. G1: infectado e tratado com antimoniato de meglumina; G2: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: infectado e tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Não houve diferença estatística entre os grupos

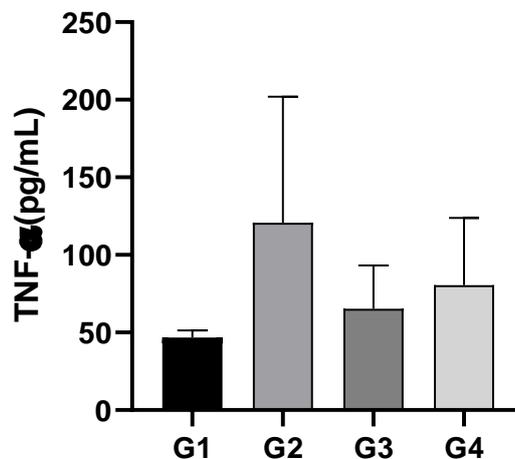


Fonte: A autora (2024).

O fator de necrose tumoral (TNF), citocina pró-inflamatória, tem mostrado modular múltiplas vias de sinalização, com ampla gama de efeitos a jusante. O TNF desempenha um papel vital na resposta imune típica através da regulamentação de uma série de vias que abrangem uma resposta imediata reação inflamatória com envolvimento imunológico inato significativo, bem como ativação celular com subsequente proliferação e morte celular programada ou necrose (HOLBROOK *et al.*, 2019).

O TNF- α foi descoberto em 1975 por Carswell e colaboradores, sendo considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em diferentes partes do corpo (BARBOSA *et al.*, 2018).

Figura 9 – Dosagem de TNF- α no soro de camundongos infectados com *L. amazonensis*, pelo método de ELISA. G1: tratado com antimoniato de meglumina; G2: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. Não houve diferença estatística nos dados analisados



Fonte: A autora (2024).

Na dosagem de TNF- α , no soro dos camundongos infectados com *L. amazonensis* pelo método de ELISA, podemos observar que o grupo tratado com antimoniato de meglumina associado a fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, apresentou a maior dosagem de TNF- α se comparado aos demais grupos. O ozônio reage com ácidos graxos polinsaturados *in vivo*, formando vários compostos de peroxidação e H₂O₂, que podem apresentar uma regulação com

o processo de transdução de sinal, promovendo uma infinidade de respostas imunes aumentando o TNF, interferon e IL-2 (WEN; CHEN, 2020).

O ozônio pode modular o acúmulo de neutrófilos localmente, expressão de IL-6, TNF- α , além de aumentar a capacidade antioxidante local (FONSECA *et al.*, 2022).

O grupo 4, infectado e não tratado, apresentou a segunda maior dosagem de TNF- α . Estudos sugerem que esta citocina, na leishmaniose, seja responsável pela indução da arginase I, que juntamente com outras citocinas do tipo Th2, levam ao aumento proporcional no número de amastigotas intracelulares em macrófagos murinos, estando relacionada à manutenção ou exacerbação da imunossupressão da enfermidade (SILVEIRA, 2019).

O grupo 3, tratado com antimoniato de meglumina associado a fibra contendo óleo de girassol, apresentou a terceira maior dosagem de TNF- α . Em estudo realizado com tratamento *in vitro* com ácido linoleico, houve diminuição na concentração de TNF- α (MAGDALON, 2011).

O grupo 1, tratado com antimoniato de meglumina, produziu a menor quantidade de TNF- α , apesar de a literatura relatar que a droga aumentou a função fagocítica *in vitro* de monócitos e neutrófilos de indivíduos saudáveis através de receptores de complemento. Além disso, esta droga causou um aumento na produção de ânion superóxido (O_2^-) e TNF por fagócitos (MUNIZ-JUNQUEIRA; DE PAULA-COELHO, 2008).

A dosagem do TNF- α , que foi realizada pode ter tido influência do tempo, foi realizada após 48 horas de incubação, sendo que seu pico ocorre nas primeiras 12h de incubação (CABRAL, 2022).

Apesar de o grupo 2 apresentar a maior dosagem de TNF- α , não houve diferença estatística entre os grupos analisados.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÓLEO OZONIZADO SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS *IN VITRO*

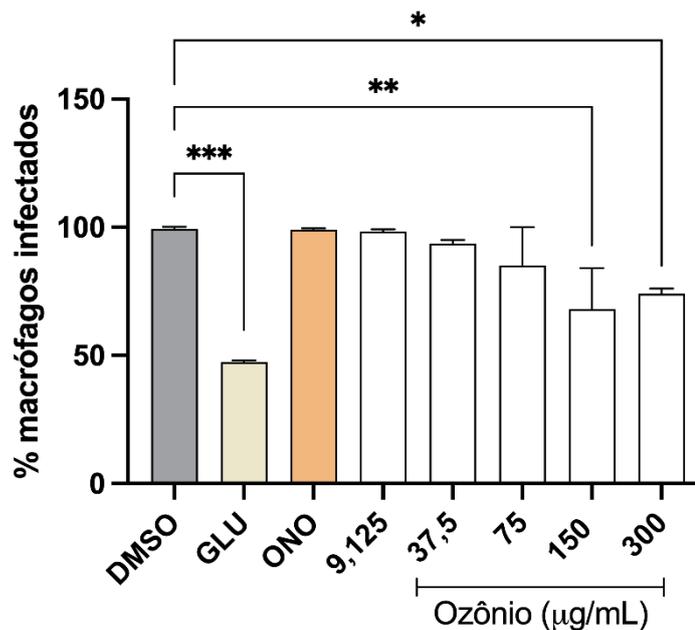
As promastigotas introduzidas na pele aderem-se à superfície dos macrófagos e células de Langerhans, passando para o meio intracelular e transformando-se em amastigota. Nos macrófagos, os parasitos ficam no vacúolo parasitóforo. Embora os macrófagos sejam células fagocitárias, as Leishmanias desenvolvem mecanismos

capazes de subverter sua capacidade microbicida, sobrevivendo neste ambiente tóxico, multiplicam-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (BRASIL, 2017).

Os macrófagos podem fornecer abrigo aos parasitas por longos períodos, atuar com células apresentadoras de antígenos e promover a secreção de moléculas que induzem a resposta inflamatória e a eliminação do agente infeccioso (PEREIRA, 2018).

Terapêuticas que atuam sobre as amastigotas do parasita em ambiente intracelular são importantes para o controle de infecção.

Figura 10 – Porcentagem de macrófagos infectados com amastigotas in vitro com os seguintes tratamentos: Meio + DMSO; Antimoniato de meglumina 300 µg/ml; óleo de girassol não ozonizado; óleo de girassol ozonizado nas seguintes diluições: 300 µg/ml; 150 µg/ml; 75 µg/ml; 37,5 µg/ml e 9,125 µg/ml; * Grupos estatisticamente diferentes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



Fonte: A autora (2024).

Em relação à porcentagem de macrófagos infectados, no grupo DMSO, observou-se a maior porcentagem, seguido pelo grupo tratado com o óleo de girassol não ozonizado, seguido do grupo tratado com a diluição 9,125 µg/ml de óleo de girassol ozonizado, seguindo da diluição 37,5 µg/ml de óleo de girassol ozonizado, após da diluição 75 µg/ml de óleo de girassol ozonizado, posteriormente se

apresentou a diluição 300 µg/ml de óleo de girassol ozonizado seguido da diluição 150 µg/ml, após o meio e a menor porcentagem de macrófagos infectados ocorreu no grupo tratado com antimoniato de meglumina. Houve diferença estatística apenas nos grupos tratados com DMSO, óleo de girassol não ozonizado, concentração de óleo ozonizado 300 µg/ml e 150 µg/ml em relação ao grupo utilizando o tratamento de referência.

Sendo que nos grupos tratados com DMSO e óleo não ozonizado, se localizavam a maior quantidade de parasitas em ambiente intracelular, possibilitando que a infecção se alastrasse. Já o que foi tratado com antimoniato de meglumina, apresentou a menor porcentagem de macrófagos infectados, corroborando com dados a respeito da sua ação contra formas amastigotas intracelulares de *Leishmania sp*, comprometendo o potencial redox levando danos ao DNA do parasito (SIQUEIRA, 2014).

As concentrações de 150 µg/ml e 300 µg/ml tiveram, respectivamente, após o antimoniato de meglumina, a menor porcentagem de macrófagos infectados.

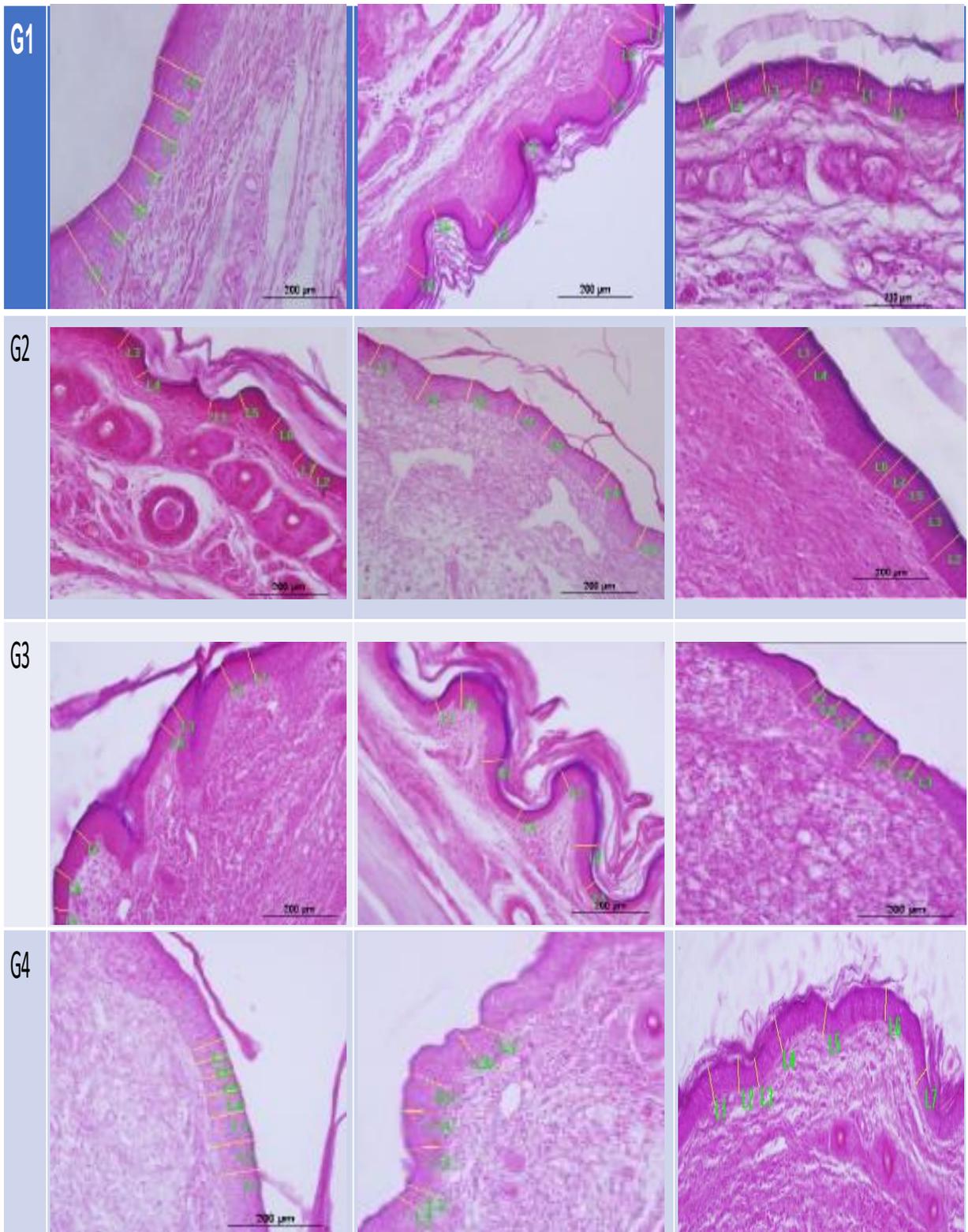
O ozônio é um poderoso agente oxidante, eficaz na inativação de bactérias, bolores, leveduras, vírus, protozoários, inclusive formas esporuladas e cistos de protozoários, que são mais resistentes (SOUZA, 2006).

Dados que corroboram com outros estudos realizados no nosso laboratório, em que o ozônio aquoso *in vitro* é um potente leishmanicida, em que concentrações a partir de 15 µg/ml, demonstraram o mesmo resultado do antimoniato de meglumina (CABRAL *et al.*, 2020). O óleo ozonizado na concentração de 5 µg/ml apresentou o mesmo efeito do antimoniato de meglumina na concentração de 300 µg/ml nas análises de tratamento *in vitro* anti-*Leishmania* (PIVOTTO, 2021).

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para analisar e caracterizar os efeitos dos tratamentos realizados, foram realizadas análises histológicas quantitativas de um fragmento da pata ao final do tratamento para evidenciar a terapêutica que resultou na melhor reconstituição da epiderme lesionada e processo inflamatório local pela técnica de coloração Hematoxilina & Eosina. Foi selecionado, aleatoriamente, o material histológico de três camundongos por grupo, sendo analisado de forma quantitativa em microscopia no aumento de 200x.

Figura 11 – Fotomicrografia das lâminas histológicas das lesões provocadas por *L. amazonensis* nas patas de camundongos, coradas por H&E no aumento de 200x. G1: tratado com antimoniato de meglumina; G2: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado



Fonte: A autora (2024).

Em relação à análise histológica, podemos observar que o G1 apresentou a um epitélio mais contínuo, dados semelhantes ao encontrado em outro trabalho desenvolvido neste laboratório (CABRAL, 2022). Sendo estatisticamente significativa perante os demais grupos.

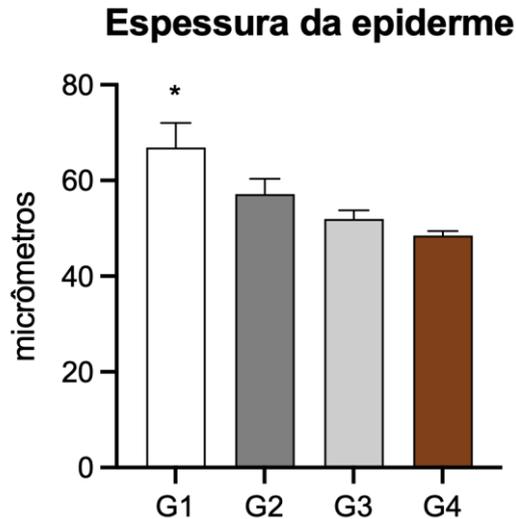
O G2 também apresentou a epiderme contínua, porém não com a mesma qualidade que o G1, dados que corroboram com outros trabalhos desenvolvidos neste laboratório (PIVOTTO, 2021). Em estudo realizado, foi observado que a maior reepitelização ocorreu nos animais que fizeram uso de óleo de girassol ozonizado, sendo este um fator positivo para a reepitelização tecidual (NAKAMURA *et al.*, 2023).

Os dados obtidos com a espessura dos animais do grupo G3 não corroboram com o estudo, que avaliou grau de necrose em animais tratados com ácido linoleico, um dos componentes do óleo de girassol, uma vez que no estudo em questão o ácido linoleico apresentou a menor área de necrose em fragmentos distas e proximais, apesar de não haver diferença estatística (SILVA, 2013). Assim, a presença do óleo na fibra agiu de maneira diferente dele isoladamente. Podemos relacionar os dados com irregularidade de epitélio, pois a necrose é um processo de morte celular que leva à destruição de tecidos.

O G4 apresentou o epitélio com maior irregularidade, dados que corroboram com estudo em que a epiderme se mostrou ulcerada e presença de necrose na derme (PALACIOS, 2022), também podemos relacionar com a Figura 3, na qual a necrose no membro era aparente.

Em relação ao infiltrado de leucócitos, podemos observar que G2 apresentou o menor índice, sendo possível assumir a influência que o ozônio exerce para suprimir a inflamação durante a promoção da cicatrização de feridas (XIAO *et al.*, 2017). G1 apresentou infiltrado discretamente maior que G2, dados que não corroboram com estudo que apresentou intenso infiltrado de aspecto misto (linfomononuclear e neutrófilos) (PALACIOS, 2022).

Figura 12 – Espessura da epiderme. G1: tratado com antimoniato de meglumina; G2: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. * Significativamente diferente de G3 e G4 ($p < 0,05$)



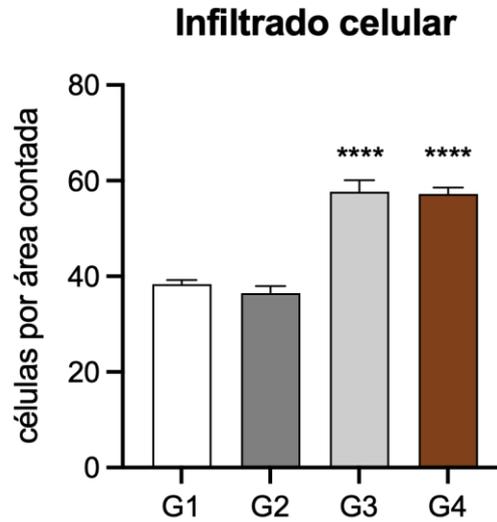
Fonte: A autora (2024).

Os maiores infiltrados foram observados no grupo 3 e 4. O grupo 4 é aquele não-tratado, assim, uma vez que as lesões causadas por *L. amazonensis* têm bordas altamente infiltradas, histologicamente, estas lesões se caracterizam por um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolados contendo abundantes parasitos (BRASIL, 2017). Este resultado corrobora com estudo que demonstrou intenso infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos (PALACIOS, 2022). Podemos relacionar estes dados com a Figura 3, na qual o processo inflamatório foi tão pronunciado que o membro ficou desfigurado e com perda de função.

Já com relação ao grupo 3, o ácido linoleico, componente do óleo de girassol, tem função no transporte de gorduras, manutenção da função e integridade das membranas celulares e como imunógeno local, largamente utilizado no cuidado de diferentes tipos de feridas, porém em estudo realizado, sua aplicação não demonstrou diferença estatística em relação ao processo inflamatório, perante os demais grupos (SILVA, 2013).

Os grupos 3 e 4 apresentaram diferença estatística significativa em relação aos demais.

Figura 13 – Infiltrado de leucócitos. G1: tratado com antimoniato de meglumina; G2: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol ozonizado, G3: tratado com antimoniato de meglumina e fibra eletrofiada incorporada ao óleo de girassol; G4: infectado e não tratado. * Significativamente diferente de G1 e G2 ($p < 0,0001$)



Fonte: A autora (2024).

CONCLUSÃO

A concentração de ozônio se manteve estável no óleo e na fibra, sendo que a fibra obteve maior concentração.

Os grupos que foram submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina perderam peso, obtiveram a menor espessura das patas ao final do tratamento, macroscopicamente apresentaram melhor aspecto e fechamento praticamente total da lesão, maior recrutamento de leucócitos e linfócitos, melhor resultado em relação à cultura da pata, e maior produção de IL-6. Em relação à histologia, apresentou maior espessura da epiderme, sendo estatisticamente significativa perante os demais grupos.

O grupo infectado e não tratado obteve a maior produção de óxido nítrico.

A maior produção de TNF- α foi do grupo tratado com antimoniato de meglumina associado à fibra eletrofiada contendo óleo de girassol ozonizado, bem como foi este grupo que apresentou menor infiltrado de leucócitos.

No estudo *in vitro*, o antimoniato de meglumina e as concentrações de óleo ozonizado 150 $\mu\text{g/ml}$ e 300 $\mu\text{g/ml}$ obtiveram a menor porcentagem de macrófagos infectados.

São necessários novos estudos para aprimorar a concentração benéfica do ozônio no óleo, pois na literatura ainda há muitas lacunas e controvérsias sobre o assunto, assim será possível a realização de estudos com resultados promissores *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L. R. **ESTUDO DE LIBERAÇÃO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS DE ECOVIO® CONTENDO CILOSTAZOL**. Toledo, Paraná.: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ, 2020.
- ANZOLIN, A. P.; BERTOL, C. D. Ozone therapy as an integrating therapeutic in osteoarthritis treatment: a systematic review. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 1, n. 2, p. 171–175, 2018.
- ARANA, B. Boletim informativo da redeLEISH-4ª edição. p. 1–12, 2019.
- ARMSTRONG, T. C.; PATTERSON, J. L. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 6, p. 1030–1032, 1994.
- BAMOROVAT, M. *et al.* Poor adherence is a major barrier to the proper treatment of cutaneous leishmaniasis: A case-control field assessment in Iran. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 21, n. November 2022, p. 21–27, 2023.
- BARBA, P. J. *et al.* CARTA CIENTÍFICO-CLÍNICA. **Tratamiento de leishmaniasis cutánea infantil con miltefosina Miltefosine to Treat Childhood Cutaneous**. v. 113, p. 827–831, 2022.
- BARBOSA, P. H. *et al.* Via de sinalização do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), síntese e liberação no exercício físico. **Archives of Health Investigation**, v. 7, n. 3, p. 91–95, 2018.
- BARROSO, D. H. *et al.* Meglumine antimoniate was associated with a higher cure rate than liposomal amphotericin B in the treatment of American tegumentary leishmaniasis: A retrospective cohort study from a *Leishmania braziliensis*-endemic area. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. September, p. 1–8, 2022.
- BERGER, R. C. *et al.* Potencial Terapêutico Do Ozônio Em Medicina Veterinária. **Anais do SEPE - Seminários de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. VIII, p. 2, 2018.
- BEZEMER, J. M. *et al.* *Leishmania* species and clinical characteristics of Pacific and Amazon cutaneous leishmaniasis in Ecuador and determinants of health-seeking delay: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 1–11, 2023.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l.: s.n.].
- BRASIL. **LEI Nº 14.648, DE 4 DE AGOSTO DE 2023**. BRASILDiário Oficial da União, Seção 1 , p.1, , 2023. Disponível em: <Diário Oficial da União, Seção 1 , p.1.
- BRITO JÚNIOR, A. A. DE *et al.* Application of ozonized oils in human body and oral cavity systems. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 70, p. 1–11, 2022.

CABRAL, I. L. *et al.* Aqueous ozone therapy improves the standard treatment of leishmaniasis lesions in animals leading to local and systemic alterations. **Parasitology Research**, v. 119, n. 12, p. 4243–4253, 2020.

CABRAL, I. L. **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓLEO OZONIZADO COMO COMPLEMENTO À TERAPIA MEDICAMENTOSA EM INFECÇÕES CUTÂNEAS CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE**. Cascavel, PR.: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ, 2022.

CARVALHO, B. M. **Produção de nanofibras a base de Ecovio® associadas ao fármaco aceclofenaco e seu estudo de liberação in vitro**. Toledo, Paraná.: Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2019.

CASTRO, M. D. M. *et al.* Cutaneous leishmaniasis treatment and therapeutic outcomes in special populations: A collaborative retrospective study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–2, 2023.

CISTERNA, B. *et al.* Low ozone concentrations differentially affect the structural and functional features of non-activated and activated fibroblasts in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, 2021.

COSTA, T. *et al.* Ozone therapy for low back pain. A systematic review. **Acta Reumatologica Portuguesa**, v. 2018, n. 3, p. 172–181, 2018.

DA SILVA, S. S. *et al.* Glucantime reduces mechanical hyperalgesia in cutaneous leishmaniasis and complete Freund's adjuvant models of chronic inflammatory pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 768–777, 2018.

DE SOUZA LIMA, L. B.; MENOLLI, R. A.; AYALA, T. S. Immunomodulation of Macrophages May Benefit Cutaneous Leishmaniasis Outcome. **Current Tropical Medicine Reports**, n. 0123456789, 2023.

FARINA, T.; ROCHA MOTA, L. O uso do óleo ozonizado de girassol no tratamento de feridas - Série de Casos. **Revista Científica de Estética e Cosmetologia**, v. 2, n. 1, p. E0542022, 2022.

FERREIRA, J. R. S. *et al.* Spatio-temporal analysis of the visceral leishmaniasis in the state of Alagoas, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1–7, 2024.

FIRDOUS, R.; YASINZAI, M.; RANJA, K. Efficacy of glucantime in the treatment of old world cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 7, p. 758–762, 2009.

FONSECA, C. C. DA *et al.* Uma avaliação preliminar da eficácia da terapia com ozônio no tratamento de Covid-19. **E-Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. e6332227, 2022.

GALINDO-SEVILLA, N. DEL C. Bases for a treatment of cutaneous leishmaniasis with moderate hyperthermia. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 158, n. 4, p. 219–224, 2022.

GONÇALVES, T. B. *et al.* Leishmanioses: Aspectos Epidemiológicos E Perspectivas De Tratamentos Alternativos. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 10, n. 1, p. 1273–1282, 2022.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUERREIRO, T. *et al.* **Perfil Hematológico De Pacientes Com Leishmaniose Tegumentar Americana No Amazonas, Brasil.** 2013.

HARTOP, P. J.; PROTTEY, C. Changes in transepidermal water loss and the composition of epidermal lecithin after applications of pure fatty acid triglycerides to the skin of essential fatty acid-deficient rats. **British Journal of Dermatology**, v. 95, n. 3, p. 255–264, 1976.

HOLBROOK, J. *et al.* Tumour necrosis factor signalling in health and disease. **F1000Research**, v. 8, p. 1–12, 2019.

IRANPOUR, S.; HOSSEINZADEH, A.; ALIPOUR, A. Efficacy of miltefosine compared with glucantime for the treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **Epidemiology and Health**, v. 41, p. 1–13, 2019.

JALILI, R.; HOSSEINI, S. A.; MORSHED, M. The effects of operating parameters on the morphology of electrospun polyacrylonitrile nanofibres. **Iranian Polymer Journal (English Edition)**, v. 14, n. 12, p. 1074–1081, 2005.

JORDANA, K.; PAULA, S. DE; IRRAZABAL, W. M. ARTIGO ORIGINAL **Determinação da concentração de ozônio em diferentes tipos de soluções aquosas para uso na prática clínica.** Determination of ozone concentration in different types of aqueous solutions for use in clinical practice. Determinación de la concen. v. 2, n. 1, p. 1–8, 2021.

JUBER, P. **FERIDAS PALATINAS PÓS-REMOÇÃO DE ENXERTIA E SEU EFEITO SOBRE A DOR PÓS-OPERATÓRIA E QUALIDADE DE VIDA.** NOVA FRIBURGO, RJ.: UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, 2022.

KHAMESIPOUR, A. *et al.* Pilot study of safety and efficacy of topical liposomal amphotericin B for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 28, n. 9, p. 658–663, 2022.

LANIA, B. G. **O USO DOS ÓLEOS DE CAFÉ E GIRASSOL EM FERIDAS CUTÂNEAS: EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS.** Campinas, São Paulo.: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2018.

LANIA, B. G. *et al.* Topical essential fatty acid oil on wounds: Local and systemic effects. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2019.

LAURENTI, M. D. **Patologia e patogenia das leishmanioses.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.

LIMA, A. E. F. DE *et al.* Ozonioterapia Como Opção Ao Tratamento De Lesões Cutâneas Em Humanos: Revisão Integrativa Da Literatura. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 26, n. 3, p. 233–242, 2022.

LIU, L. *et al.* Ozone therapy for skin diseases: Cellular and molecular mechanisms. **International Wound Journal**, n. October 2022, p. 2376–2385, 2022.

LÓPEZ PLAZA, B.; BERMEJO LÓPEZ, L. M. Nutrition and immune system disorders. **Nutricion Hospitalaria**, v. 34, p. 68–71, 2017.

LUSTOSA, A. K. M. F. *et al.* Formulações tópicas à base de manteiga das sementes LUSTOSA, A. K. M. F.; COELHO, A. G.; SANTOS, A. A. DOS; *et al.* Formulações tópicas à base de manteiga das sementes de *Platonia insignis* Mart. para o tratamento de lesões relacionadas à leishmaniose cutânea. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e52310413665, 2021.

MAGDALON, J. **Efeitos dos tratamentos com os ácidos oleico ou linoleico in vitro e in vivo sobre a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

MAHMOUDVAND, H. *et al.* Antileishmanial and cytotoxic effects of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* L. **Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 1, p. 21–27, 2015.

MARQUES, S. R.; PEIXOTO, C. A.; MESSIAS, J. B. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Control**, p. 196–209, 2004.

MARTINEZ TELLEZ, G., LEDEA LOZANO, O., & DÍAZ GÓMEZ, M. Measurement of peroxidic species in ozonized sunflower oil. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, p. 181–185, 2006.

MATOS, L. A. DOS S.; CASTRO, R. A.; GOMES, J. C. Uso da ozonioterapia como tratamento adjuvante não cirúrgico para doenças periodontais: uma revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e24101623135, 2021.

MIGUEL, S. P. *et al.* Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p. 60–71, 2018.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; DE PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1633–1638, 2008.

NAKAMURA, A. M. *et al.* Reparação do retalho axial dorsal em ratos tratados com óleo ozonizado. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, p. 37–45, 2023.

NAVA LAUSON, C. B. *et al.* Linoleic acid potentiates CD8+ T cell metabolic fitness

and antitumor immunity. **Cell Metabolism**, v. 35, n. 4, p. 633- 650.e9, 2023.

NOBRE, V.P.C.C.; GEHRING JUNIOR, W.; GAMBA, M.A.; OLIVEIRA, L.S.S.; TAMINATO, M. Uso do ozônio no tratamento de feridas: revisão de escopo. **Revista Feridas**, v. 09, n. 49, p. 1773–1778, 2021.

NORONHA, L. P. T. *et al.* Cysteinyl-leukotrienes promote cutaneous Leishmaniasis control. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, n. June, p. 1–9, 2023.

NUWANGI, H. *et al.* The stigma associated with cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL): A protocol for a systematic review. **PLoS ONE**, v. 18, n. 5 May, p. 1–9, 2023.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Síntesis de evidencia y recomendaciones: directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. 1, 2023.

PAHO, P. A. H. ORGANIZATION. **Leishmaniasis in the Americas: Treatment recommendations**. Washington, DC: [s.n.].

PALACIOS, B. F. **Avaliação do efeito terapêutico do oxisterol delta-3 na leishmaniose tegumentar americana causada pelo protozoário Leishmania (Leishmania) amazonensis**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2022.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Guideline for the Treatment of Leishmaniasis in the Americas**. Segunda ed ed. [s.l.: s.n.].

PEDRONI SILVA, I. F. *et al.* Ozonioterapia: Fatores Que Interferem Na Escolha Do Tratamento. **Revista Remecs - Revista Multidisciplinar de Estudos Científicos em Saúde**, v. 6, n. 10, p. 26–32, 2021.

PEREIRA, N. V. **Macrófagos polarizados M2 na resposta tecidual das lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar americana**. [s.l.] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2018.

PETRARU, A.; URSACHI, F.; AMARIEI, S. Nutritional characteristics assessment of sunflower seeds, oil and cake. Perspective of using sunflower oilcakes as a functional ingredient. **Plants**, v. 10, n. 11, 2021.

PIVOTTO, A. P. **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES CUTÂNEAS CAUSADAS PELA LEISHMANIOSE**. [s.l.] UNIOESTE, 2021.

REZA, M. *et al.* Antimicrobial core – shell electrospun nanofibers containing Ajwain essential oil for accelerating infected wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 603, n. February, p. 120698, 2021.

RODRIGUES, B. C. *et al.* A retrospective cohort study of the effectiveness and adverse events of intralesional pentavalent antimonials in the treatment of cutaneous

leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, n. September, p. 257–263, 2020.

SAHASRABUDHE, S. N. *et al.* Density, viscosity, and surface tension of five vegetable oils at elevated temperatures: Measurement and modeling. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 2, p. 1965–1981, 2017.

SALES-CAMPOS, H. *et al.* An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 201–210, 2013.

SANGUANINI, R. C. **EFEITOS DA ÁGUA E DO ÓLEO OZONIZADOS NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM RATOS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS ESCOLA, 2019.

SANGUANINI, R. C. *et al.* Ozonized solutions favor the repair of experimentally induced skin wounds in rats. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 914–921, 2020.

SANTOS, J. D. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA-NISTATINA PRODUZIDAS POR ELETROFIAÇÃO**. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista, 2020.

SCHAIBLICH, H. *et al.* Leishmaniose Mucosa Genital Causada Por *Leishmania Viannia Braziliensis* Em Paciente Coinfectada Com O Vírus Da Imunodeficiência Humana (Hiv): Um Relato De Caso. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101848, 2022.

SILVA, M. L. A. DA. Avaliação da aplicação tópica de ácido linoleico em retalhos cutâneos randomizados em ratos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Sugery**, v. 28, n. 4, p. 643–650, 2013.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.

SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 9, p. 505–516, 2019.

SIQUEIRA, L. M. **Ação do fármaco Glucantime® sobre macrófagos de camundongos**. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

SKALSKA, K. *et al.* Germicidal properties of ozonated sunflower oil. **Ozone: Science and Engineering**, v. 31, n. 3, p. 232–237, 2009.

SOUZA, J. B. DE. **Avaliação De Métodos Para Desinfecção De Água, Empregando Cloro, Ácido Peracético, Ozônio E O Processo De Desinfecção Combinado**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2006.

SOUZA, L. G. **Evolução Do Estado Nutricional E Sua**. p. 1–40, 2014.

THERAPY, O. *et al.* **OZONIOTERAPIA NO TRATAMENTO DE FERIDAS NA. OZONE THERAPY IN THE TREATMENT OF WOUNDS IN VETERINARY MEDICINE.** v. 3, p. 29–35, 2021.

TORRES, S. B. *et al.* Óleo de girassol (*Helianthus annus L.*) Como cicatrizante de feridas em idosos diabéticos / Sunflower oil (*Helianthus annus L.*) As a wound healer in diabetic elderly people. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 4692–4703, 2021.

TRIPATHI, C. D. P. *et al.* *Withania somnifera* chemotype NMITLI 101R significantly increases the efficacy of antileishmanial drugs by generating strong IFN- γ and IL-12 mediated immune responses in *Leishmania donovani* infected hamsters. **Phytomedicine**, v. 24, p. 87–95, 2017.

TSAI, P. H. *et al.* Molecular diagnosis and therapy for cutaneous leishmaniasis of a returned traveler from Mexico. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 6, p. 1154–1158, 2021.

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

VALACCHI, G.; FORTINO, V.; BOCCI, V. The dual action of ozone on the skin. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 6, p. 1096–1100, 2005.

VASCONCELOS, C. O. DE. **Estudo da migração celular induzida por *Leishmania braziliensis* na composição da reação inflamatória mimetizada em modelo de bolsa de ar subcutânea em hamster e a a sua relação com a evolução e gravidade da infecção.** Fortaleza - Recife.: INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2017.

VAUGHN, A. R. *et al.* Natural Oils for Skin-Barrier Repair: Ancient Compounds Now Backed by Modern Science. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 103–117, 2018.

WEN, Q.; CHEN, Q. An Overview of Ozone Therapy for Treating Foot Ulcers in Patients With Diabetes. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 360, n. 2, p. 112–119, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. REGIONAL OFFICE FOR SOUTH-EAST ASIA. **Regional strategic framework for accelerating and sustaining elimination of kala-azar in the South-East Asia Region, 2022.** [s.l.: s.n.].

XIAO, W. *et al.* Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 6, p. 1–11, 2017.

XUE, J. *et al.* HHS Public Access. v. 50, n. 8, p. 1976–1987, 2019.

ZANATTA, J. M. **Poliaminas regulam a expressão de genes do seu metabolismo**

e resistência à infecção em macrófagos com *Leishmania amazonensis*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2022.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International Immunopharmacology**, v. 56, n. 138, p. 235–241, 2018.

ZOUMPOULAKIS, P. *et al.* Evaluating modern techniques for the extraction and characterisation of sunflower (*Helianthus annuus L.*) seeds phenolics. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, 2017.

7. ANEXOS:

7.1 AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA



Autorização

O Protocolo nº 11-22 intitulado; "Avaliação do uso de fibra obtida por eletrofiliação contendo óleo ozonizado na cicatrização de lesões causadas por *Leishmania amazonensis* em modelo animal", sob a responsabilidade de **Rafael Andrade Menolli** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 22/07/2022. Essa Autorização não substitui o Certificado Experimental de realização ética da pesquisa, necessitando do encaminhamento do Relatório Final de execução do Projeto para sua emissão.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2022 - 31/12/2023
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico/ BALB/c
N. de animais	48
Peso/Idade	25 gramas/ 60 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Cascavel, 28/07/2022.

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3126/2018-GRE

7.2 MONTAGEM (INCLUSÃO) DE MATERIAL EM PARAFINA (PARAPLAST®)

- Fixação:

Colocar as peças (material) em formol 10% tamponado (tampão fosfato).

Fixar por 24 horas e lavar em água corrente por 48 horas.

Estocar em álcool 70% até o início da inclusão.

Desidratação:

Material estocado em álcool 70%.

30 minutos em álcool 80% —> 2 vezes.

30 minutos em álcool 95% —> 2 vezes.

30 minutos em álcool 100% —> 2 vezes.

Diafanização:

Xilol + álcool 100% (1:1) —> 30 minutos.

Xilol 100% (1 e 2) —> 20 minutos.

Xilol PA —> 20 minutos.

Infiltração:

Paraplast® + Xilol —> 2 horas a partir do momento em que o Paraplast® derreter.

*Obs: cuidar o momento em que o Paraplast® derreter.

Paraplast® puro II —> overnight stay (pernoite) +/- 14 horas.

Paraplast® puro III —> 3 horas.

Inclusão:

Montar as caixinhas de papel no tamanho do material a ser incluso.

Pegar Paraplast® puro, encher a caixinha e orientar a peça.

Deixar endurecer a temperatura ambiente.

7.3 COLORAÇÃO HEMATOXILINA & EOSINA

Desparafinar, hidratar.

Hematoxilina 10 minutos —> lavar 5 minutos em água destilada.

Álcool Absoluto por 30 segundos.

Eosina 5 minutos —> lavar para retirar o excesso.

Desidratar, diafanizar e montar.