UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

HENRIQUE CUNHA CARVALHO

TRANSFERÊNCIA DE MASSA OZÔNIO-SANGUE E SUA INFLUÊNCIA EM PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS

TESE DE DOUTORADO

DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

São José dos Campos, março/2018

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

HENRIQUE CUNHA CARVALHO

TRANSFERÊNCIA DE MASSA OZÔNIO-SANGUE E SUA INFLUÊNCIA EM PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

São José dos Campos, março/2018

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

HENRIQUE CUNHA CARVALHO

TRANSFERÊNCIA DE MASSA OZÔNIO-SANGUE E SUA INFLUÊNCIA EM PARÂMETROS HEMATIMÉTRICOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Doutorado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Orientador - Doutorado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Raduan Hage

Universidade Paulista

Prof. Dr. Rodrigo Altenfelder Silva

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Landulfo Silveira Júnior

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Carlos José de Lima

Universidade Anhembi Morumbi

Profa. Dra. Milene da Silva Melo

Universidade de Mogi das Cruzes

São José dos Campos, março/2018

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

HENRIQUE CUNHA CARVALHO

Atuou em hospitais de São Paulo nas áreas de gestão e manutenção de equipamentos eletro-médicos. Durante seu mestrado desenvolveu projeto relacionado ozonização de fluídos biológicos, desenvolvendo técnicas, processos e equipamentos de ozonização. Tem experiência na área de pesquisa & desenvolvimento com ênfase em Instrumentação, Ozônio e Óptica, envolvendo espectroscopia de fluorescência e Raman.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C331t Cunha Carvalho, Henrique
Transferência de massa ozônio-sangue e sua influência em parâmetros hematimétricos / Henrique Cunha Carvalho. - 2018.
80f. : il.; 30cm.

Orientador: Renato Amaro Zângaro.
Tese (Doutorado em Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade Anhembi Morumbi, São José Dos Campos, 2018.
Bibliografia: f.69-80

1. Engenharia. 2. Ozônio. 3. Ozonioterapia. 4. Sangue. 5. Transferência de Massa.
CDD 610.28

AGRADECIMENTOS

Deixo os meus agradecimentos a todos os professores, em especial ao Dr. Carlos Lima e as Dras. Lívia Moreira e Adriana Fernandes. Agradeço também aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da UAM pelo apoio em minha formação durante essa etapa profissional.

É com muito apreço e respeito que agradeço ao Dr. Renato Amaro Zângaro pela orientação dedicada e por todo o suporte oferecido para a realização desta tese.

A UAM (Universidade Anhembi Morumbi) e a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) pela concessão das bolsas de estudo e pesquisa, indispensáveis para a realização do meu trabalho.

A molécula de ozônio tal qual a vida tem ação e duração determinada pelas condições de contorno da mesma.

RESUMO

A utilização do gás ozônio em organismos vivos vem crescendo atualmente através de inúmeras aplicações biológicas, sendo experimentadas e relatadas cientificamente em todo o mundo sob a denominação de ozonioterapia. Uma das modalidades é a ozonização do sangue, visando induzir através deste uma ativação oxidativa imunomodulatória sistêmica no organismo alvo como também combater os micro-organismos que possam estar presentes no fluido, no entanto, sem comprometer a integridade dos hemocomponentes. O presente trabalho foi estruturado através do desenvolvimento de três protocolos para a ozonização do sangue e um modelo matemático que compreende a transferência de massa do ozônio para o sangue. Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que a transferência de massa ozônio-sangue apresenta maior eficácia quando realizada em um frasco de vidro sob regime de pressão com o uso de dispositivo venturi e uma bomba centrífuga, onde as concentrações das séries eritrocitária, leucocitária e plaquetária se mantém relativamente estáveis durante a ozonização com fluxo de 0,125 L/min para as duas diferentes concentrações de ozônio utilizadas neste trabalho (33 e 62 mg/L). Os diferentes materiais utilizados nos protocolos sugerem que estes se mantiveram quimicamente inertes à ação do ozônio durante o processo de transferência de massa ozônio-sangue. O modelo matemático se mostrou adequado, permitindo o cálculo de importantes variáveis envolvidas no processo tais como o ozônio residual levando-se em conta as taxas de decomposição e reatividade do ozônio.

Palavras-chave: Engenharia. Ozônio. Ozonioterapia. Sangue. Transferência de Massa.

ABSTRACT

The use of ozone in living organisms is currently growing through numerous biological applications, being experimented and reported scientifically worldwide under the name of ozone therapy. One of the modalities of ozone therapy is blood ozonation, aiming to induce a systemic immunomodulatory oxidative activation in the target organism as well as to combat the microorganisms that may be present in the fluid, however, without compromising the integrity of the blood components. The present work was structured through the development of three protocols for blood ozonation and a mathematical model comprising the transfer of mass from ozone to blood. Based on the results obtained it can be stated that the transfer of ozone-blood mass is more effective when performed in a glass bottle under a pressure regime with the use of a venturi device and a centrifugal pump, where the concentrations of erythrocyte, leukocyte series and platelet counts remained relatively stable during ozonation with a flow rate of 0.125 L / min for the two different concentrations of ozone used in this study (33 and 62 mg/L). The different materials used in the protocols suggest that they remained compatibles to ozone action during the ozone-blood mass transfer process. The mathematical model was adequate, allowing the calculation of important variables involved in the process, such as residual ozone, taking into account ozone decomposition and reaction rates.

Key-words: Engineering. Ozone. Ozone Therapy. Blood. Mass Transfer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Objetivo geral 3

1.1.1. Objetivos específicos 3

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1. Ozônio - Histórico 4

2.2. Características do ozônio 5

2.3. Geração do gás ozônio 5

2.4. Ozônio na área da saúde 7

2.5. Mecanismos e eventos de ação do ozônio 10

2.5.1. Ação do ozônio nos tecidos e fluidos biológicos 12

2.6. Ação do ozônio no sangue 14

2.7. Difusores 20

2.8. Venturi 20

2.9. Modelo matemático – ozônio-sangue 22

3. MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1. Eficácia na transferência de massa 24

3.2. Protocolos para a ozonização do sangue 26

3.2.1. Bolsa insuflada com ozônio 26

3.2.1.1. Bolsa insuflada com ozônio-venturi 29

3.2.2. Ozonização em coluna de vidro 30

3.2.3. Frasco sob pressão ozônio-venturi 32

3.3. Modelo matemático – ozônio-sangue 35

4. RESULTADOS 39

4.1. Eficácia na transferência de massa 39

4.2. Protocolos para a ozonização do sangue 40
4.2.1. Bolsa insuflada com ozônio 41
4.2.1.1. Bolsa insuflada com ozônio-venturi 43
4.2.2. Frasco sob pressão de ozônio-venturi 45
4.3. Modelo Matemático – ozônio-sangue 48
5. DISCUSSÃO 50
5.1. Eficácia na transferência de massa 50
5.2. Protocolos para a ozonização do sangue 51
5.2.1. Compatibilidade dos materiais ao ozônio 52
5.2.2. Transferência de massa ozônio-sangue 53
5.2.3. Bombeamento do sangue e possíveis alterações reo-hematológicas 55
5.2.4. Efeito do ozônio na concentração dos hemocomponentes 57
5.3. Modelo matemático – ozônio-sangue 63
5.3.1. Concentração de ozônio na fase líquida 64
5.3.2. Validação experimental do modelo matemático 65
6. CONCLUSÃO 67
6.1. Eficácia na transferência de massa 67
6.2. Protocolos para a ozonização do sangue 67
6.3. Modelo matemático – ozônio-sangue 67
ANEXO 68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de geração do ozônio por efeito corona. 6

Figura 2. Esquema de funcionamento do dispositivo venturi. 21

Figura 3. Processo de transferência de massa utilizando o venturi. 24

Figura 4. Processo de transferência de massa utilizando um difusor de bolhas. 26

Figura 5. Insuflação da bolsa de sangue. 28

Figura 6. Bolsa de sangue insuflada com o ozônio. 28

Figura 7. Ozonização da bolsa de sangue com o venturi. 29

Figura 8. Ozonização do sangue em coluna de vidro. 31

Figura 9. Formação de bolhas durante ozonização do sangue em tubo de vidro (vista horizontal). 32

Figura 10. Ozonização do sangue em frasco de vidro sob regime de pressão. 32

Figura 11. Ozonização do sangue em frasco de vidro através do venturi sob regime de pressão. 33

Figura 12. Concentração de ozônio na água (mg/L) ao longo do tempo (min.) utilizando o dispositivo venturi e o difusor de bolhas. 40

Figura 13. Hemograma do sangue ozonizado por insuflação direta da bolsa nas concentrações de 33 e 62 mg/L. 42

Figura 14. Hemograma do sangue ozonizado em bolsa de coleta utilizando venturi nas concentrações de 33 e 62 mg/L. 44

Figura 15. Hemograma do sangue ozonizado em frasco de vidro sob pressão utilizando venturi nas concentrações de 33 e 62 mg/L. 46

Figura 16. Imagem de microscopia óptica digital, com aumento de 200x, da lâmina hematológica na situação controle, circulação e ozonização (3 e 12 min.). 47

Figura 17. Relação entre a taxa de decomposição do ozônio (k_1) e a concentração de ozônio no sangue (C_L) mediante uma concentração de ozônio fornecida (g_{in}). 49

Figura 18. Relação entre a taxa de reação do ozônio (k_2) e a concentração de ozônio no sangue (C_L) mediante uma concentração de ozônio fornecida (g_{in}). 49

Figura 19. Área do sangue exposta as bolhas de ozônio no frasco de vidro e na bolsa de coleta. 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de estudos sobre o ozônio no sangue. 17

Tabela 2. Parâmetros dos valores no hemograma tendo como referência a espécie equina (tração). 34

Tabela 3. Parâmetros utilizados no modelo matemático. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPDA – Ácido cítrico, citrado de sódio, fosfato de sódio, dextrose e adenina

D – Coeficiente de difusão

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EPTFE – Politetrafluoretileno expandido

ERO – Espécie reativa de oxigênio

GSH – Glutationa

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

LIR – Limite inferior de referência

LSR – Limite superior de referência

NO_2 – Dióxido de nitrogênio

O – Átomo de oxigênio

$O_2^{\bullet-}$ – Ânion superóxido

O_2 – Oxigênio molecular

O_3 – Ozônio

OH^- – Radical hidroxila

$ONOO^-$ – Peroxinitrito

POL – Peroxidação lipídica

PVC – Policloreto de vinila

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

UV – Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}$	Graus
$^{\circ}C$	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
Å	Angström
cal	Caloria
cm	Centímetro
E°	Potencial de oxidação
G	Gauge
g/mol	Grama por mol
Kg	Kilograma
L	Litro
L/min	Litro por minuto
m	Metro
m/s	Metro por segundo
m^3	Metro cúbico
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
Pa.s	Pascal segundo
V	Volt

1. INTRODUÇÃO

A utilização do gás ozônio em organismos vivos vem crescendo atualmente através de inúmeras aplicações biológicas, sendo experimentadas e relatadas cientificamente em todo o mundo sob a denominação de ozonioterapia.

Uma das modalidades é a ozonização do sangue, visando induzir através deste uma ativação oxidativa imunomodulatória sistêmica no organismo alvo como também combater os micro-organismos que possam estar presentes no fluido, no entanto, a ozonização deve ser realizada dentro de parâmetros adequados com vistas a não comprometer a integridade dos hemocomponentes.

O presente trabalho foi estruturado através do desenvolvimento de três protocolos para a ozonização do sangue e na adaptação de um modelo matemático que compreende a transferência de massa do ozônio para o sangue.

Hipótese

O ozônio sendo uma molécula altamente reativa pode produzir alterações significativas em sistemas biológicos. Esses efeitos de maneira controlada podem representar benefícios para o sistema em questão, de maneira descontrolada produzem efeitos deletérios ao sistema.

Seria possível manter a estabilidade dos parâmetros hematimétricos do sangue, a partir do controle da dose e do tempo de reatividade do ozônio visando obter uma eficiente transferência de massa ozônio-sangue?

Tese

Os estudos conduzidos para o processo da transferência de massa ozônio-sangue levaram em conta inúmeras variáveis apresentadas ao longo deste trabalho. Visando a manutenção do sangue foi realizado o monitoramento dos parâmetros hematimétricos avaliando-se estes em função da dose de ozônio aplicada concomitante com a análise do tempo de reatividade.

1.1. Objetivo geral

- ✓ Desenvolver e analisar técnicas relacionadas à transferência de massa ozônio-sangue.

1.1.1. Objetivos específicos

- ✓ Comparar a eficácia da transferência de massa ozônio-água realizada por um dispositivo venturi e por um difusor de bolhas, visando futura aplicação no sangue.
- ✓ Desenvolver protocolos para a ozonização do sangue.
- ✓ Adaptação de um modelo matemático para a análise da transferência de massa ozônio-sangue.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ozônio - Histórico

Em 1785 o filósofo e físico holandês Martin van Marum (1750-1837) submeteu o oxigênio as descargas elétricas geradas por uma máquina eletrostática, e como efeito notou uma característica que descreveu como "odor de matéria elétrica" (Crosland, 1970). Em 1801 o químico escocês William Cruickshank (...-1810) relatou também um odor característico após conduzir experimentos em soluções aquosas para a produção de oxigênio por eletrólise (Cruickshank, 1801).

Apesar dos dois relatos e observações históricas, esse efeito gerado não foi propriamente investigado pelos autores, sendo que posteriormente, em 1840, esse gás gerado no processo foi formalmente descoberto nas montanhas austríacas pelo químico germânico-suíço Christian Friedrich Schönbein (1799-1868) (Schönbein, 1840), que repetindo os experimentos de van Marum e Cruickshank, nomeou de Ozônio (do grego ὄζειν "*ozein*" – cheiro) esse gás com odor característico (pungente), além de descrever algumas das suas propriedades. A extensa gama de descobertas relacionadas ao ozônio que foram realizadas por Schönbein podem também serem encontradas no artigo de revisão desenvolvido por Rubin (2001), onde são abordados os primeiros ensaios sobre as reações orgânicas e inorgânicas do ozônio e alguns dos seus diversos efeitos fisiológicos.

Somente em 1856 o físico-químico irlandês Thomas Andrews (1813-1885) apresentou a identificação química estrutural do gás, mostrando que o ozônio era formado apenas por átomos de oxigênio (Andrews, 1856). Finalmente em 1863, foi estabelecida pelo químico suíço Jacques-Louis Soret (1827-1890) a relação entre o ozônio e o oxigênio, através da demonstração da densidade do gás e, que três volumes de oxigênio produziam dois volumes de ozônio (Soret, 1863).

2.2. Características do ozônio

O ozônio (O_3) é um dos gases encontrados na estratosfera terrestre. Nessa região o ozônio atua como uma camada protetora, semelhante a uma película, e assim, absorve parte da radiação ultravioleta (UV) emitida pelo Sol nos comprimentos de onda entre 100–280 nm (Mecanismo de Chapman) (Chapman, 1930), e desta maneira oferece proteção aos organismos no planeta (Bocci, 2011).

Na estratosfera o ozônio é naturalmente produzido pela ação dos raios UV sobre o oxigênio ambiente, sendo que uma série de fatores, como temperatura e pressão, fazem o O_3 se decompor rapidamente via reação exotérmica (baseado no curto tempo de meia-vida; 40 minutos a 20–25 $^{\circ}$C), em moléculas de oxigênio (O_2) e em subprodutos com um grande potencial oxidativo (Bocci, 2011).

O ozônio apresenta massa molecular de 48 g/mol em comparação a molécula diatômica de oxigênio, com massa molecular de 32 g/mol. A estrutura do ozônio apresenta forma cíclica com distância entre os átomos de 1,26 Å, um ângulo de 116,8 $^{\circ}$ entre os seus átomos e vários efeitos mesoméricos em equilíbrio dinâmico. Ainda em relação ao oxigênio, o ozônio possui maior poder oxidativo (E° = + 2,076 V), ações mais seletivas em diversos compostos orgânicos, e ainda a característica de ser 1,6 vezes mais denso e 10 vezes mais solúvel em soluções aquosas (Bocci, 2011).

2.3. Geração do gás ozônio

A geração do gás ozônio é comumente realizada através da transformação do oxigênio via um processo endotérmico baseado em gradiente de alta tensão elétrica:

$$3O_2 \leftrightarrow 2O_3 - 68400 \text{ cal.}$$

Neste processo ocorre a fotodissociação do oxigênio molecular (O_2) em átomos de oxigênio ($O_2 \rightarrow 2O$) que ao reagirem com outras moléculas de oxigênio presentes, formam por reação o ozônio ($O_2 + O \rightarrow O_3$).

O ozônio é termodinamicamente instável, não podendo ser estocado, sendo necessário ainda o seu uso imediato quando não veiculado a algum meio. Espontaneamente a sua geração reverte-se ao longo do tempo em oxigênio e em espécies radicalares através do seu processo de decomposição natural (Bocci, 2011).

O primeiro gerador comercial de ozônio foi desenvolvido na Alemanha em 1857 por Werner von Siemens (Siemens, 1857). Atualmente existe uma grande variedade de geradores de ozônio, a maioria destes, inclusive os de aplicação na área da saúde, produzem o ozônio através do efeito corona.

A descarga corona ocorre quando uma alta tensão é aplicada a um "gap" de ar, permitindo a ionização deste. Na presença desta corrente alternada (CA), os elétrons acelerados no interior do "gap", apresentam energia suficiente para quebrar a dupla ligação covalente do oxigênio em átomos. Este ambiente com excesso de átomos de oxigênio propicia a combinação dos átomos para a formação de moléculas triatômicas, ou seja, o ozônio (O_3), este fenômeno é apresentado na Figura 1.

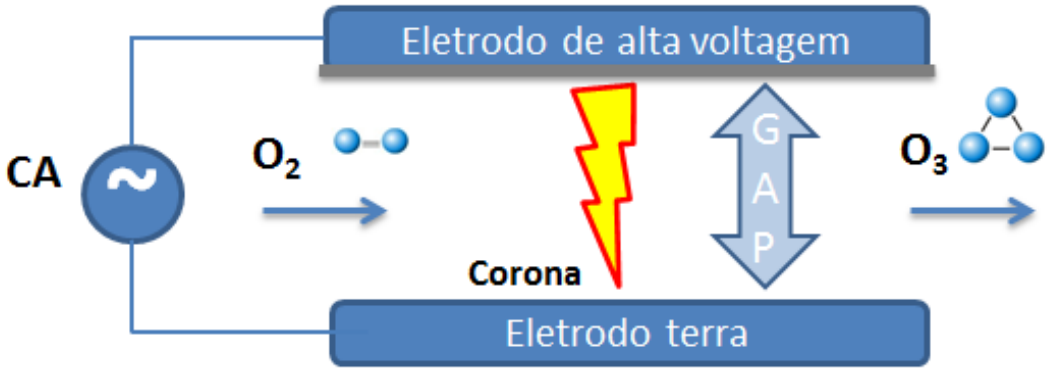

Figura 1. Esquema de geração do ozônio por efeito corona.
Fonte: arquivo pessoal.

A geração do ozônio quando obtida através da descarga corona é determinada por três parâmetros principais: a tensão elétrica, o espaçamento entre os eletrodos e o fluxo de oxigênio (Bocci, 2011), sendo este método largamente empregado atualmente na produção comercial de ozônio. Outros métodos para geração do ozônio são baseados no uso da radiação UV, na eletrólise e em processos radio-químicos, sendo ainda que

essas técnicas são pouco eficientes para a produção deste gás, apresentando principalmente desvantagens no processo de controle da produção gasosa (Loeb, 2011).

O oxigênio puro é o mais adequado para a produção do ozônio voltado fins terapêuticos, uma vez que a utilização do ar atmosférico gera subprodutos, como o dióxido de nitrogênio (NO_2) – altamente reativo com o tubo de descarga corona e com os sistemas biológicos.

Os componentes do sistema de geração de ozônio devem ainda ser produzidos com materiais de alta qualidade e resistentes a oxidação, tais como o aço inoxidável, titânio, pyrex®, teflon®, EPTFE entre outros materiais, de modo a garantir sua compatibilidade, onde nenhum material ou subproduto indesejado venha a ser gerado em função da corrosão oriunda da oxidação gerada na produção do gás (Bocci, 2011).

Somente nos últimos quinze anos, através do desenvolvimento dos geradores de ozônio integrados com fotômetros foi possível garantir aos estudos mais confiabilidade nas dosimetrias empregadas. Basicamente estes fotômetros utilizam a radiação na faixa do UV para determinar a quantidade residual do ozônio gerado (concentração do ozônio em um volume de gás específico), através do pico de absorção deste em 254 nm (Batakliev *et al.*, 2014). A diferença entre as duas leituras (sem e com gás) do fotômetro esta diretamente relacionada à concentração do ozônio (Langlais, Reckhow e Brink, 1991), oferecendo uma leitura da concentração em tempo real e de maneira altamente precisa.

2.4. Ozônio na área da saúde

A utilização do ozônio em organismos vivos vem crescendo atualmente através de inúmeras aplicações biológicas, sendo experimentadas e relatadas cientificamente em todo o mundo sob a denominação de ozonioterapia.

Em odontologia o ozônio apresenta efeitos terapêuticos em diversas doenças periodontais, e ainda na manutenção da saúde gengival (Dukić *et al.*, 2013; Indurkar e

Verma, 2016), clareamento dental (Tessier *et al.*, 2010; Al-Omiri *et al.*, 2016a), pós operatório (Kazancioglu, Kurklu e Ezirganli, 2014) entre outros.

Na medicina veterinária o ozônio vem apresentando resultados, e está recentemente sendo empregado na terapia de endometrite bovina (Constantin e Bîrţoiu, 2016), analgesia pós operatória em cadelas (Teixeira *et al.*, 2013), aumento da capacidade antioxidante em equinos (Tsuzuki *et al.*, 2015), tratamento de problemas obstetrícios e dermatológicos em ovinos (Đuričić *et al.*, 2016; Szponder *et al.*, 2017) entre outras modalidades veterinárias.

Em medicina humana o ozônio vem recentemente sendo utilizado para o tratamento de úlceras palmares e plantares (Zhang *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2015), estomatites (Al-Omiri *et al.*, 2016b), hiperplasia neointimal (Barone *et al.*, 2016), esclerose múltipla (Molinari *et al.*, 2017), esclerodermia (Nowicka, 2017), artrites (Mondéjar Barrios e Rosas Durant, 2016; Lopes de Jesus *et al.*, 2017), reparações teciduais diversas (Buliés, 1996; Guven *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Valacchi *et al.*, 2013; Santana-Rodríguez *et al.*, 2017; Siniscalco *et al.*, 2018), pés diabéticos (van der Zee e de Monte, 2001; Wainstein *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2014), hepatite (Jiao e Peng, 2008; Zaky *et al.*, 2011), câncer (Clavo *et al*. 2004; Schulz *et al.*, 2008; Kuroda *et al.*, 2015; Teke *et al.*, 2017), doenças coronarianas (Martínez-Sánchez *et al.*, 2012), arteriosclerose (Delgado-Roche, Martínez-Sánchez e Re, 2013), como agente para o combate dos micro-organismos causadores das infecções hospitalares (Zoutman, Shannon e Mandel, 2011; Doan *et al.*, 2012; Marson *et al.*, 2016) e agindo como um potencializador do sistema imune (efeito imunomodulador), através da ativação dos agentes biológicos endógenos nos organismos, propiciando o combate a diversas espécies de fungos (Elshimy e Gohar, 2015; Ouf *et al.*, 2016), bactérias (Fontes *et al.*, 2012; Gulmen *et al.*, 2013; Gonenci, Tabur e Ozsoy; 2017), príons (Ding *et al.*, 2013), vírus (Murray *et al.*, 2008; Petry *et al.*, 2014), entre outros micro-organismos.

Novas perspectivas terapêuticas também vêm recentemente sendo projetadas como a utilização do ozônio para a desintoxicação por monóxido de carbono (Martín e García, 2016), na regulação da homeostase redox com vistas a reduzir a diabetes tipo 2 entre outras doenças oxidativas crônicas (Bocci *et al.*, 2014; Bocci e Valacchi, 2015), e ainda nas doenças degenerativas e nas algias vertebrais (Braidy *et al.*, 2018).

O ozônio pode ser administrado com grande flexibilidade por meio de diversas vias de administração, como por exemplo, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa (auto-hemoterapia maior e menor, não o gás diretamente), intrapleural, intradiscal, insuflação retal e vaginal, tópico, miofascial (Zângaro, Fernandes e Lima, 2014) entre vários outros meios. Portanto, para qualquer aplicação torna-se importante a seleção da via de administração mais adequada para as diferentes finalidades, de acordo com as concentrações terapêuticas e levando-se em conta o estágio e a condição do paciente-organismo receptor.

Até o final do século passado, haviam muitas divergências em relação às concentrações terapêuticas do ozônio. Com o desenvolvimento da área, estabeleceu-se um fator importante para as práticas de ozonioterapia, a necessidade de orientar as suas aplicações pela chamada "janela terapêutica". Este é um conjunto de bases experimentalmente estabelecidas principalmente nas duas recentes décadas, por diversos órgãos, grupos e pesquisas científicas que estabeleceram uma determinada faixa de concentração do ozônio (expressas normalmente em μg/mL ou mg/L) na qual o gás pode exercer efeitos terapêuticos sem toxicidade (aguda ou crônica) no que diz respeito, por exemplo, a auto-hemoterapia (esse termo será abordado no subcapítulo 2.6 Ação do ozônio no sangue). A janela terapêutica da ozonioterapia vem sido estabelecida entre 10–80 μg/mL (Bocci, 2006b; Madrigal, 2007; Martínez-Sánchez e Pérez-Davison, 2010; Sagai e Bocci, 2011).

O principal tratado atualmente a respeito da ozonioterapia é a Declaração de Madrid (ISCO3, 2015), sendo signatárias desta declaração diversas associações e federações internacionais de ozonioterapia. No Brasil, a ABOZ (Associação Brasileira de Ozonioterapia) é signatária desde 2011.

O uso de gás para fins terapêuticos muitas vezes se dá sem o pleno conhecimento do comportamento cinético e da característica de difusão nos sistemas biológicos, levando a resultados insatisfatórios quando de sua aplicação clínica. A aplicação de técnicas terapêuticas utilizando ozônio tem sua eficácia determinada principalmente pela difusão do gás no interior dos tecidos e ou fluidos, o que determina sua ação em toda a região alvo. Para isso é necessário um maior conhecimento das

propriedades e da interação do ozônio em função da difusão deste gás no interior dos tecidos e ou fluidos.

2.5. Mecanismos e eventos de ação do ozônio

O ozônio intervém no equilíbrio da oxirredução, sendo um poderoso oxidante que pode reagir quimicamente quando em contato com os diversos fluidos biológicos. Essa intervenção característica induz alterações diretas no balanço das moléculas das espécies reativas de oxigênio (ERO), que influenciam diversos eventos bioquímicos do metabolismo celular, proporcionando alguns efeitos antimicrobianos além de benefícios na reparação e no equilíbrio do organismo alvo (Travagli, Zanardi e Bocci, 2006; Bocci, Zanardi e Travagli, 2011a).

Além das EROs, em um estágio posterior, ocorre também a peroxidação lipídica (POL) um evento fundamental para os efeitos do ozônio nos sistemas biológicos, exemplos das POLs são os lipoperóxidos, lipohidroperóxidos, radicais alcoxilas e 4-hidroxinonenal. Bocci (2006b) em seu artigo de revisão sobre o estado da arte da ozonioterapia atribuiu que as POLs exercem um grande efeito imunomodulatório, sendo destacado por um sentimento de bem-estar relatado por pacientes durante as terapias com ozônio. Este efeito de bem-estar declarado pela maioria dos pacientes, segundo Bocci (2012), se dá provavelmente pelas bandas dos alcenais que se ligam a glutationa (GSH), estimulando os neurônios no hipotálamo, com consequente liberação dos hormônios adrenocorticotrópico, corticotropina e cortisol.

O estresse oxidativo é uma condição biológica baseada em um processo de dano causado por excessivos níveis das EROs. As EROs são altamente reativas, sendo moléculas instáveis geradas durante uma variedade de reações bioquímicas e em diversas funções celulares. Nakao *et al*. (2009) atribuíram como função das EROs, sinalizar moléculas, modelar criticamente a ativação do sistema imune, e assim, participar na defesa contra microrganismos. Entretanto, quando a produção das EROs é desproporcional em relação aos antioxidantes, seu excesso pode causar efeitos tóxicos danificando diversos componentes celulares, incluindo os lipídios, as proteínas, o DNA

e até mesmo induzir morte celular. Os antioxidantes previnem a formação ou liberação das EROs produzidas sobre diversas condições de estresse, sendo que a maioria desses compostos antioxidantes doam elétrons e reagem com as EROs, formando assim produtos finais inócuos, como a água.

Basicamente o ozônio reage em água através de dois mecanismos. O primeiro compreende as reações diretas envolvendo o oxigênio-ozônio molecular, o segundo, e principal, envolve reações indiretas dos seus subprodutos oxidantes formados na decomposição do ozônio com o meio. A fonte primária de dano oxidativo através do ozônio envolve o a formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais indiscutivelmente desenvolvem um importante papel no processo oxidativo. Essas espécies também produzem em sua decomposição alguns radicais hidroxilas altamente reativos (OH^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$), através das reações nos processos de Haber–Weiss ou da reação de Fenton (Nakao *et al.*, 2009).

Sob a forma de aplicação sistêmica, o ozônio também apresenta ação imunomoduladora, já que de acordo com sua dose, propicia o aumento da produção de antioxidantes endógenos na célula e a liberação de algumas substâncias que atuam como mensageiros no sistema imune, portanto estimulando e tendo influência direta no controle do estresse oxidativo (Bocci, 2006b; Díaz, Abraham e Cepero, 2012; Bocci *et al.*, 2014).A pré-condição oxidativa promovida pelo ozônio em baixas doses é capaz de aumentar e preservar os sistemas endógenos antioxidantes, de modo a regularizar a concentração endógena de óxido nítrico e manter um adequado balanço redox (Re *et al*., 2008), sendo, portanto um duplo-agente sob certas condições.

Uma grande variedade de trabalhos conduzidos com ozônio atribui que os efeitos farmacológicos deste seguem o princípio de “hormese”, quando em baixas concentrações (ou doses) apresentam alta eficácia, a qual diminui com o aumento da concentração, gerando assim, toxicidade (Bocci, Zanardi e Travagli, 2011b; Viebahn-Hänsler, León Fernández e Fahmy, 2012).

A pouco mais de quinze anos, muitos ozonioterapeutas concebiam em suas práticas que as baixas doses de ozônio eram estimulantes, enquanto as altas doses eram inibitórias. Ao longo dos anos e do desenvolvimento cientifico essa condição foi

aprimorada, e segundo alguns autores (Bocci, Zanardi e Travagli, 2011b), evidências sustentam que o ozônio atuaria de maneira complexa, onde em altas doses ainda é eficaz, mas acompanhado de alguns efeitos colaterais.

Essas condições levantam novamente a necessidade de desenvolver técnicas adequadas para monitorar a concentração deste gás, os seus efeitos através da difusão e da transferência de massa, e a eficiência dos diversos processos terapêuticos que utilizam o ozônio.

2.5.1. Ação do ozônio nos tecidos e fluidos biológicos

Em um trabalho de revisão realizado por Langø, Mørland e Brubakk (1996) sobre os coeficientes de difusão e solubilidade, foi concluído que para os tecidos biológicos existe uma grande escassez de informações a respeito dos coeficientes de difusão e solubilidade dos gases, e em geral existem divergências significativas entre os valores determinados pelos estudos, principalmente no que tange ao coeficiente de difusão (D). Estes mesmos autores ainda concluem que a maioria dos métodos de determinação da difusão gasosa nos tecidos eram inadequados para a maioria dos gases, e muitas vezes, apresentavam apenas uma dimensão qualitativa. Os autores também concluíram que, quando essa proposta é aplicada em diferentes tecidos biológicos, a qualidade dos resultados muitas vezes não é satisfatória.

Outro trabalho que teve como objetivo avaliar as condições de difusão e efeitos do ozônio em sistemas biológicos foi desenvolvido por Miller *et al*. (1985), o qual se baseou na avaliação da toxicidade do ozônio difundido no tecido pulmonar. Neste estudo foram realizados experimentos em animais, associando estes a modelos matemáticos. Os resultados encontrados através da composição bioquímica do trato aéreo e da mucosa, após a rota aérea ser exposta ao ozônio, permitiram que as concentrações utilizadas fossem extrapoladas para uso em seres humanos. Trabalhos baseados em modelos como os destes autores, apesar de escassos, compreendem a maioria dos estudos que relacionam numericamente os efeitos do ozônio nos organismos, levando em conta principalmente o ozônio em concentrações de natureza

atmosférica, portanto, fora da janela–terapêutica, e muita das vezes não são passíveis de aplicação aos protocolos de ozonioterapia.

Morosi, Sirito e Silvestri (2007), realizaram um experimento utilizando a imagem ultrassônica para obter o coeficiente de difusão de uma mistura gasosa de oxigênio-ozônio no tecido adiposo humano. O trabalho objetivou acompanhar a difusão do par gasoso (O_2–O_3) em tempo real através da imagem ultrassônica, e, mesmo sem a utilização de um modelo matemático foi possível estimar quantitativamente as alterações na difusão espacial do par gasoso com ozônio no tecido alvo característico.

Lovato, Martín e Cassano (2009) desenvolveram um modelo da cinética de decomposição do ozônio em meio aquoso sob influência de pH ácido e neutro. O modelo empregado levanta a importância de utilizar diversos parâmetros envolvidos na produção do ozônio, de modo a compreender o comportamento e cinética deste na degradação dos diversos compostos orgânicos e inorgânicos.

A solubilidade é um dos fatores mais importantes na utilização do ozônio em tecidos e fluidos, essa capacidade é estabelecida pela Lei de Henry, que compreende a concentração de saturação e solubilidade do gás como proporcional à pressão parcial do ozônio a uma determinada temperatura.

Os coeficientes de absorção, Bunsen, Kuenen e Ostwald também são maneiras de expressar a solubilidade dos gases em líquidos (Biń, 2006). Ainda não há consenso sobre a aplicação da Lei de Henry e seus desvios da idealidade em relação a ozonização, alguns autores afirmam que o ozônio não segue esse comportamento na “água biológica” (plasma, urina, linfa etc), somente quando dissolvido em água pura (Bocci, 2006b; Travagli, Zanardi e Bocci, 2006).

O pH durante a ozonização aquosa também tem grande influência no valor do coeficiente de Henry, com uma menor dependência entre a faixa de 4–9 (Kuosa, Laari e Kallas, 2004).

2.6. Ação do ozônio no sangue

O sangue é um tecido conjuntivo líquido, de cor vermelha, que circula nas artérias e veias sendo bombeado pelo coração, transportando gases, nutrientes e diversos elementos necessários à defesa do organismo. A sua composição contempla cerca de 55 % de plasma e 45 % de células, em sua maioria eritrócitos. A composição do plasma é complexa, mas basicamente composto por 91 % de água dissolvida em uma solução de íons mantida em um pH 7,35–7,45 com moléculas hidrofílicas e lipofílicas, além de lipídios, proteínas, fibrinogênio, globulinas, hormônios e diversos fatores de coagulação (Bocci, Zanardi e Travagli, 2011b; Armstrong, 2017).

As consequências do ozônio no sangue vêm sendo estudadas apenas há algumas décadas, sendo que inicialmente a maioria dos estudos visava desvendar esses efeitos através da exposição do indivíduo ao ozônio ambiental, e analisando esses efeitos nos constituintes sanguíneos (Goldstein e Balchum, 1967; Lutmer, Busch e Delong, 1967; Goldstein *et al.*, 1968; Teige, McManus e Mudd, 1974; Buckley *et al.*, 1975; Yoshikawa *et al.*, 1985). Um marco científico da exposição do ozônio no sangue ocorreu apenas em 1974, quando Wolff (1974) publicou uma metodologia clássica da exposição por alguns minutos do sangue humano *ex vivo* ao ozônio em um frasco de vidro, sendo este sangue ozonizado reinfundido no paciente doador.

A auto-hemoterapia de ozônio compreende um clássico procedimento no qual um volume de sangue venoso coletado é exposto a um mesmo volume de uma mistura de oxigênio-ozônio, e, reinfundido lentamente de maneira intravenosa (auto-hemoterapia maior) ou intramuscular (auto-hemoterapia menor). O termo “maior” e “menor” são também apenas indicações para um volume diferente de sangue utilizado, da ordem de 50–225 mL para o primeiro e de 5–10 mL para o segundo (Bocci, 2011).

Outra maneira de realizar a auto-hemoterapia maior é através da ozonização do sangue por meio de circulação extracorpórea. Di Paolo *et al.* (2002), em um dos seus diversos trabalhos sobre este tema, relataram que a circulação extracorpórea do sangue ozonizado apresenta alta eficiência, permitindo que se aplique a mistura O_2-O_3 por

longos períodos e a um considerável volume de sangue, sem que ocorram danos ao fluido.

A transferência de massa do ozônio para o sangue na prática clínica de auto-hemoterapia, muitas das vezes compreende o ato de submeter uma seringa com um volume de ozônio e um volume de sangue (razão de 1:1) sob um oscilador monodirecional ou apenas gentilmente movimentar com a mão a seringa por alguns minutos (Bocci, 2006a). Um evento como este tem caráter de manipulação subjetiva e a não padronização dessa transferência de massa pode levar a resultados insatisfatórios quando de sua aplicação clínica.

Apesar dos seus diversos e complexos mecanismos de ação, uma das conclusões disponíveis na literatura científica é que o ozônio dissolvido na água do plasma age basicamente como um pró-fármaco, gerando diversos mensageiros bioquímicos que acelerarão a transferência de elétrons e o metabolismo geral. Esses mecanismos compreendem basicamente cinco respostas biológicas (Bocci, Zanardi e Travagli, 2011b):

- aumento da circulação sanguínea ao tecido isquêmico,

- aumento da entrega de oxigênio, aumentando o metabolismo geral,

- regulação nas populações das enzimas antioxidantes celulares,

- indução de uma leve ativação do sistema imune, aumentando a liberação dos fatores de crescimento plaquetários,

- estimulação do sistema neuroendócrino.

Ao contrário do sangue, os olhos e os pulmões são muitos sensíveis ao ozônio devido a sua capacidade antioxidante mínima de neutralização, e, portanto o ozônio não deve entrar em contato com esses órgãos (Bocci, 2006b).

Em humanos, além das concentrações de ozônio apropriadas, a ozonização do sangue deve ser realizada somente em sangue total, visando prevenir qualquer dano

celular ou toxicidade (aguda ou crônica) (Bocci, 2006a). A ozonização específica de algumas partes do sangue, como o plasma ou o soro, é capaz de variar quantitativamente e gerar novos metabólitos (Travagli *et al.*, 2010). O ozônio inicialmente interage com a capacidade antioxidante do sangue total, e logo após é dissolvido na água do plasma, e ao mesmo tempo reage instantaneamente com biomoléculas como os antioxidantes (ácidos úrico e ascórbico), os grupos de albumina plasmática (cisteína, glutationa reduzida), os ácidos graxos poli-insaturados entre outros.

O consumo do ozônio com a geração simultânea de antioxidantes, peróxido de hidrogênio, liberação de oxigênio, entre outros, é também compreendido como uma típica ERO e uma mistura heterogênea de baixo peso molecular de POL (Travagli, Zanardi e Bocci, 2006). Um exemplo deste comportamento do ozônio é sua afinidade com grupos sulfidrilas, característicos dos aminoácidos essenciais, de modo a intervir no metabolismo proteico, o que demonstra o seu papel imunoregulador e imunorestaurador (Méndez Pérez, Calunga Fernández e Menéndez Cepero, 2003).

Todos esses compostos que interagem com o ozônio tem atividades biológicas e alvos bioquímicos cruciais nas reações com os eritrócitos, leucócitos, plaquetas entre outros, sendo que a geração desses compostos deve ser realizada nos diversos hemocomponentes de maneira segura para alcançar os efeitos biológicos sem danos.

A Tabela 1 apresenta em resumo um levantamento bibliográfico com vistas a elencar estudos que investigaram em um determinado grupo amostral, de maneira *in vivo* ou *in vitro*, os efeitos do ozônio no sangue. Observa-se que em alguns desses estudos os autores relataram efeitos positivos, negativos, ou ainda, nenhum efeito relacionado a exposição do ozônio no sangue.

Tabela 1. Resumo de estudos sobre o ozônio no sangue.

Autores	Amostra	Efeito do ozônio
Al-Dalain *et al*. (2001)	ratos – *in vivo*	Prevenção do estresse por dano oxidativo e controle do índice glicêmico
Anitua *et al*. (2014)	humanos – *in vitro*	Altera a produção de fibrina e induz uma diminuição dos fatores de crescimento no plasma rico em plaquetas
Baieth & Elashmawi (2012)	humanos – *in vitro*	Redução da hemoglobina, discreto aumento na concentração dos hematócritos e ligeiro aumento no volume corpuscular médio
Ballardini (2006)	equinos – *in vivo*	Leucocitose, ligeiro aumento nos hematócritos e manutenção da hemoglobina
Biedunkiewicz *et al*. (2006)	humanos – *in vivo*	Sem efeito na coagulação, fibrinólise
Bocci *et al*. (1999)	humanos – *in vitro*	Redução temporária da capacidade antioxidante total, indução na agregação plaquetária
Bocci *et al*. (2007)	humanos – *in vivo*	Estimula a produção da enzima heme oxigenase 1 e das proteínas, e ainda regula o balanço de óxido nítrico
Burgassi *et al*. (2009)	humanos – *in vitro*	Potencial bactericida e efeito modulatório na oxidação
Clavo *et al*. (2004)	humanos – *in vivo*	Aumento da oxigenação tumoral
Delgado-Roche, Fernández e	ratos – *in vivo*	Aumento na síntese da atividade enzimática da GSH e atenuação da

Álvarez (2014)		peroxidação lipídica
Giunta *et al.* (2001)	humanos – *in vivo*	Redução da viscosidade sanguínea e do fibrinogênio, aumento da filtrabilidade dos eritrócitos e inalteração dos hematócritos
Górnicki & Gutsze (2000)	humanos – *in vitro*	Dose-dependência na fluidez da membrana dos eritrócitos
Guven *et al*. (2009)	ratos – *in vivo*	Aumento da atividade enzimática da GSH e efeito na modulação antioxidativa e anti-inflamatória
Haddad *et al*. (2009a)	equinos – *in vivo*	Aumento dos hematócritos e alterações nas porções plaquetárias
Haddad *et al*. (2009b)	equinos – *in vivo*	Aumento do fibrinogênio e diminuição da glicose e gama-glutamiltransferase
Jafari *et al.* (2009)	ratos – *in vivo*	Leucocitose, alteração na contagem das plaquetas e manutenção nos valores dos eritrócitos e dos hematócritos
Labuschagne *et al*. (2009)	babuínos – *in vivo*	Redução da GSH total e aumento da superóxido dismutase
López (2007)	equinos – *in vivo*	Sem alterações na concentração da hemoglobina
Moreira (2015)	cães – *in vivo*	Sem alteração na hemoglobina, discreta alteração nas proteínas totais
Mustafaev *et al*. (2007)	humanos – *in vivo*	Aumento dos leucócitos, fagocitose e diminuição na sedimentação dos eritrócitos
Ohtsuka *et al*. (2005)	bovinos – *in vivo*	Aumento das proteínas plasmáticas e sorológicas, globulinas e leucócitos

Pecorelli *et al.* (2013)	humanos – *in vitro*	Dose-dependência na ativação da cinase regulada por sinal extracelular e da p38, efeito expressivo na enzima heme oxigenase 1
Re *et al.* (2014)	humanos – *in vivo*	Aumentos nos níveis de expressão do Nrf2, superóxido dismutase e da catalase
Santana-Rodríguez *et al.* (2017)	ratos – *in vivo*	Diminuição das expressões gênicas, aumentos do fluxo sanguíneo e na oxigenação
Schulz *et al.* (2008)	coelhos – *in vivo*	Remissão na multiplicação das células cancerígenas
Sloan (2010)	humanos – *in vitro*	Dose-dependência com redução na GSH, aumentos na proteína c-reativa e na sedimentação dos eritrócitos
Terasaki *et al.* (2001)	bezerros – *in vivo*	Alterações na produção dos leucócitos
Travagli, Zanardi e Bocci (2006)	humano – *in vivo*	Diminuição temporária da capacidade antioxidante total e da GSH, sem efeito nos fibrinogênios e no colesterol
Valacchi & Bocci (1999)	humanos - *in vitro*	Dose-dependência dos fatores de crescimento no plasma rico em plaquetas
van der Zee & de Monte (2001)	humanos - *in vivo*	Diminuições na viscosidade, macromoléculas plasmáticas e no fibrinogênio
Wright *et al.* (1994)	porquinhos-da-índia - *in vitro*	Alteração na produção dos fatores de ativação plaquetários

2.7. Difusores

A difusão do ozônio pode ser viabilizada de várias maneiras, desde um simples tubo aberto através do qual o gás entra em uma coluna ou bolhas geradas por tubulações perfuradas horizontalmente, impelidores, aspersores de gás, e ainda dispositivos difusores porosos de materiais cerâmicos, plásticos, metálicos entre outros (Gottschalk, Libra e Saupe, 2000).

O elemento difusor é um dispositivo capaz de transferir um volume de gás absorvido para um solvente líquido em uma temperatura específica e sobre pressão parcial, tendo influência direta no diâmetro das bolhas, sendo que este aspecto é fundamental para uma maior isotropia na interface gás-líquido (Gong *et al*., 2007), sendo ainda desejado que o diâmetro das bolhas seja sempre o menor possível, pois quanto menor o diâmetro da bolha de gás, maior será a área superficial disponível para a transferência de massa, aumentando, portanto a taxa de transporte do ozônio da fase gasosa para a fase líquida.

O uso dos difusores porosos é predominante na ozonização da água, mas a matéria-prima desses dispositivos não é indicada para fluidos biológicos, como o sangue, tendo em vista que não é desejado o comprometimento ou alterações indesejadas no fluido pelo elemento difusor. Os materiais de confecção desses dispositivos (sílica, alumina etc), são de caráter contaminante, não descartável e não estéril para o nível de aplicação exigida pelos fluidos biológicos.

2.8. Venturi

O dispositivo venturi é um injetor com potencial capacidade para aumentar a transferência de massa entre a fase gasosa e a fase líquida, sendo principalmente regido pelo princípio de Bernoulli (conservação de energia do fluido) e pelo princípio da continuidade de massa. O dispositivo venturi foi desenvolvido em 1888 pelo engenheiro austro-americano Clemens Herschel (1842-1930), sob a denominação de Medidor

Venturi (Herschel, Merriman e Francis, 1888). O nome do dispositivo diz respeito ao físico italiano Giovanni Battista Venturi (1746-1822), pioneiro no desenvolvimento da hidráulica de comportamento divergente.

O venturi combina uma simples unidade que contempla uma garganta cilíndrica entre duas seções cônicas de maior diâmetro, sendo a primeira convergente e a segunda gradualmente divergente, que leva a seção cilíndrica com a dimensão do tubo original, tendo por objetivo acelerar o fluido temporariamente e alterar a sua pressão. Quando o fluido pressurizado entra por injeção direta, o mesmo é constrito através da câmara de injeção ocorrendo mudanças nas correntes de jato de alta velocidade. O aumento da velocidade por meio desta câmara de injeção propicia uma diminuição da pressão absoluta, criando vácuo, permitindo assim que o fluido seja extraído na porta de sucção e seja arrastado para a corrente do fluido. A medida que a corrente é difundida na saída do dispositivo, sua velocidade é reduzida e reconvertida em uma pressão mais baixa. Um esquema representativo do princípio de funcionamento do dispositivo venturi é apresentado na Figura 2.

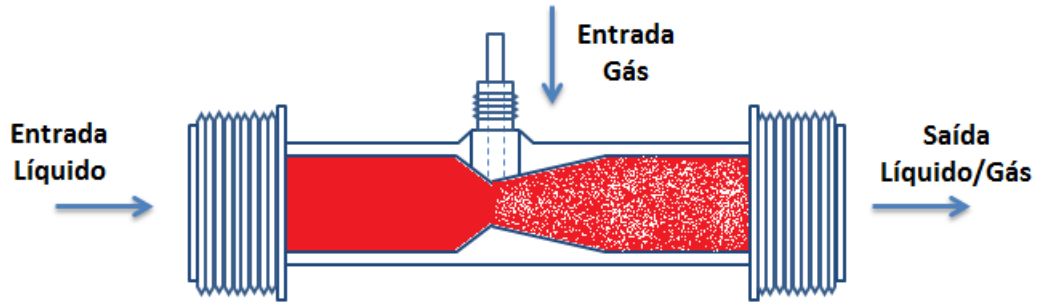

Figura 2. Esquema de funcionamento do dispositivo venturi.
Fonte: arquivo pessoal.

Recentemente várias abordagens vêm sendo realizadas para avaliar a eficiência dos dispositivos venturi em processos de difusão, essas diversas aplicações dizem respeito a utilização em, sistemas de colunas (Briens *et al.*, 1992), redes neurais artificiais (Cuci, 2016), sistemas de recirculações (Gourich *et al.*, 2008), fluidodinâmica computacional (Baylar *et al.*, 2009; Pathapati *et al.*, 2016), lavadoras (Gamisans, Sarrà e Lafuente, 2004) entre outros. As alterações nas dimensões das diversas regiões do dispositivo venturi são continuamente estudas por diversos autores, uma extensa discussão dessas configurações foi realizada por Ozkan *et al*. (2006).

Estipula-se que os venturímetros comerciais para ozônio que venham a ser aplicados na área da saúde exigem uma pequena dimensão tendo em vista que normalmente os fluidos ou tecidos a serem ozonizados são de pequeno volume. Baseado na revisão bibliográfica, não foram encontrados relatos da utilização do dispositivo venturi em um sistema de ozonização do sangue, devido as grandes vantagens da utilização deste dispositivo em outras áreas, sua utilização pode ser uma importante ferramenta no processo de ozonização sanguínea.

2.9. Modelo matemático – ozônio-sangue

Apesar do grande número de estudos que desenvolveram modelos matemáticos e numéricos para a transferência de massa do ozônio para a água, não encontramos relatos de um modelo que apresente o comportamento da difusão do ozônio no sangue, seja em uma única célula vermelha, em um fluxo sanguíneo ou em um volume de sangue específico.

Devido a composição molecular triatômica do ozônio (O_3), inicialmente foram revisados alguns modelos que estabeleciam a difusão e o comportamento do oxigênio (O_2) no sangue. Tais modelos de difusão do oxigênio no sangue, apesar de diversos, levam em questão uma variedade de processos bioquímicos do organismo, e, muitas das vezes são específicos para condições fisiológicas onde há a presença de bolhas no sangue, tais como, em função dos efeitos colaterais nas cirurgias cardiovasculares, por injeções, em transplantes de pele, na emboloterapia, em descompressões por exposição a elevadas pressões (mergulhadores, astronautas etc), como agente de contraste entre outras condições (Papadopoulou *et al*., 2014).

No presente caso, parte-se do pressuposto que as soluções numéricas são normalmente baseadas em um modelo experimental, tendo suas soluções analisadas e comparadas com as variações deste mesmo modelo. Isso se dá devido ao fato de que os modelos experimentais inicialmente propostos podem levar a resultados insatisfatórios, exigindo alterações do mesmo. Os inúmeros ensaios experimentais realizados normalmente conduzem a soluções experimentais simples, permitindo também

simplificar o modelo analítico, simplificando a solução de ambas e a concordância entre elas.

A transferência de massa do gás ozônio para o sangue é vital para que o efeito do ozônio neste tipo de fluido possa ocorrer. A concentração do gás ozônio fornecida pelo gerador e a transferência de massa calculada serve de base para determinar a real concentração de gás transferida para o fluido biológico, e assim, otimizar o processo terapêutico e os resultados obtidos. O conhecimento da transferência de massa, do fenômeno de transporte e da cinética de reação do ozônio no sangue se tornam essenciais para o estabelecimento de qualquer protocolo de natureza terapêutica, levando-se ainda em conta que ao ozônio é atribuído o conceito de hormese (Bocci, Zanardi e Travagli, 2011b; Viebahn-Hänsler, León Fernández e Fahmy, 2012), na qual um elemento perigoso em altas doses pode apresentar efeito benéfico em baixas doses.

Os exemplos de modelos matemáticos citados à seguir fazem referência a uma condição específica do comportamento de um gás no sangue, por exemplo, na dissolução do oxigênio (Fischer, Zinovik e Poulikakos, 2009), na dinâmica das bolhas (Yang, 1971), na taxa de dissolução das bolhas no sangue (Yang *et al.*, 1971a), na troca gasosa sob estresse inflamatório (Reynolds, Ermentrout e Clermont, 2010), nas oscilações de pressão (Tsujino e Shima, 1980), nas alterações cíclicas e morfológicas das bolhas (Van Liew e Burkard, 1995), na estabilidade dinâmica, entre outros, mas um modelo para o comportamento do ozônio no sangue continua inexplorado. Diversos trabalhos apresentam modelos de transferência de massa gás-líquido, como por exemplo, modelos que são baseados em sistemas que utilizam colunas, reatores, venturis, membranas etc. Neste trabalho utilizaremos um modelo numérico, desenvolvido por Farooq e Ahmed (1989) que descreve a cinética da transferência de massa, e compreende a aplicação do ozônio em um sistema aquoso.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa foi submetida e aprovada na Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Anhembi Morumbi (UAM), sob o nº: 0077201461. O termo de aprovação deste projeto de pesquisa esta no Anexo 1.

3.1. Eficácia na transferência de massa

O procedimento para a análise da eficácia na transferência de massa gás-líquido foi realizado a partir de dois protocolos para a ozonização da água.

O primeiro utilizou um dispositivo venturi (BWTS, China) fabricado em PVDF, material compatível ao ozônio, apresentando comprimento de 57 mm, entrada de ar de 3,175 mm, entrada-saída do fluido com 6,35 mm, e um ângulo com 21º e um com 8º para as seções convergente e divergente respectivamente, conforme mostra a Figura 3.

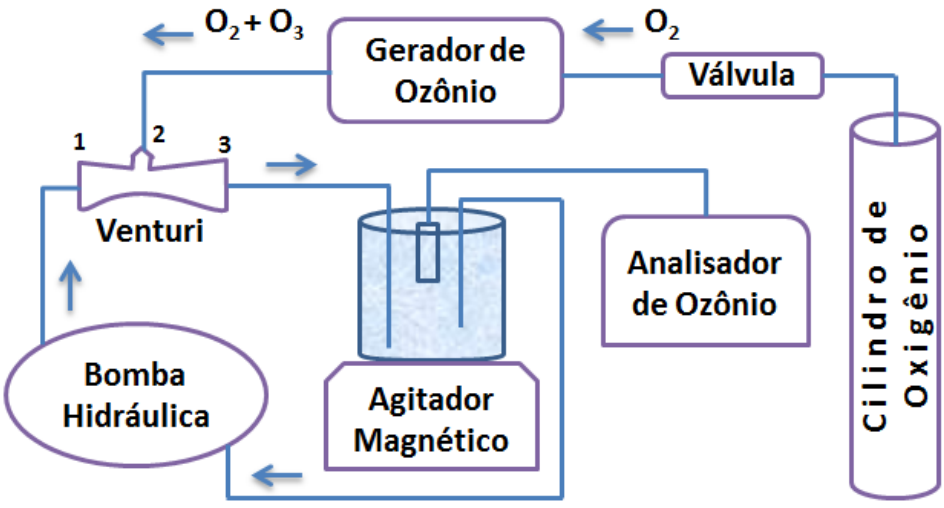

Figura 3. Processo de transferência de massa utilizando o venturi.
Fonte: arquivo pessoal.

A Figura 3 apresenta o sistema de transferência de massa utilizando o venturi. Um cilindro com oxigênio medicinal (21 % oxigênio, 79 % nitrogênio; 99,5% v/v de pureza; 1072, Linde Gases, Brasil), acoplado a uma válvula mecânica fixada em ⅛ L/min na sua saída eram utilizados para fornecer fluxo de oxigênio ao gerador de ozônio. A saída do gerador de ozônio foi conectada à entrada de gás no venturi (2). A água foi injetada no venturi por meio de uma bomba centrífuga (02A12, GAP, Brasil) na entrada de líquido (1), que recebe o ozônio vindo da entrada de gás (2), e misturados (3) atingem o reservatório com capacidade de 500 mL. Neste caso foi utilizada água ultrapura produzida pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). Um agitador magnético foi acoplado no reservatório para homogeneizar a distribuição do gás no meio.

Na parte superior deste mesmo reservatório foi posicionado no fluido um analisador da concentração de ozônio na água, visando a medição da concentração em tempo real deste gás no meio aquoso durante os 20 minutos de ozonização. Para tal foi utilizado um medidor analítico de ozônio TIZ-OEM (Anseros, Tübingen, Alemanha), capaz de realizar em tempo real a medição do ozônio residual e da temperatura da água. O princípio físico deste sensor se baseia no método de amperometria potenciostática.

O segundo protocolo utilizou um difusor de bolhas (Nesia, China) fabricado em aço inox, de geometria cilíndrica, com 1,3 cm de diâmetro, 2,6 cm de altura e com poros da ordem de 0,5–2 µm, conforme a Figura 4. Em ambos os experimentos foi utilizado um gerador de ozônio (OzonLife, Medical Systems, Brasil) com produção baseada no efeito corona, gerando o gás na concentração de 26 mg/L. Para essa produção de ozônio, o gerador foi alimentado com oxigênio sob um fluxo constante de ⅛ L/min, respeitando ainda a inércia do gerador para produzir o ozônio e iniciar a medição.

A Figura 4 apresenta o sistema de transferência de massa utilizando o difusor de bolhas. Analogamente ao caso anterior o fluxo de oxigênio para o gerador de ozônio foi regulado para ⅛ L/min. Neste caso a saída do gerador de ozônio foi conectada diretamente a entrada do difusor de bolhas e o reservatório foi preenchido com 500 mL de água ultrapura, produzida também pelo sistema Milli-Q. Um agitador magnético posicionado abaixo do reservatório novamente garantia a homogeneização do meio, e assim uma distribuição do gás ozônio no líquido. O sistema para a medição da

concentração do gás e da temperatura da água foi implementado conforme experimento anterior (venturi), como também a aquisição e a análise numérica dos dados experimentais foi realizada via software Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, EUA).

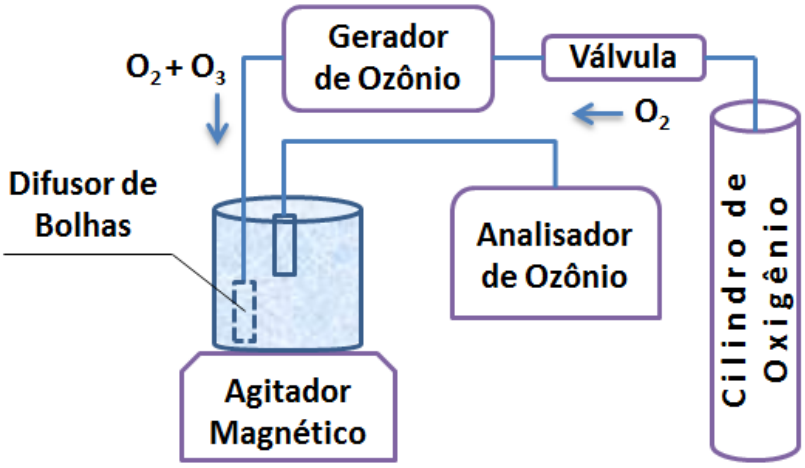

Figura 4. Processo de transferência de massa utilizando um difusor de bolhas.
Fonte: arquivo pessoal.

3.2. Protocolos para a ozonização do sangue

Visando obter uma máxima eficiência no processo de transferência de massa do ozônio para o sangue, inicialmente optou-se por protocolos que consistem na insuflação por ozônio da bolsa de sangue.

3.2.1. Bolsa insuflada com ozônio

Neste protocolo o sangue foi obtido de equinos *in vivo*, sendo colhido 200 mL através de punção em veia jugular por meio de agulha hipodérmica de 40x1,20 mm e coletado por uma seringa de 60 mL. Foram utilizadas duas bolsas (JP, Brasil) para o armazenamento do sangue, cada bolsa apresenta volume máximo de 500 mL, sendo que em cada uma delas foram armazenados 100 mL de sangue.

Visando a manutenção das propriedades naturais do fluido sanguíneo, as bolsas de coleta foram mantidas com 14 mL da porção da solução de anticoagulante CPDA-1, já presente na bolsa, e mantidas resfriadas em um recipiente térmico até o início do experimento, que era iniciado cerca de 1 h após a coleta do sangue. Esta condição de armazenamento e transporte também foi respeitada durante o encaminhamento das amostras de sangue para a realização do hemograma completo em laboratório veterinário para análises clínicas.

Todos os protocolos de ozonização do sangue foram realizados em um laboratório com temperatura ambiente controlada em 20 ^{o}C, as bolsas após serem retiradas do recipiente térmico de transporte eram mantidas nesse ambiente a 20 ^{o}C por 20 minutos antes do início dos protocolos. O tempo de coleta do sangue equino na bolsa até o início do experimento foi de cerca de uma hora, e a realização do hemograma era conduzida pelo laboratório no mesmo dia das experimentações.

No protocolo adotado foram definidas duas etapas, à saber; coleta de 2 mL de sangue das bolsas para fins de controle e a submissão das duas bolsas à ozonização por insuflação. A coleta da amostra controle foi realizada com o auxílio de uma seringa hipodérmica descartável com volume total de 3 mL, esta seringa era acoplada a conexão de entrada da bolsa de sangue, e retirava-se 2 mL deste para um tubo de vidro visando a realização do hemograma. Em seguida deu-se a etapa de insuflação por ozônio das duas bolsas, e nesta também foram retiradas amostras de 2 mL de sangue nos tempos de 5, 10 e 20 minutos.

Cada uma das bolsas foi insuflada acoplando-se sua conexão principal a uma mangueira de silicone instalada na saída do gerador de ozônio, sob fonte do cilindro de oxigênio medicinal regulado por válvula mecânica a ⅛ L/min. A bolsa durante todo o período era mantida sob concomitante homogeneização através de um sistema mecânico estabilizado responsável pela movimentação em balanço da bolsa. A bolsa assim foi inflada com 388 mL de ozônio, sendo este todo o volume disponível. O tempo necessário para a insuflação foi de 187 s, e em seguida era realizada a selagem da conexão de entrada por meio de uma pinça de travamento. Este tempo citado, em virtude do fluxo de gás, era o necessário para inflar completamente a bolsa em função do volume disponível em seu interior devido a capacidade do volume da bolsa e volume

de sangue contido. Para a retirada das amostras de sangue ao longo do tempo de ozonização foi realizada uma abertura controlada da pinça de travamento, portanto, a bolsa era posicionada verticalmente de modo que assim em seu interior o gás permanecesse na parte superior da bolsa, mantendo internamente o volume de gás pretendido. Em seguida, a seringa de coleta era acoplada a conexão da bolsa, e a amostra de sangue coletada era inserida no tubo de vidro para a realização do hemograma. O sistema desenvolvido para este protocolo é apresentando na Figura 5.

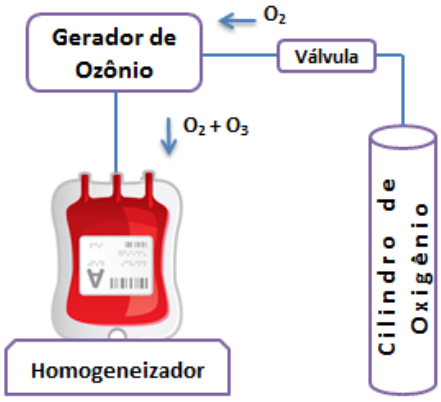

Figura 5. Insuflação da bolsa de sangue.
Fonte: arquivo pessoal.

O equipamento gerador de ozônio (OzonLife, Medical Systems, Brasil) sob o fluxo de oxigênio citado foi configurado para gerar o ozônio na concentração de 33 mg/L para a primeira bolsa e 62 mg/L para a segunda bolsa. A Figura 6 apresenta uma das bolsas de sangue utilizadas neste protocolo que estava inflada com o gás.

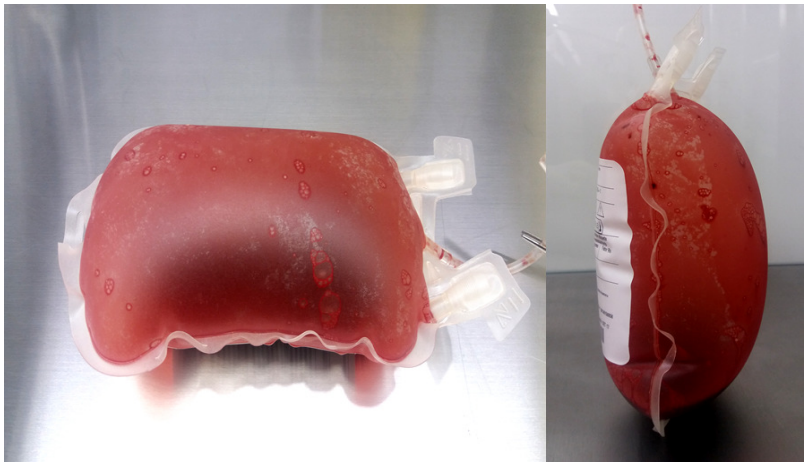

Figura 6. Bolsa de sangue insuflada com o ozônio.
Fonte: arquivo pessoal.

3.2.1.1. Bolsa insuflada com ozônio-venturi

Neste protocolo, novamente o sangue foi obtido de maneira análoga a anterior. Foram utilizadas quatro bolsas para a coleta do sangue equino. Este protocolo consiste na insuflação da bolsa de sangue com injeção do ozônio pelo dispositivo venturi, com vistas a avaliar através do hemograma o efeito desta transferência de massa proporcionada pelo venturi.

O sistema, conforme Figura 7, consiste em um circuito fechado para a circulação do sangue, na qual uma bomba centrífuga (02A12, GAP, Brasil) bombeia continuamente o sangue para a entrada (1) do dispositivo venturi (BWTS, China). A entrada de gás (2) do venturi é acoplada à saída do gerador de ozônio. A saída (3) do venturi é acoplada à entrada (b) da bolsa de sangue através de uma mangueira de silicone. Uma das conexões da bolsa de sangue (c) é utilizada para um pequeno escape do gás durante o processo de aumento do volume deste no interior da bolsa, em função do aumento das bolhas presentes no sangue oriundas da circulação. Nas extremidades (1 e 3) do venturi foram instalados adaptadores roscáveis de aço inox visando facilitar a instalação do mesmo nas mangueiras de silicone na linha do circuito proposto. As três conexões da bolsa de sangue (a) bomba, (b) venturi e (c) escape do gás, também receberam dispositivos em aço inox visando uma melhor instalação das mangueiras de silicone. O controle da vazão do sangue circulante foi obtido mantendo-se regulada a tensão elétrica de alimentação da bomba, sendo esta ajustada e fixada para operar com 1,5 mL/s ±0,1, neste caso sendo alimentada com 1,8 V.

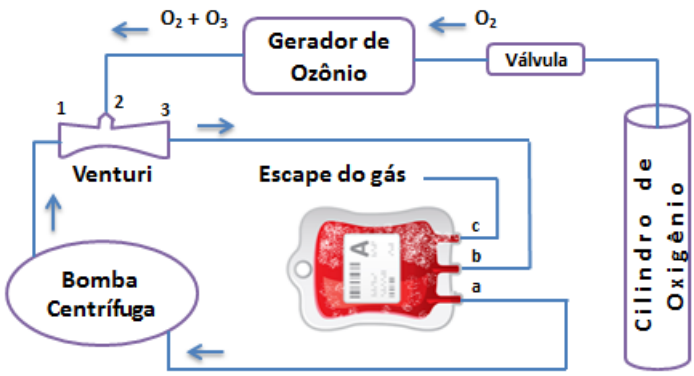

Figura 7. Ozonização da bolsa de sangue com o venturi.
Fonte: arquivo pessoal.

As concentrações de ozônio utilizadas foram 33 e 62 mg/L, mediante um fluxo de oxigênio medicinal com ⅛ L/min. Foram obtidas três amostras de 2 mL de cada bolsa para os hemogramas; uma amostra para a situação controle, outra após 5 minutos com o sistema somente sob circulação e por último, a partir deste, uma amostra após 3 minutos na respectiva concentração de ozônio exposta ao sangue.

3.2.2. Ozonização em coluna de vidro

De maneira a obter uma melhor transferência de massa e uma maior reprodutibilidade dos resultados, optou-se pelo teste de uma nova configuração/protocolo experimental.

Dois aspectos balizaram a definição do sistema. O primeiro foi a escolha de uma geometria e dispositivo capaz de realizar a transferência de massa de maneira mais eficiente. Fazendo um vasto estudo sobre os dispositivos disponíveis para esse fim, a escolha recaiu novamente sobre a utilização do dispositivo venturi. A segunda definição visou eliminar as diferentes acomodações gás-líquido no interior da bolsa durante os protocolos de ozonização anteriores, que geravam algumas desvantagens nos procedimentos. Para isso optou-se pela escolha de um reservatório rígido de vidro.

O sangue de equinos foi obtido novamente de maneira análoga aos protocolos anteriores. Para este sistema (Figura 8) foi concebido um reservatório de vidro de borossilicato na forma de um tubo cilíndrico com altura de 1,50 m e diâmetro interno de 2,2 cm, contendo os 114 mL de sangue. Para o processo de ozonização o sangue foi aspirado pelo mesmo modelo de bomba centrífuga utilizada anteriormente, que conectada ao venturi permitia a ozonização do circuito, essa configuração sequencial é a mesma utilizada no protocolo anterior (3.2.1.1.). A saída do venturi foi conectada ao reservatório de vidro por uma conexão vedante de aço inox, retornando assim o sangue ozonizado ao reservatório. A circulação do sangue entre os dispositivos foi novamente realizada utilizando-se mangueiras de silicone acopladas aos conectores em aço inox.

O grande comprimento do tubo foi determinado em função das experiências anteriores que mostraram que o sangue ao ser ozonizado apresentava inúmeras bolhas com alta tensão superficial. Esse efeito contribui para a manutenção das bolhas por longos períodos de tempo fazendo com que a coluna de bolhas cresça exponencialmente ao longo do processo de ozonização.

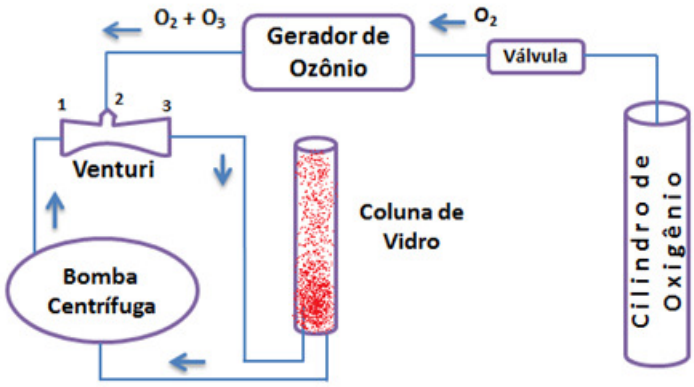

Figura 8. Ozonização do sangue em coluna de vidro.
Fonte: arquivo pessoal.

Neste experimento foi utilizada uma concentração de ozônio com 62 mg/L, mediante fluxo de oxigênio medicinal com ⅛ L/min. Após 5 minutos, o comprimento total do tubo foi completamente preenchido pelas bolhas neste tempo.

Esse experimento demonstrou claramente que para os casos de ozonização com períodos de tempo acima de 5 minutos, o referido procedimento tornar-se-ia inviável em função da grande coluna de bolhas formadas e mantidas durante o processo (Figura 9). Além disso, a formação das bolhas por longos períodos de tempo mantinha um volume considerável de sangue distribuído nas bolhas, fazendo com que o sangue na parte inferior do reservatório praticamente desaparecesse, e assim a bomba centrífuga não conseguisse o contínuo bombeando do sangue. Em função dos resultados obtidos, mais uma vez fomos instados a buscar uma nova configuração.

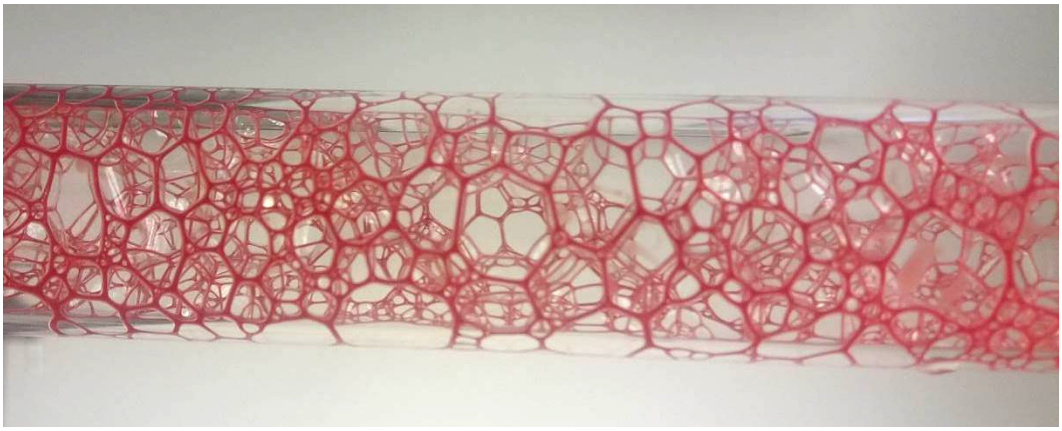

Figura 9. Formação de bolhas durante ozonização do sangue em tubo de vidro (vista horizontal).
Fonte: arquivo pessoal.

3.2.3. Frasco sob pressão ozônio-venturi

Desta vez optou-se por alterar apenas o reservatório, uma vez que o venturi apresentou bons resultados em relação à transferência de massa. A escolha neste caso recaiu sobre um reservatório de vidro fechado, que permitisse que o sistema operasse de forma realimentada com pressão positiva (Figura 10). A descrição deste sistema é similar ao protocolo anterior (3.2.2.). Neste caso a pressão intra-sistema é definida basicamente em função da pressão do cilindro de oxigênio que alimenta o gerador de ozônio, das características da bomba centrífuga, e, do diâmetro da tubulação do sistema (mangueiras de silicone, diâmetro interno da bomba e do venturi).

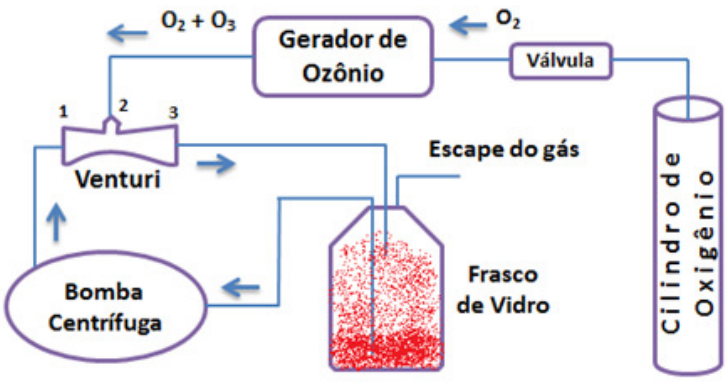

Figura 10. Ozonização do sangue em frasco de vidro sob regime de pressão.
Fonte: arquivo pessoal.

Nesta situação, apesar da tensão superficial das bolhas ser a mesma, o aumento da pressão intra-sistema deveria ser capaz de “quebrar” essas bolhas, e assim, reduzir drasticamente o seu número. O sistema foi montado e durante o experimento pode-se constatar a ocorrência desse fenômeno, conforme Figura 11. O experimento mostrou ser capaz de produzir uma importante transferência de massa com boa reprodutibilidade durante o processo.

O sangue foi coletado de equinos, analogamente aos protocolos anteriores, mantido até o início do experimento em quatro bolsas com 60 mL de sangue cada. A realização dos hemogramas foi a partir da retirada de 2 mL de sangue em cinco situações distintas; controle, 2 minutos de somente circulação, e na ozonização contínua nos tempos de 1, 4 e 10 minutos. Das quatro bolsas utilizadas neste protocolo, duas foram ozonizadas na concentração de 33 mg/L e duas com 62 mg/L.

Figura 11. Ozonização do sangue em frasco de vidro através do venturi sob regime de pressão.
Fonte: arquivo pessoal.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros quantitativos utilizados para realização dos hemogramas nos experimentos conduzidos tendo como referência a espécie equina (tração) (Jain, 1993). Os parâmetros hematológicos utilizados neste estudo foram respectivamente: Eritrócitos em milhões/mm^3; Hemoglobina em g %; Hematócrito em %; Proteínas totais em g %; Leucócitos em mil/mm^3 e Plaquetas em mil/mm^3. Foram ainda utilizados nas apresentações gráficas uma região com os valores de referência (VR) expressos para o LIR (Limite Inferior de Referência) e o LSR (Limite Superior de Referência) de cada componente. A análise estatística foi realizada através do software Instat 3.0 (GraphPad, Califórnia, EUA).com o teste t pareado para a situação controle e durante a circulação do sangue, e ainda em relação a todos os períodos de ozonização avaliados, adotando um intervalo de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros dos valores no hemograma tendo como referência a espécie equina (tração).

Parâmetro	**Valores de Referência (LIR – LSR)**	**Unidade**
Eritrócitos	5,5 – 9,5	milhões/mm^3
Hemoglobina	8,0 – 14,0	g %
Hematócrito	24 – 44	%
Proteínas totais	5,8 – 8,7	g %
Leucócitos	6 – 12	mil/mm^3
Plaquetas	100 – 350	mil/mm^3

As concentrações hematológicas foram determinadas por um analisador semi-automático de sangue, e ainda submetidos às rotinas de centrifugação, absorbância de hemoglobina e refratometria plasmática e proteica. A contagem dos eritrócitos, leucócitos e das plaquetas, além da semi-automação, foram também submetidas a contagens manuais por médica veterinária clínico-laboratorial.

As lâminas hematológicas foram preparadas pelo mesmo laboratório de análise clínica veterinária, através da técnica de esfregaço e coloração panótico rápida, foram ainda visualizadas e processadas em um sistema de software e microscópio-escâner óptico (Pannoramic Desk, 3D Histech, Budapeste, Hungria).

3.3. Modelo matemático – ozônio-sangue

Neste trabalho foi utilizado um modelo matemático proposto por Farooq e Ahmed (1989). Este modelo numérico descreve a cinética da transferência de massa e compreende a aplicação do ozônio em um sistema aquoso o qual é descrito pela Equação 1. O primeiro termo da equação explicita basicamente a injeção líquido-ozônio no sistema expressando o processo da troca gasosa (transferência de massa). O segundo termo explicita a decomposição do ozônio no processo em questão, e por último o terceiro termo expressa a reatividade do ozônio.

$$g_{in} = \left[\frac{Q\,H\,G}{1231\ k_{La}\,V} + Q + \frac{H\,G}{1231}\right] C_L + \left[\frac{K1\,H\,G}{1231\ k_{La}} + K_1\,V\right] C_L^n + \left[\frac{K_2\,H\,G}{1231\ k_{La}} + K_2\,V\right] C_L^p\,S^m \quad (1)$$

Onde, C_L = concentração de ozônio na fase líquida (mg/L); g_{in} = taxa de fornecimento do ozônio (mg/min); G = taxa do fluxo de gás (L/min); H = constante de Henry (atm/mol fração); k_{La} = coeficiente de transferência de massa na fase líquida (min^{-1}); k_1 = taxa constante da decomposição do ozônio (min^{-1}); k_2 = taxa constante de reação do ozônio ($L/mg^{1/2}\ min^{-1}$); n, p, m = ordem das reações; S = concentração remanescente de matéria orgânica (COD) (mg/L); Q = taxa do fluxo do líquido (L/min) e V = volume do reator (L).

O modelo apresentado foi ajustado de modo a compreender uma representação numérica comportamental do aparato experimental realizado, levando-se em conta principalmente o sistema circulante de sangue ozonizado em um volume específico, através de um sistema fechado e com a injeção direta do ozônio através do venturi.

O modelo proposto presume ainda que a mistura gasosa de ozônio obedece a lei geral de um gás ideal. O volume de sangue utilizado no modelo diz respeito a uma condição discreta de constituintes do sangue total, agrupados, e assumindo que inicialmente o seu comportamento é uniforme. Levando-se ainda em conta que o modelo compreende um volume discreto de sangue *in vitro*, as reações específicas

presentes em uma condição de biofluxo sanguíneo foram consideradas em equilíbrio, negligenciando, por exemplo, os efeitos da temperatura e da inércia biofísica corporal.

Para que esse modelo possa simular uma situação real de escoamento bifásico (gás-fluido), foi necessário utilizar parâmetros capazes de mimetizar essa condição. O presente modelo foi concebido utilizando como fluido o sangue e como gás, o ozônio, cujos dados podem ser observados abaixo na Tabela 3. Parte dessas grandezes utilizadas no modelamento estão baseadas no modelo de equação desenvolvido previamente por Farooq & Ahmed, sendo que os dados do experimento (exper.) realizado para o modelo ozônio-sangue estão também presentes na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros utilizados no modelo matemático.

Grandeza	**Unidade**	**Valor**	**Referência**
C_L = concentração de ozônio na fase líquida	mg/L	-	exper.
g_{in} = taxa de fornecimento do ozônio	mg/min	33 e 62	exper.
G = taxa do fluxo de gás	L/min	0,125	exper.
H = constante de Henry	atm/mol fração	3188	(Sheffer e Esterson, 1982)
k_{La} = coeficiente de transferência de massa na fase líquida	min^{-1}	0,09	exper.
k_1 = taxa constante da decomposição do ozônio	min^{-1}	0 –1 (0,09)	exper.
k_2 = taxa constante da reação do ozônio	$L/mg^{1/2}\ min^{-1}$	0 – 1 (0,09)	exper.
n = ordem das reações	-	0,99	(Farooq e Ahmed, 1989)
m = ordem das reações	-	0,53	(Farooq e Ahmed, 1989)
p = ordem das reações	-	1,07	(Farooq e Ahmed, 1989)
Q = taxa do fluxo do líquido	L/min	0,09	exper.
V = volume do reator	L	0,075	exper.
S = concentração de matéria orgânica (COD)	mg/L	1	exper.

Na tabela 3 o valor de C_L será o objetivo da equação matemática modelada, dizendo respeito ao valor de concentração de ozônio no sangue; g_{in} compreenderá os valores de concentração de ozônio fornecidos pelo gerador, baseado no protocolo anteriormente apresentado da ozonização do sangue; G a constante do fluxo de gás do cilindro de oxigênio que alimenta a linha no gerador de ozônio; H a constante de Henry referenciada pelos autores que desenvolveram esse modelo anteriormente; Q a constante de fluxo do sangue também utilizada no protocolo experimental; V a condição do volume de sangue quando ozonizado, e, S representa a concentração de porção orgânica no sangue. As variáveis desconhecidas k_{LA}, k_1, k_2, n, p e m foram determinadas por Farooq e Ahmed (1989), através de um programa computacional, resolvendo a equação não-linear apresentada pelos autores. Será determinado o valor de C_L mediante variação de 0 a 1 em k_1 e k_2, taxa de decomposição e reação do ozônio, respectivamente, além dos valores referenciados na Tabela 3.

Tendo em vista que o plasma constitui aproximadamente 55 % do volume de sangue, e este é constituido com 90 % de água, e ainda com uma parte de íons inorgânicos que correspondem apenas a 0,9 % de sua composição (Motrescu *et al*., 2006), decidiu-se portanto utilizar o modelo em questão, já que nessa relação a porção de matéria orgânica intrínseca na equação pode corresponder ao agente anterior (água) e no caso, sangue, apesar da proposta final ser diferente no que diz respeito a presença ou não dessa matéria orgânica, o que matematicamente na equação será influenciada pelas ordens de reação. Com relação a ordem de reação que possui mais influência na porção de matéria de sangue, definida por m, essa influência diz respeito no sangue a intenção de manutenção de sua porção frente ao ozônio dissolvido no mesmo.

De posse dos dados acima, diferentes configurações serão testadas de modo a obter a concentração residual do gás ozônio no sangue, e ainda será determinado o seu tipo de regime de escoamento (coeficiente de Reynolds) de maneira isotrópica. A Equação 2 expressa o cálculo para o coeficiente de Reynolds, responsável pelo regime de escoamento do sangue:

$$Re = \frac{\mu \upsilon D}{\rho} \quad (2)$$

Onde, Re é o valor do coeficiente de Reynolds (adimensional), μ é a viscosidade dinâmica do fluido (Pa.s), υ é a velocidade média do fluido (m/s), D é o diâmetro do tubo para o fluxo (m) e ρ é a massa/densidade especifica do fluido (kg/m^3).

Onde foram atribuídos: $\mu = 3,5 \times 10^{-3}$ Pa.s (Haldkar, Gupta e Sheorey, 2017); $\upsilon = 1,5$ m/s (experimento); D = 0,04 m (experimento) e $\rho = 1,060 \times 10^3$ kg/m^3 (Haldkar, Gupta e Sheorey, 2017).

Atribuindo que o ozônio ofereça uma interação com o sangue de caráter homogêneo, duas fases estarão presentes: a fase de mistura gasosa (ozônio e oxigênio) e a fase líquida (sangue). Assim sendo, o ozônio necessita ser transferido da fase gasosa para a fase líquida, sendo principalmente dependente da transferência de massa, sendo esta uma das etapas principais no controle do processo. Acredita-se que a transferência de massa do ozônio para o sangue baseia-se em processos heterogêneos, pois dar-se-á na interface entre a fase gás-líquido. Inicialmente ocorre a dispersão das pequenas bolhas de ozônio na fase líquida e em seguida o ozônio é incorporado à massa líquida através da interface entre as fases, gerando assim o valor da concentração do gás na fase líquida.

4. RESULTADOS

4.1. Eficácia na transferência de massa

Para cada um dos experimentos (Venturi e Difusor de Bolhas) que quantificava a eficácia na transferência de massa foi utilizado para a apresentação gráfica a média das seis medições realizadas. O período de análise em cada medição foi de 20 minutos, sendo coletado o dado numérico referente ao valor da concentração de ozônio continuamente ao longo do tempo através do medidor da concentração de ozônio na água (mg/L).

Os resultados obtidos com o venturi mostram um crescimento exponencial da concentração do ozônio até atingir 0,5 mg/L no tempo de 5 minutos, à partir daí o crescimento se dá de maneira linear atingindo 0,87 mg/L no tempo de 20 minutos. Os resultados com o difusor de bolhas apresentaram menor eficácia na transferência de massa, e, de maneira similar ao anterior, o aumento da concentração pode ser dividido em duas fases, a primeira com perfil exponencial até atingir 0,12 mg/L no tempo de 2,5 minutos, e, a segunda com um perfil linear até atingir 0,21 mg/L no tempo de 20 minutos.

As curvas que expressam os resultados obtidos de ambos dispositivos estão apresentadas na Figura 12, através do valor médio das medições. Foi também realizado um ajuste dos pontos experimentais do venturi e do difusor de bolhas, levando-se em conta o valor médio e o desvio padrão das medições, o ajuste utilizado foi o polinomial de segunda ordem, apresentando um coeficiente de determinação com $r^2 = 0,951$ e $r^2 = 0,864$, respectivamente.

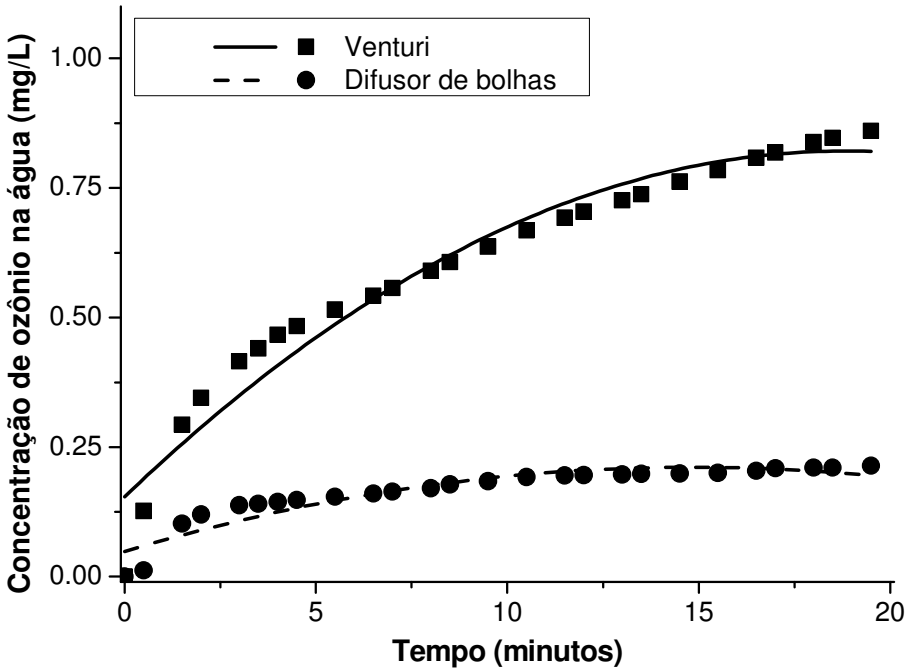

Figura 12. Concentração de ozônio na água (mg/L) ao longo do tempo (min.) utilizando o dispositivo venturi e o difusor de bolhas.

4.2. Protocolos para a ozonização do sangue

Os resultados apresentados nas figuras a seguir refletem o efeito do ozônio no sangue através dos parâmetros hematimétricos nos três protocolos de ozonização propostos.

O coeficiente de determinação (r^2) para os componentes analisados em cada uma das concentrações de ozônio utilizadas, 33 e 62 mg/L, também é apresentado, com vistas a quantificar o ajustamento em relação aos valores observados. Os ajustes baseiam-se na função do decaimento de terceira ordem (ExpDec3) no protocolo "bolsa insuflada com ozônio", e ajuste polinomial de segunda ordem (Poly2) no experimento "frasco sob pressão de ozônio-venturi". O protocolo "bolsa insuflada com ozônio-venturi" por possuir apenas três pontos de análise se mostrou desnecessária a realização de um ajuste comportamental da sua tendência de dados.

4.2.1. Bolsa insuflada com ozônio

Analisando os resultados dos hemogramas obtidos a partir do protocolo 3.2.1., situação de insuflação da bolsa de sangue por ozônio, podemos observar na Figura 13 que este apresentou baixa eficiência no processo de transferência de massa. Isso provavelmente se deu pelo fato de que a diferença de pressão e ineficiente homogeneidade entre o líquido e o gás no interior da bolsa foi pequena, dificultando a transferência. Esse experimento só contempla a fase de ozonização, representada no gráfico por uma cor de fundo ao longo do eixo X, a qual indica também o valor de referência (VR) do hemocomponente representado ao longo do eixo Y.

Durante a insuflação por ozônio da bolsa de sangue, os valores dos eritrócitos (r^2= 0,991 e 0,981), hemoglobina (r^2= 0,988 e 0,746), hematócritos (r^2= 0,755 e 0,940) e das proteínas totais (r^2= 0,418 e 0,725), como apresentados na Figura 13, refletem um comportamento de queda desde o início da ozonização, sendo que em alguns hemocomponentes houve valores situados abaixo do limite inferior de referência (LIR). A população de leucócitos (r^2= 0,361 e 0,646) apresentou uma diminuição no início da ozonização (5 minutos), e após, um ligeiro aumento com uma manutenção dos valores até o último tempo de análise (20 minutos). A contagem de plaquetas (r^2= -1,434 e -1,209) apresentou um comportamento incoerente entre as concentrações de ozônio, com aumentos e diminuição dos valores ao longo do período avaliado.

A análise clínico-laboratorial das amostras evidenciou uma discreta anicositose (diferenciação no tamanho das hemácias) no início da ozonização a 62 mg/L, e no leucograma foi indicado a presença de neutrófilos com hipersegmentação nuclear durante a ozonização a partir do décimo minuto em 33 mg/L e em todo o período na concentração de 62 mg/L, efeito este possivelmente do estresse oxidativo. A morfologia plaquetária das amostras foi avaliada como normal em todas as situações.

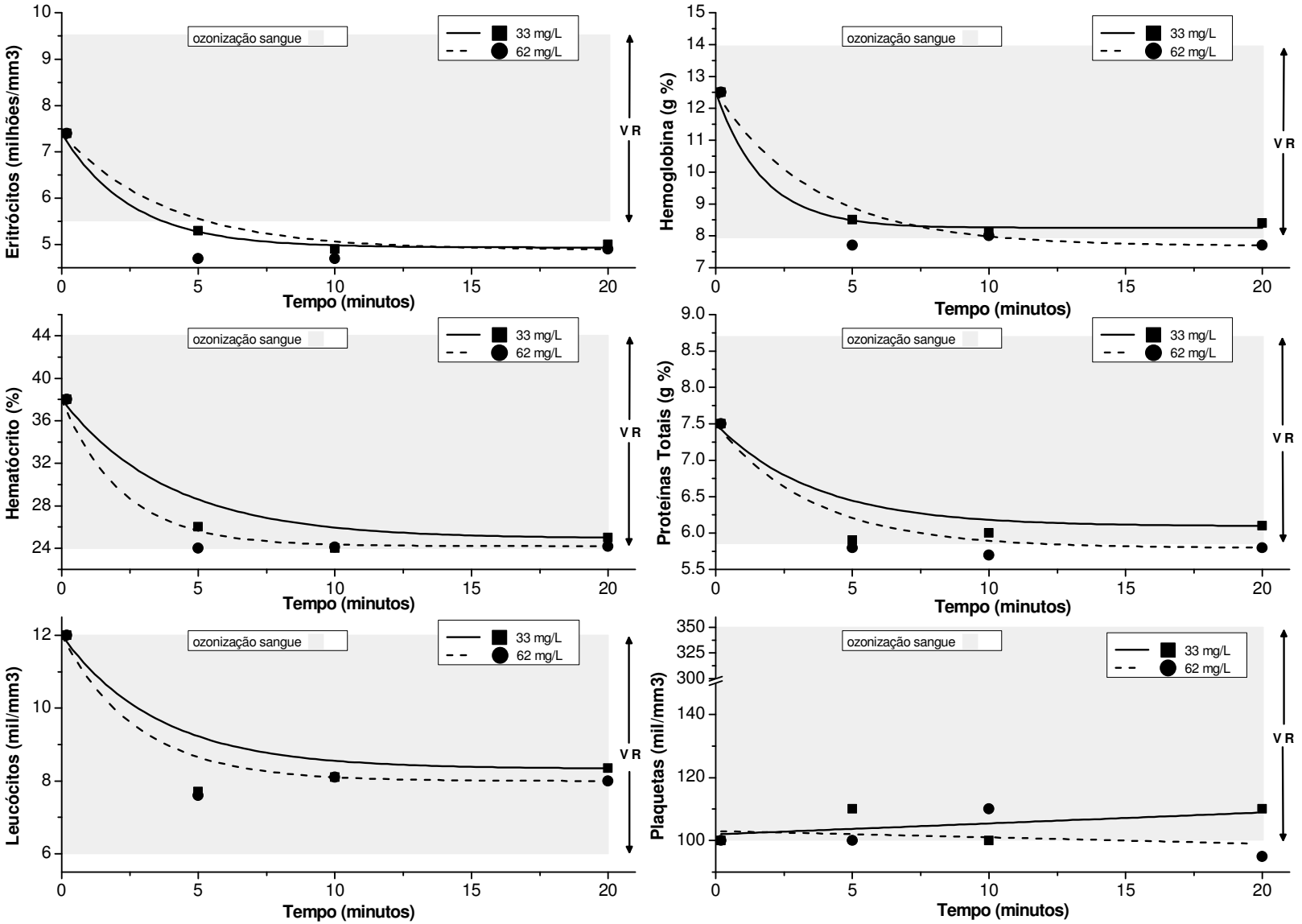

Figura 13. Hemograma do sangue ozonizado por insuflação direta da bolsa nas concentrações de 33 e 62 mg/L.

4.2.1.1. Bolsa insuflada com ozônio-venturi

A Figura 14 apresenta os parâmetros hematológicos do protocolo da bolsa insuflada com ozônio-venturi em um sistema de circulação fechado. Os parâmetros hematológicos estão expressos com o seu valor médio e o desvio padrão.

Pode-se observar que os parâmetros hematológicos se apresentam ligeiramente estáveis ao longo da primeira fase do experimento, ou seja, aquela na qual o sangue está circulando sem a injeção de ozônio. Ao longo da segunda fase do experimento, ou seja, aquela na qual o sangue circulante é ozonizado, pode-se observar que as curvas as quais representam as concentrações de 33 e 62 mg/L apresentam comportamentos distintos. Vale ressaltar que todos os resultados mostrados na Figura 14 se apresentam dentro dos valores de referência (VR) de cada um dos parâmetros hematológicos avaliados, e com concentrações diferentes frente ao valor inicial (controle).

As duas fases do experimento são representadas por duas cores de fundo distintas ao longo do eixo X, as quais indicam também o valor de referência representado ao longo do eixo Y. A análise estatística não apontou significância entre os parâmetros hematimétricos.

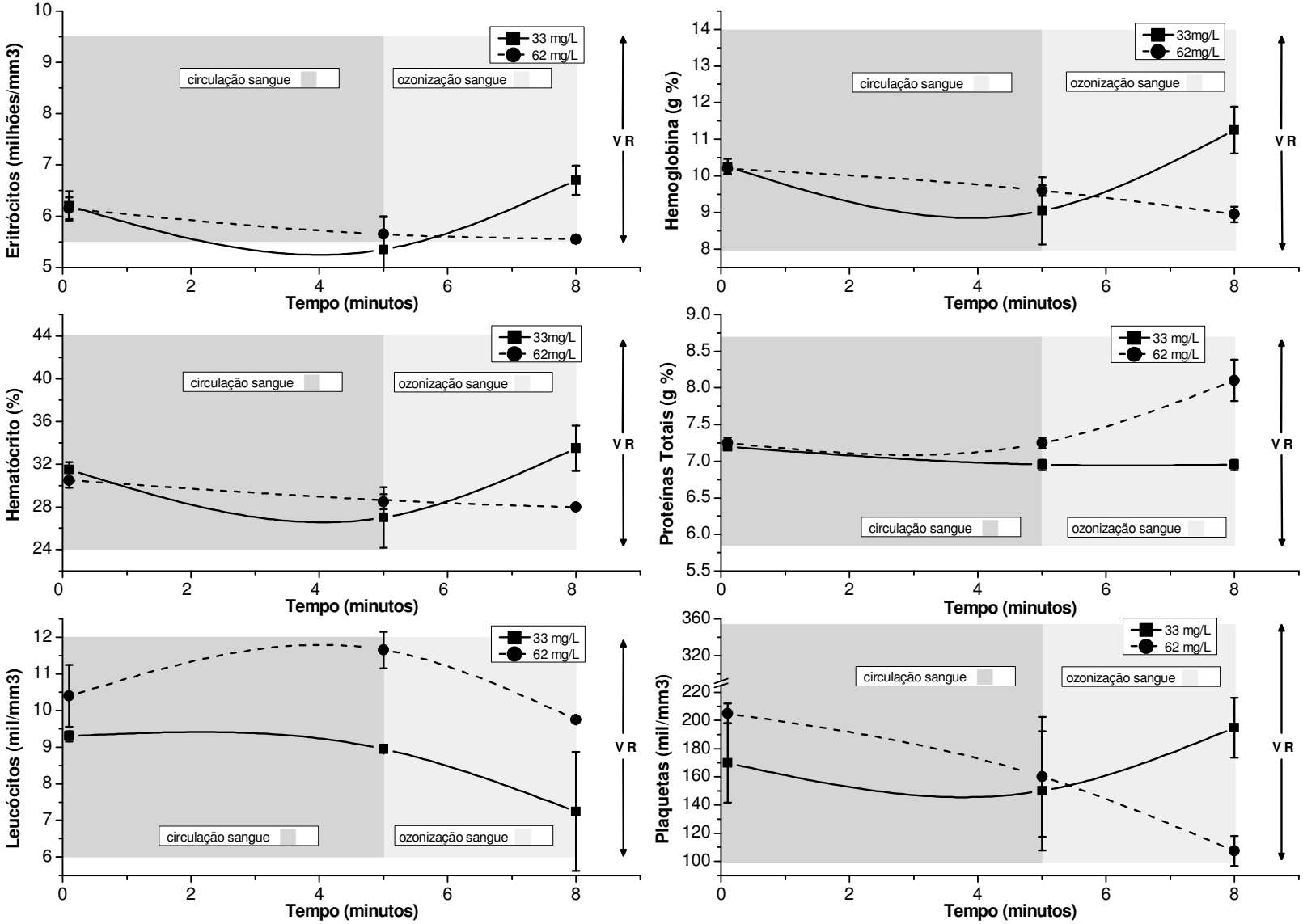

Figura 14. Hemograma do sangue ozonizado em bolsa de coleta utilizando venturi nas concentrações de 33 e 62 mg/L.

4.2.2. Frasco sob pressão de ozônio-venturi

Por último realizou-se a ozonização do sangue em um frasco sob pressão ozônio-venturi, conforme protocolo 3.2.3.. No geral neste protocolo, observa-se certa estabilidade nas concentrações dos hemocomponentes ao longo do tempo de ozonização, não ocorrendo mudanças significativas, se mantendo em geral dentro dos valores mínimos e máximos das variáveis hematológicas consideradas como de referência (VR) e da inicial (controle), conforme apresentados na Figura 15. As duas fases do experimento são novamente representadas por duas cores de fundo distintas.

Os valores dos eritrócitos (r^2= 0,968 e 0,814), hemoglobina (r^2= 0,959 e 0,766) e dos hematócritos (r^2= 0,925 e 0,709) mantiveram-se constantes até os seis minutos de ozonização na concentração de 33 mg/L, e com uma ligeira diminuição no último tempo de análise (12 minutos). Estes mesmos três parâmetros apresentaram ligeira diminuição entre o primeiro e o quarto minuto de ozonização de 62 mg/L, com ligeira diminuição no tempo de doze minutos, mas dentro ainda do VR. As proteínas totais (r^2= 0,989 e 0,389) mantiveram-se praticamente constantes durante todo o período de ozonização. No período, apesar das oscilações na contagem dos leucócitos (r^2= 0,989 e 0,977), é possível visualizar uma tendência a partir da metade do período de ozonização, até uma diminuição ao fim da ozonização, com valores próximos ao início do experimento.

A contagem das plaquetas (r^2= 0,314 e 0,711) com discretas flutuações também evidenciou uma manutenção ao longo da ozonização. A Figura 16 apresenta quatro imagens das lâminas histológicas, sob aumento total de 200x, da amostra referente as coletas do sangue na situação de controle, circulação do fluido e em duas (inicial e final) das três amostras de sangue ozonizado na concentração de 62 mg/L. Na imagem observa-se em todas as situações uma morfologia celular aparentemente normal através da integridade dos eritrócitos, e também a presença dos leucócitos (indicados pelas setas) com os seus núcleos preservados. Essa condição permite considerar que com o protocolo não houve um prejuízo considerável ao sangue com uma provável leve hemólise, o que condiz com os valores comportamentais no hemograma. Também não houve diferença estatística significativa entre as amostras avaliadas.

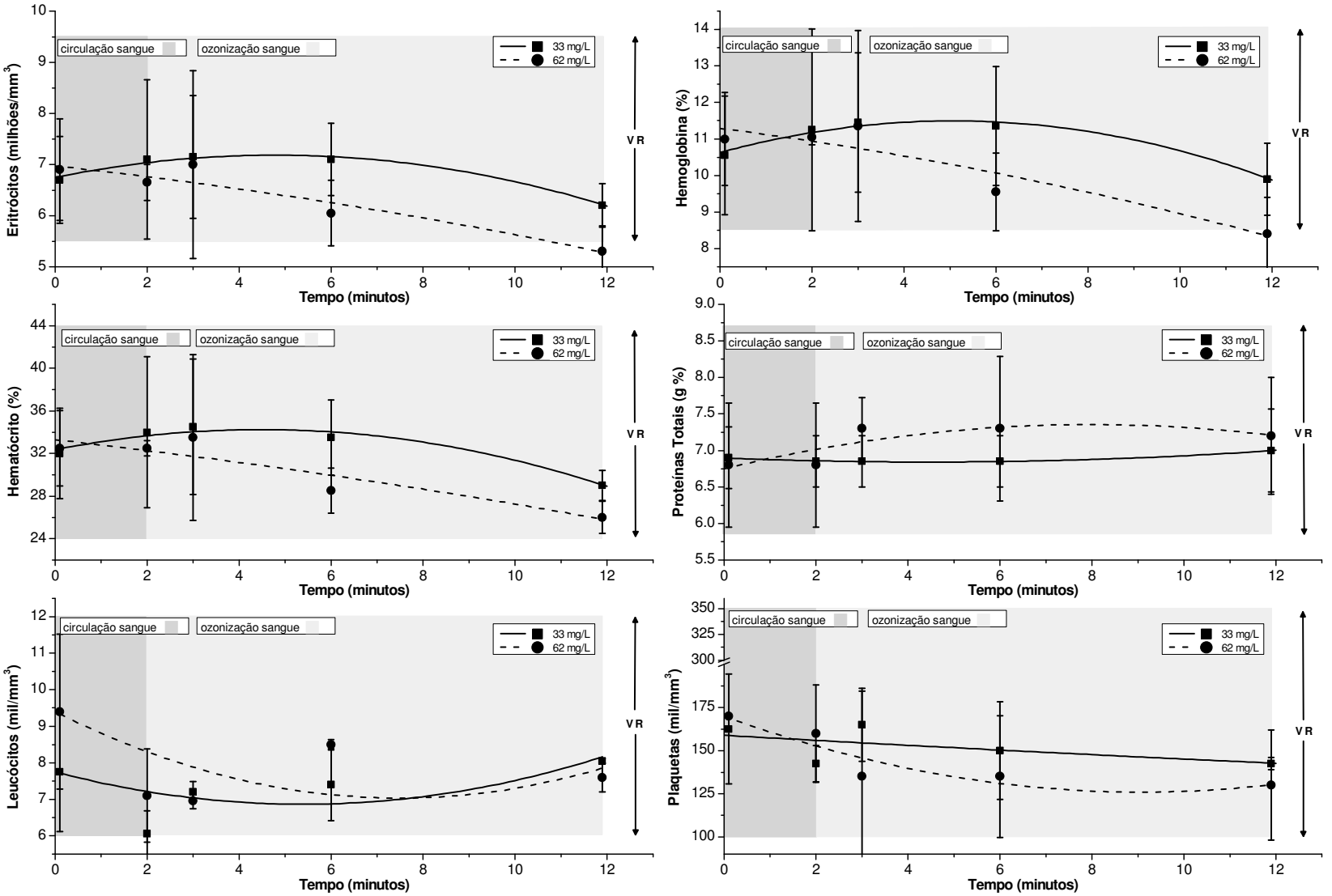

Figura 15. Hemograma do sangue ozonizado em frasco de vidro sob pressão utilizando venturi nas concentrações de 33 e 62 mg/L.

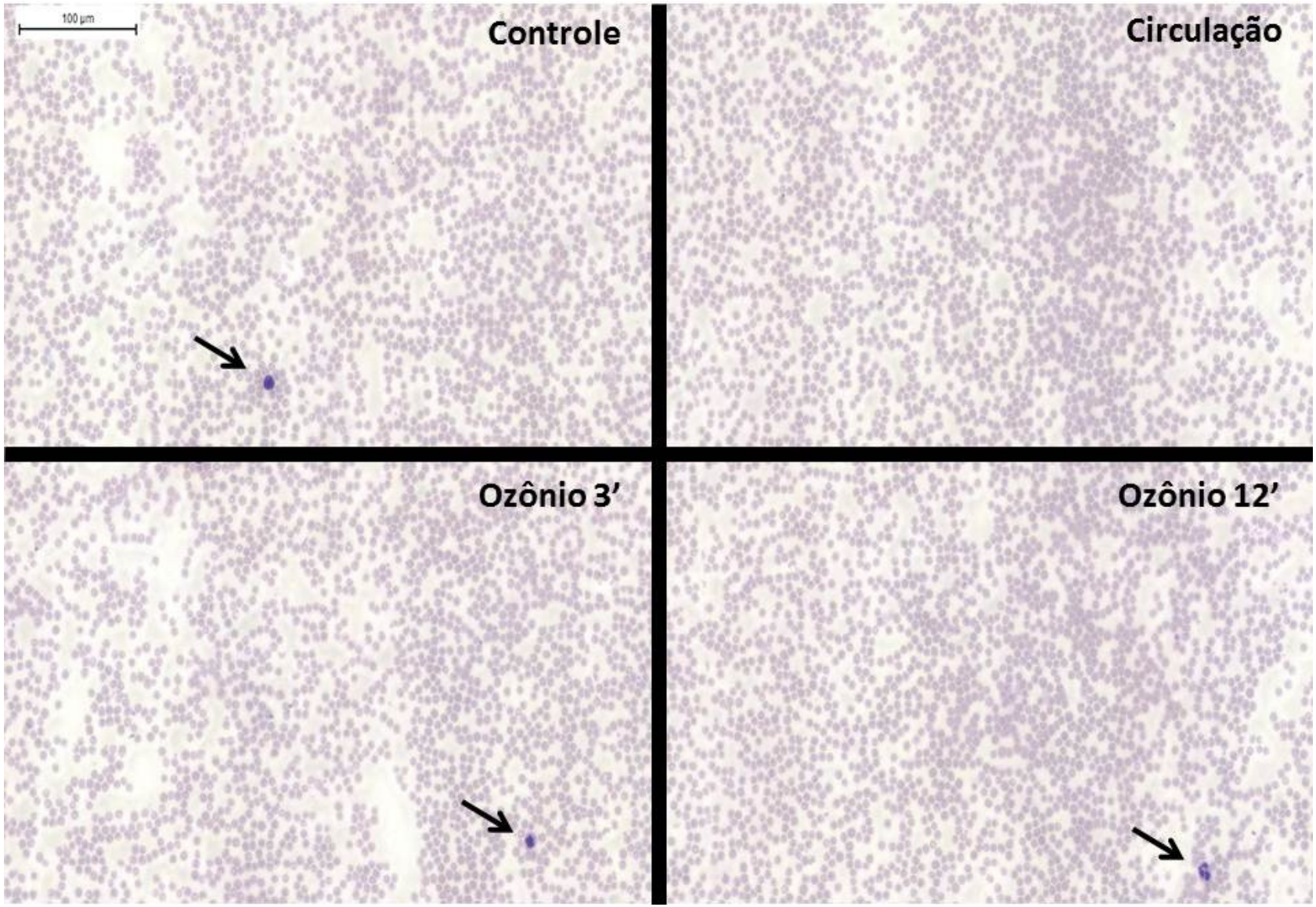

Figura 16. Imagem de microscopia óptica digital, com aumento de 200x, da lâmina hematológica na situação controle, circulação e ozonização (3 e 12 min.).

4.3. Modelo Matemático – ozônio-sangue

O resultado do modelamento matemático para predizer o comportamento do sangue ozonizado é apresentado nas Figuras 17 e 18, onde o ozônio residual no sangue (C_L em mg/L) esta em função da taxa de decomposição (k_1 em min^{-1}) e reação (k_2 em $L/mg^{1/2}$ min^{-1}) do ozônio, respectivamente. Ambos os parâmetros que foram influenciados na equação pelas duas taxa de fornecimento de entrada do ozônio (g_{in}). Esta relação equacionada apresenta um caráter não linear e esta ajustada na função de decaimento de primeira ordem com um coeficiente de determinação de r^2= 0,999 para k_1 e r^2= 0,989 para k_2.

As curvas demonstram um comportamento levando em conta o fornecimento de ozônio (g_{in}) nas concentrações de 33 e 62 mg/L, para estes dois valores comportamentais é estimado o valor da concentração de ozônio residual no sangue (C_L), da ordem de 12,2 e 6,5 mg/L no início da taxas (k_1= 0 e k_2= 0) reduzindo para 7,2 e 4 mg/L para k_1 e 2 e 1 mg/L para k_2 quando essas taxas apresentam o valor de 1 sob as concentração de ozônio na entrada 33 e 62 mg/L respectivamente.

Este equacionamento levou em conta essa reação ozônio-sangue de tal maneira que os valores de Q, G e H permanecem constantes. Em outras palavras, isso revela uma variação de decaimento não linear, do valor de C_L com respeito a decomposição e a reação do ozônio com o sangue dado um ozônio de entrada (g_{in}), o que fica mais notório nas altas concentrações de ozônio residual.

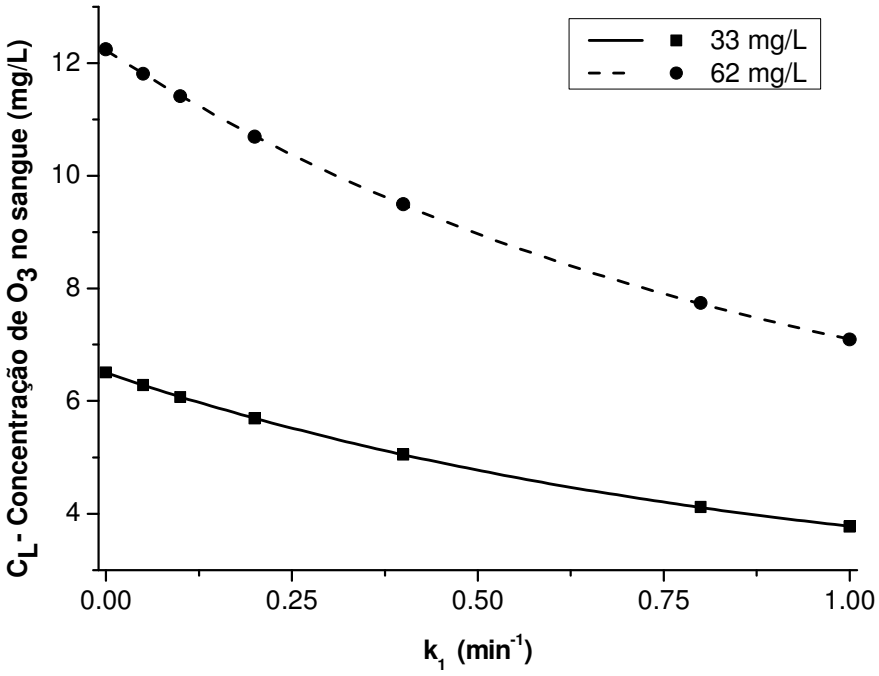

Figura 17. Relação entre a taxa de decomposição do ozônio (k_1) e a concentração de ozônio no sangue (C_L) mediante uma concentração de ozônio fornecida (g_{in}).

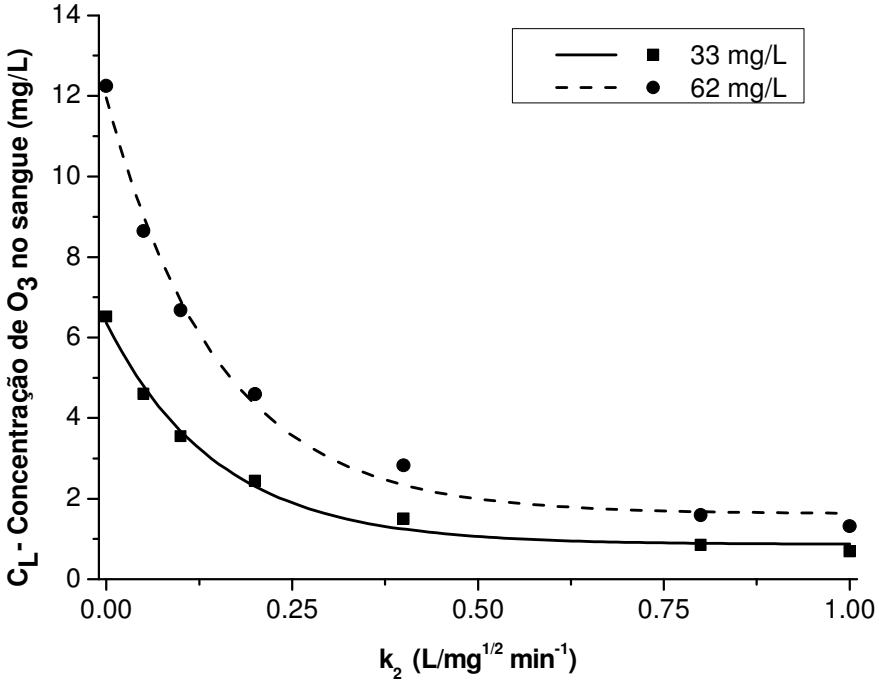

Figura 18. Relação entre a taxa de reação do ozônio (k_2) e a concentração de ozônio no sangue (C_L) mediante uma concentração de ozônio fornecida (g_{in}).

5. DISCUSSÃO

5.1. Eficácia na transferência de massa

A transferência de massa do ozônio em água é um evento complexo, em parte devido a natureza altamente reativa do ozônio, e ainda pela sua solubilidade em água não ser predita apenas pela Lei de Henry (Biń, 2006), além destes, essa transferência de massa pode sofrer influência de diversos outros fatores do meio aquoso (Kishimoto e Nakamura, 2011).

A ozonização do meio líquido realizada pelo venturi se dá a partir de uma mistura turbulenta gás-líquido no interior deste, possibilitando uma transferência de massa mais eficiente, uma vez que a cinética é favorecida pelo processo hidrodinâmico em questão. Com o auxílio da câmara de injeção do gás um vácuo parcial é criado, aspirando o ozônio em fluxo oriundo do gerador, que, ao se chocar com a água circulante gera um fluxo com característica de alta turbulência no escoamento do fluido aquoso. Além disso, a geometria característica do dispositivo venturi induz um considerável aumento da velocidade de fluxo do líquido, que associado ao escoamento de regime turbulento, promove uma maior transferência de massa entre as fases gás-líquido.

Os resultados do presente trabalho evidenciaram que a eficácia da transferência de massa realizada pelo venturi é da ordem de seis vezes superior ao difusor de bolhas em aço inox. Este resultado é corroborado pelos trabalhos de Du, Lin e Zuercher (2012) (Du, Lin e Zuercher, 2012) e Schulz & Bellamy (2000) (Schulz e Bellamy, 2000), que mostraram que o dispositivo venturi apresenta uma transferência de massa nove vezes maior se comparado aos difusores de bolhas convencionais.

Os resultados deste trabalho deverão realimentar os protocolos de transferência de massa ozônio-sangue a serem propostos, visando futuras aplicações destes protocolos na área da saúde.

5.2. Protocolos para a ozonização do sangue

Na atualidade não existe um consenso geral sobre os efeitos biológicos e os possíveis danos induzidos pelo ozônio no sangue. Os estudos são limitados em número e muitas vezes controversos (Aydogan e Artis, 2012). Sabe-se que o ozônio, sob certas concentrações, quando é dissolvido no sangue desencadeia uma complexa cascata de eventos bioquímicos que agirão em múltiplos alvos, sendo, portanto necessário estabelecer técnicas para assegurar uma eficiente transferência de massa gás-fluido, visando obter um procedimento terapêutico eficaz.

As concentrações fornecidas pelo gerador de ozônio que foram utilizadas nos protocolos para a ozonização do sangue neste trabalho, de 33 mg/L e 62 mg/L, foram escolhidas por estarem localizadas na janela terapêutica da ozonioterapia, definida no amplo trabalho de revisão conduzido por Bocci *et al*. (2011).

A discreta diminuição na concentração de alguns componentes no sangue durante a ozonização, tais como, eritrócitos, hemoglobina e hematócritos, demonstra uma possível característica de dose-dependência. O efeito de dose-dependência foi descrito por Bocci (1994), Valacchi & Bocci (1999), em humanos, Deaton *et al.* (2005), Haddad *et al.* (2009a), em equinos, Plopper *et al*. (1994), Wright *et al.* (1994), em ratos e porquinhos da índia, respectivamente, que definiram a resposta em função da dose e do tempo de exposição do organismo biológico à mistura gasosa. Travagli *et al.* (2007) apresentaram um esquema exemplificando a sequência de eventos que ocorre quando o ozônio é dissolvido continuamente na água do plasma sanguíneo até que o ozônio esteja esgotado. Esses eventos estão baseados principalmente na oxidação dos antioxidantes hidrofílicos, e em função do conteúdo dos lipoperóxidos aumentarem em relação a dose do ozônio (efeito de dose-dependência).

Nos protocolos utilizando sangue equino o fluido sanguíneo foi coletado e disposto em bolsas de coleta e posteriormente também em um frasco de vidro. A proposta de ozonização do sangue tanto diretamente na bolsa de coleta como através de um dispositivo venturi teve origem no estudo de trabalhos científicos realizados anteriormente e na comparação da eficiência na transferência de massa do venturi frente

a um difusor tradicional. Nestes experimentos a ozonização foi realizada utilizando o sangue total, pois, segundo Bocci (2006b) e Travagli *et al*. (2007), nesta condição o sangue preserva os elementos antioxidantes naturais do plasma, uma vez que não é submetido à lavagem em solução salina ou qualquer separação físico-química dos seus compostos.

5.2.1. Compatibilidade dos materiais ao ozônio

A realização dos experimentos com gás ozônio exige que os materiais utilizados sejam quimicamente inertes quando na presença deste gás. Os efeitos da exposição dos materiais poliméricos ao ozônio é extensamente investigada (Ozen, Mauer e Floros, 2002), como no trabalho de Luqueta *et al.* (2017) que avaliando diversas propriedades das embalagens para dispositivos médicos que eram expostas ao ozônio evidenciaram que esse gás é compatível com diferentes compostos tais como o PVC, o PVDF entre outros.

Em cada um dos experimentos realizados para a transferência de massa ozônio-sangue foi utilizado um desenho experimental e materiais específicos em função do protocolo utilizado. No experimento "bolsa insuflada com ozônio", o gás fornecido diretamente do gerador foi introduzido na bolsa contendo sangue. Neste caso foram utilizados apenas a bolsa que era constituída de PVC atóxico plastificado com o ftalato de di-(2-etilexila) (DEHP) e as mangueiras de silicone, ambos os polímeros resistentes ao ozônio (MEDIZONE, 2016). É importante destacar que apesar de alguns autores não recomendarem a ozonização da bolsa para coleta de sangue, alegando que o ozônio ao reagir com o ftalato pode gerar subprodutos indesejáveis ao paciente receptor do sangue (Bocci, 2011), a aplicação é coerente quando de caráter *in vitro*, com vistas a avaliar a eficiência da transferência de massa no sangue, um dos objetivos desta tese.

No experimento "bolsa insuflada com ozônio-venturi", o gás fornecido pelo gerador foi introduzido em um venturi com a função de misturar o ozônio ao sangue e posteriormente injetar a mistura na bolsa de coleta com o auxílio de uma bomba centrífuga em um circuito fechado. Neste caso, além do polímero da bolsa e das

mangueiras de silicone, foi necessário verificar a estabilidade do polímero do venturi e da bomba. Ao se especificar o venturi levou se em conta os materiais que os fabricantes normalmente utilizam para este fim, no presente caso, optou-se por um dispositivo fabricado em PVDF que garante sua resistência química frente ao ozônio. No caso da bomba centrífuga o seu corpo é fabricado em PVC, que possui boa compatibilidade.

No experimento "frasco sob pressão de ozônio-venturi", o gás fornecido pelo gerador foi introduzido em um venturi com a função de misturar o ozônio ao sangue e posteriormente injetar a mistura em um frasco de vidro com o auxílio de uma bomba centrífuga. Neste caso tanto o frasco de vidro quanto a sua tampa em aço inox garantem sua resistência química quando em contato com o ozônio, permitindo também a sua esterilização em um auto-clave. As mangueiras de silicone, o dispositivo venturi e a bomba centrífuga utilizadas são análogas ao caso anterior.

5.2.2. Transferência de massa ozônio-sangue

A maneira de realizar a transferência de massa entre o ozônio-sangue é extremamente vital para induzir eventos biológicos no fluido, um exemplo desta influência são os protocolos do trabalho de Anitua *et al.* (2015), na qual amostras do plasma rico em plaquetas foram expostas ao ozônio através de dois métodos, sob um fluxo contínuo do gás, e sob uma simples homogeneização na seringa (comumente realizada nas práticas de auto-hemoterapia), sendo que no fluxo contínuo do gás houve inibição da ativação plaquetária, dificultando a formação de fibrina e a liberação dos fatores de crescimento, fenômeno esse que não ocorreu no plasma quando um volume do fluido era apenas homogeneizado na seringa frente a um mesmo volume de ozônio.

Os autores Baieth & Elashmawi (2012) injetaram um volume de ozônio no interior das bolsas de sangue para doação, visando avaliar o efeito nas propriedades elétricas e reológicas do sangue ao longo do tempo. Após a ozonização da bolsa, contendo cerca de 500 mL de sangue, foi retirada para realização de hemograma uma amostra no mesmo dia da ozonização e ainda uma amostra semanal, durante três semanas. As análises revelaram uma diminuição nos valores de hemoglobina, e um

aumento nos valores dos hematócritos. Essas alterações apresentadas pelos autores em relação às duas das quatro concentrações utilizadas pelos mesmos (30 μg/mL e 70 μg/mL - próximas das utilizadas em nossos protocolos: 33 e 62 mg/L) também é observado nos experimentos "bolsa insuflada com ozônio", e, "bolsa insuflada com ozônio-venturi" que foram conduzidos. Os autores também observaram um aumento na condutividade elétrica e na redução da rigidez dielétrica do sangue com o aumento da concentração de ozônio (dose-dependência).

Ferraz *et al.* (2003) conduziram um trabalho que também consiste na ozonização das bolsas contendo concentrado de hemácias, visando ainda avaliar a desinfecção do sangue contaminado com uma população bacteriana. Os resultados revelaram uma ligeira manutenção dos valores de hemoglobina e hematócrito, com ausência de hemólise nas amostras frente ao limite estabelecido como máximo aceitável por padrões internacionais. Foi constatado também um poder desinfectante do ozônio no sangue ao longo de exposição as bactérias inoculadas.

As configurações experimentais realizadas nesta tese estão baseadas também em processos de homogeneização, no primeiro caso a homogeneização na bolsa era em função do balanço gerado pelo sistema mecânico, balanço este que ocorria durante a injeção do ozônio no interior da bolsa e nos períodos de análise em que a bolsa estava insuflada. No experimento "frasco sob pressão de ozônio-venturi", o sangue era homogeneizado mediante a ação contínua da bomba centrífuga.

Nos protocolos de ozonização do sangue utilizando venturi a transferência de massa se dá quando o gás se choca com o sangue no interior deste produzindo milhares de microbolhas. A dinâmica envolvida na formação das bolhas de gás no sangue foi registrado continuamente em vídeo evidenciando a interação gás-líquido, principalmente em função do deslocamento das bolhas no interior do recipiente em que o fluido circulava em um circuito fechado.

Na Figura 19 observa-se a esquerda, com ênfase das setas, que no frasco de vidro o sangue ozonizado apresentava milhares de microbolhas ozônio-sangue, e este conjunto de bolhas oferece uma considerável área superficial disponível para a interação gás-líquido durante o processo de ozonização. Esse fenômeno de geração das

microbolhas pelo venturi, e a relativa manutenção destas no interior do frasco era crescente ao longo do período de ozonização, e apesar dessa velocidade ascensional das bolhas no volume do fluido, a pressão intra-sistema no frasco, apesar do valor desconhecido, auxiliava na quebra de algumas bolhas, realimentando internamente assim o processo ao longo do tempo em que o sangue era ozonizado. Já na direita da figura abaixo, na configuração de insuflação da bolsa de sangue, é observado que no interior da bolsa o sangue apresenta apenas a sua região de superfície exposta ao ozônio (apontado pela seta), o que notoriamente leva a uma menor taxa de transporte do ozônio da fase gasosa para a fase líquida do que com a grande presença das bolhas no caso do frasco.

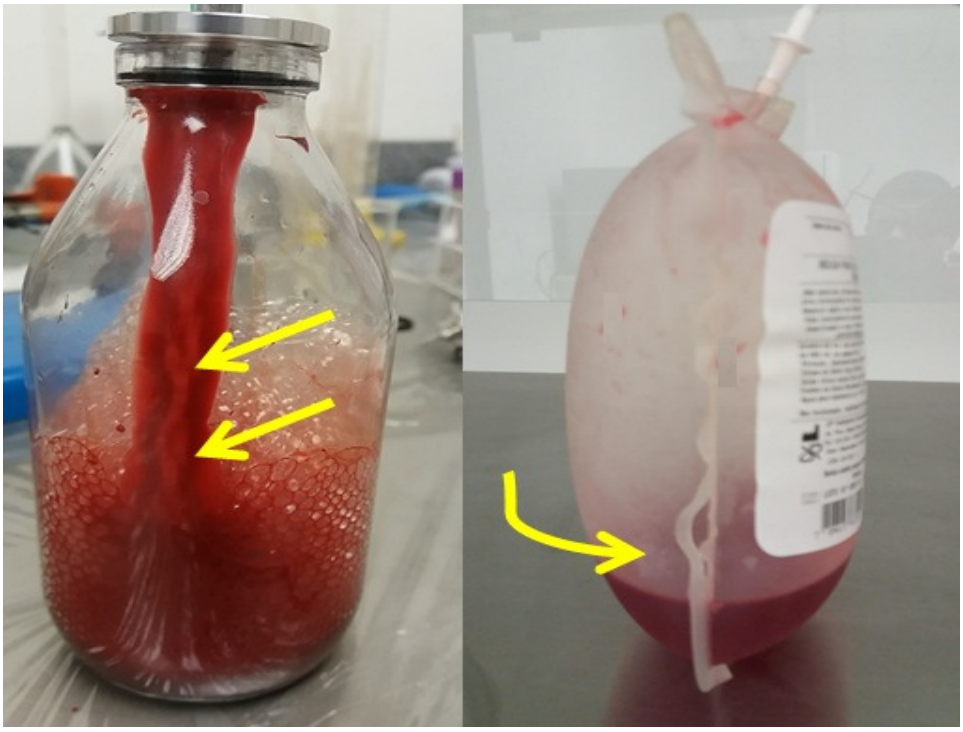

Figura 19. Área do sangue exposta as bolhas de ozônio no frasco de vidro e na bolsa de coleta.
Fonte: arquivo pessoal.

5.2.3. Bombeamento do sangue e possíveis alterações reo-hematológicas

A utilização das bombas centrífugas para a circulação sanguínea vem sendo relatada em trabalhos científicos a partir das três últimas décadas (Miller, Etter e Dorsi,

1990; Pederson e Karlsen, 1998), mas ainda hoje suas aplicações se estendem principalmente ao caráter laboratorial (Leme *et al.*, 2011; Uebelhart *et al.*, 2013), apesar de alguns poucos modelos comerciais já estarem disponíveis no mercado.

As bombas centrífugas utilizadas para o bombeamento de sangue são normalmente de dois tipos, cone ou impelidor, sendo esta última à utilizada em nossos protocolos pelo fato de apresentar menor risco de hemólise (Kawahito & Nosé, 1997). O modelo de bomba centrífuga utilizada neste trabalho apresenta em sua operação um vortex forçado, sendo que em ação, o sangue é admitido no interior da bomba através do movimento criado pela rotação de uma série de aletas giratórias de superfície lisa, essa energia é transferida para o sangue na forma de pressão e velocidade enquanto o sangue é acelerado suavemente em direção à saída da bomba.

Nos protocolos que utilizamos a bomba centrífuga, os valores utilizados para o cálculo do coeficiente de Reynolds (Re) indicaram que esta promovia um fluxo laminar ($Re < 2000$), e por meio da força centrífuga gerada e de sua baixa rotação interna o sangue era impulsionado por mini-aletas produzindo o fluxo sanguíneo a ser ozonizado no sistema. A alimentação elétrica da bomba centrífuga foi mantida estabilizada durante o experimento visando a estabilidade do processo, tendo em vista relatos de autores que a transferência de massa pode sofrer alterações em função das mudanças de velocidade no impelidor (Takic *et al.*, 2007), e tendo em vista também que o tempo de vida das bolhas diminui com um aumento da taxa de fluxo do fluido (Yang *et al*., 1971b), já que buscava-se que as bolhas permanecessem o maior tempo possível no fluido sanguíneo para aumentar a eficiência da transferência de massa.

Vale ressaltar também que quando a bomba opera em alta rotação e com variações em sua rotação, possivelmente elevar-se-ia o risco de danos aos hemocomponentes (Tayama *et al*., 1997), assim, em nossos protocolos onde apenas uma rotação mínima de operação da bomba foi executada, uma hemólise macroscópica não foi encontrada, e acreditamos que o seu fenômeno não foi consideravelmente manifestado em razão da relativa estabilidade na concentração dos hemocomponentes nos períodos de circulação analisados nos protocolos.

Um dos aspectos relevantes o qual exige mais estudos é a capacidade do protocolo adotado gerar danos aos hemocomponentes durante o processo de transferência de massa, uma vez que a circulação do sangue exige a utilização de diferentes dispositivos submetendo o sangue à variação de pressão, temperatura e a possíveis diferentes regimes de escoamentos. A segurança para a utilização destes dispositivos deverá ser ainda realizada através de diversos testes de provas e ensaios de confiabilidade visando ainda aplicá-los as pesquisas em modelos animais.

5.2.4. Efeito do ozônio na concentração dos hemocomponentes

A seguir são discutidos pontualmente os efeitos do ozônio em cada hemocomponente que analisado nos hemogramas, e ainda alguns dos efeitos do ozônio nestes através dos relatos em trabalhos de terceiros, trabalhos estes em geral com modelos *in vivo*.

- Eritrócitos

Os valores médios da concentração de eritrócitos (milhões/mm^3) mantiveram-se no protocolo "bolsa insuflada com ozônio" constantes ao longo do período de ozonização, mas abaixo do limite inferior de referência, inclusive menores que o controle. No protocolo "bolsa insuflada com ozônio-venturi" houve relativa manutenção ao longo da circulação e nos minutos de ozonização. No protocolo "frasco sob pressão de ozônio-venturi" as concentrações se mostraram similares durante todo o período analisado, com discreta diminuição de 0,5 milhão/mm^3 apenas ao fim do processo de ozonização do sangue aos 12 minutos. Uma possível diminuição da concentração deste componente pode indicar uma baixa porcentagem de hemólise (Bocci, 2004), em resposta ao estresse oxidativo da membrana celular dos eritrócitos (Sentürk *et al.*, 2001) porém não de maneira intensa, uma vez que este efeito em modelos *in vivo* é transitório e seletivo (Verrazzo *et al.*, 1995; Zimran *et al.*, 2000).

Zimran *et al*. (2000) submetendo o sangue a ozonização (30 mg/L) também não encontraram danos nas células vermelhas ou intermediárias, sendo ainda que este estudo apontou uma mínima hemólise (2 %) nas amostras ozonizadas, os autores sustentaram que essa ligeira hemólise não é diferente da encontrada no armazenamento de rotina das bolsas para transfusão sanguínea. Beck, Wasser e Viebahn-Hänsler (1989) sustentam que com 100 µg de ozônio no sangue há um risco da ordem de 10 % de ocorrer o fenômeno de hemólise, concentração esta muito superior a utilizada em nossos protocolos.

Haddad *et al.* (2009a) evidenciaram uma tendência geral de aumento dos valores médios na concentração deste parâmetro nos protocolos de ozônio auto-hemoterapia em equinos durante 27 dias. Bayer & Wasser (1996) não encontraram deformidades nas células vermelhas ozonizadas. Cardile *et al*. (1995) evidenciaram que os efeitos tóxicos do ozônio nas hemácias *in vitro* acontecem a partir de 20 mg/L, sem alterações quantitativas.

Ainda sobre este hemocomponente, um marcador para acompanhar o efeito na peroxidação lipídica causada no sangue pelo ozônio, pode ser através do aumento da produção de 2,3-difosfoglicerato nos eritrócitos (Bocci *et al.*, 1998), como também é possível acompanhar através da ativação da glicólise e do significante aumento de ATP (adenosina trifosfato) celular (Bocci, Zanardi e Travagli, 2011a; Bocci *et al.*, 2014).

- Hemoglobina e Hematócritos

Os valores médios da concentração de hemoglobina (%) e hematócritos (%) mantiveram-se no protocolo “bolsa insuflada com ozônio” relativamente constantes ao longo do período de ozonização, mas novamente abaixo do limite inferior de referência, inclusive frente ao controle. No protocolo “bolsa insuflada com ozônio-venturi” houve relativa manutenção ao longo da circulação do sangue e com um ligeiro aumento nos três minutos de ozonização. No protocolo “frasco sob pressão de ozônio-venturi” as concentrações se mostraram similarmente estabilizadas durante todo o período analisado, com discreta diminuição da ordem de 15% apenas ao fim do processo de ozonização do sangue aos 12 minutos, independentemente das duas concentrações de

ozônio utilizadas (33 e 62 mg/L). Esta estabilidade também é evidenciada por Travagli, Zanardi e Bocci (2006). Moreira (2015) os quais também não observaram alterações significativas na hemoglobina em cães submetidos a auto-hemoterapia menor ozonizada. Essa mesma condição foi também relatada por López (2007) em equinos.

Este comportamento concorda com os relatos de Bocci (2004) que não encontrou alterações na concentração dos hematócritos em diferentes trabalhos realizados em humanos submetidos a auto-hemo transfusão de ozônio. Verrazzo *et al.* (1995) e Giunta *et al*. (2001) também realizando a auto-hemo transfusão em humanos não encontraram alterações nos valores dos hematócritos, apesar de terem observado algumas alterações em outros parâmetros hemoreológicos relacionados. Ferraz *et al.* (2003) ozonizando bolsas de sangue também revelaram uma ligeira manutenção nas concentrações de hemoglobina e dos hematócritos.

Ballardini (2006) realizou a auto-hemoterapia maior em cavalos e observou apenas um ligeiro aumento (5 %) nos valores dos hematócritos, com manutenção dos valores da hemoglobina. Baieth & Elashmawi (2012) encontraram ligeira diminuição nos valores de hemoglobina e ligeiro aumento dos valores dos hematócritos, sem significância, quando um volume de sangue humano foi ozonizado em uma bolsa de coleta.

Essas discretas diminuições nestes hemocomponentes podem estar relacionadas a reação imediata do ozônio sobre as células, que segundo Bocci & Aldinucci (2004) e Stamler *et al*. (1997) leva à liberação de óxido nítrico que interage com a hemoglobina, resultando em S-nitrosohemoglobina com potencial efeito no transporte de oxigênio no fluído. Baseado nesse princípio, Haddad *et al.* (2009a) atribuíram que a auto-hemoterapia maior pode melhorar a distribuição de oxigênio em equinos mediante o incremento da concentração de hemoglobina.

- Proteínas Totais

Os valores médios da concentração das proteínas totais (g %) no protocolo "bolsa insuflada com ozônio" ficaram constantes ao longo do período de ozonização e próximos do limite inferior de referência. No protocolo "bolsa insuflada com ozônio-

venturi" houve manutenção ao longo da circulação do sangue e com um ligeiro aumento ao fim da ozonização apenas na concentração de 62 mg/L, esse ligeiro aumento pode ter relação a uma perda de água do plasma. No protocolo "frasco sob pressão de ozônio-venturi" as concentrações se mostraram estabilizadas durante todo o período analisado.

As principais proteínas do plasma são a albumina, as globulinas e o fibrinogênio, essas proteínas influenciam a viscosidade do sangue e participam na coagulação sanguínea. Acredita-se que a diminuição *in vitro* das proteínas pode ter relação com o efeito oxidativo devido a exposição ao ozônio, induzida também por uma redução nutricional da célula. Nos protocolos de ozonização do sangue realizados no presente trabalho observou-se relativa manutenção dos valores das proteínas totais ao longo do tempo, resultado este corroborado pelo trabalho de Moreira (2015) no qual foi observada somente uma pequena diminuição nos valores de proteína total em cães submetidos a dez sessões de auto-hemoterapia menor, e com dose-dependência.

- Leucócitos

As concentrações médias da população de leucócitos (mil/mm^3) mantiveram-se no protocolo "bolsa insuflada com ozônio" constantes ao longo do período de ozonização e situadas dentro do valor de referência (VR). No protocolo "bolsa insuflada com ozônio-venturi" houve relativa manutenção ao longo da circulação do sangue e com uma ligeira diminuição ao término dos três minutos de ozonização. No protocolo "frasco sob pressão de ozônio-venturi" as concentrações se mostraram similarmente estabilizadas durante todo o período analisado, com discreta diminuição da ordem de 10% durante o processo de ozonização.

Assim como os efeitos nos outros componentes já discutidos os relatos encontrados baseiam-se majoritariamente em estudos *in vivo*. Ohtsuka *et al*. (2006) relataram ausência de variação na população de leucócitos após a auto-hemoterapia de ozônio em bovinos com doenças inflamatórias. Já os autores Terasaki *et al*. (2001) relataram alterações na produção dos leucócitos em bezerros submetidos ao ozônio em auto-hemo administração. Este comportamento também foi encontrado no estudo *in vivo* de Jafari *et al*. (2009), onde ratos submetidos a um programa de exercícios físicos

sob uma exposição controlada de ozônio apresentaram considerável leucocitose. Ballardini (2006) também evidenciou leucocitose em alguns equinos submetidos a auto-hemoterapia maior.

Bocci *et al.* (2014) atribui aos leucócitos sob influência do ozônio o aumento da fagocitose por neutrófilos, e um ligeiro efeito intensificador permanece limitado a esses componentes quando ozonizados. O comportamento na produção de leucócitos após a ozonização merece maior atenção, uma vez que o ozônio pode atuar na liberação das citocinas através destes, melhorando assim a produção de diversas imunoglobulinas e auxiliando na regulação do sistema imune do organismo alvo.

- Plaquetas

As plaquetas tem participação fundamental na coagulação sanguínea, além do que, quando estas sofrem uma ligeira oxidação controlada tendem a liberar fatores de crescimento, fator este de extrema importância para os diversos processos de reparação tecidual.

Nossos resultados evidenciaram discretas flutuações nas contagens das plaquetas (mil/mm^3) durante os períodos de ozonização, mas com significativa manutenção destas ao longo do tempo e ainda apresentando suas concentrações dentro do valor de referência da espécie equina. No protocolo “bolsa insuflada com ozônio” a contagem plaquetária permaneceu relativamente constante ao longo do período de ozonização, com variações de 10 % e situadas próximas do limite inferior de referência. No protocolo “bolsa insuflada com ozônio-venturi” houve relativa manutenção ao longo da circulação do sangue e com uma ligeira diminuição ao término dos três minutos de ozonização para a concentração de 62 mg/L com discreto aumento na concentração de 33 mg/L. No protocolo “frasco sob pressão de ozônio-venturi” as concentrações se mostraram similarmente estabilizadas durante todo o período analisado na concentração de 33 mg/L, e com diminuição da ordem de 25% durante o processo de ozonização na concentração de 62 mg/L.

Haddad *et al.* (2009a) em um estudo de auto-hemoterapia maior em equinos, atribuíram que o aumento e a diminuição na contagem das plaquetas revelado pelos hemogramas podem estar relacionados as alterações na fluidez do sangue ozonizado, associando ainda este comportamento aos resultados dos trabalhos de Bocci (1994) e Giunta *et al*. (2001).

Bocci *et al*. (1999) em um estudo para ozonização das plaquetas relatam que o ozônio induziu uma diminuição temporária da capacidade antioxidante total e induziu também agregação plaquetária. Valacchi & Bocci (1999) em um estudo similar ao anterior, afirmaram que este hemocomponente é extremamente sensível ao estresse oxidativo progressivo do ozônio, essa afirmação foi baseada nas alterações dos níveis dos fatores de crescimento no plasma rico em plaquetas, revelando inclusive uma dose-dependência direta durante o processo de ozonização. Wright *et al.* (1994) também evidenciaram que as células epiteliais, *in vitro,* expostas ao ozônio alteram a produção dos fatores de ativação plaquetários. Ballardini (2006) realizando a auto-hemoterapia maior em cavalos observou no geral um aumento na contagem das plaquetas 72 horas após a aplicação do ozônio.

A agregação de alguns hemocomponentes é uma manifestação comum a muitas doenças, como nos casos dos pacientes com diabetes, sepse, isquemias e variações abruptas de pressão arterial entre outros quadros clínicos. O aumento e a diminuição do número das plaquetas (*in vivo*) podem estar relacionados ao fenômeno de agregação destas. Dìaz *et al.* (2001) relatam que a inibição da agregação plaquetária induzida pelo ozônio deve-se a ação deste no mecanismo hemostático, inibindo o aumento do cálcio plasmático induzido pelo colágeno e pela trombina.

Apesar da metodologia proposta para análise do sangue neste trabalho não contemplar a quantificação da viscosidade do sangue e do plasma, esse parâmetro poderá ser investigado em futuras abordagens do tema tendo em vista que as alterações nesta grandeza podem ser responsáveis, por exemplo, pela redução do nível de fibrogênio e em mudanças quantitativas nos valores dos hematócritos (Verrazzo *et al.*, 1995, Baieth e Elashmawi, 2012).

Alguns parâmetros da bioquímica sanguínea como a glicose, creatina, albumina, gama glutamiltransferase, colesterol, enzimas diversas, o fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) entre outros também podem ser alvos de investigação em futuras pesquisas da ozonização do sangue *ex vivo* com as metodologias propostas neste estudo.

5.3. Modelo matemático – ozônio-sangue

Uma das principais limitações da ozonização do sangue é a reduzida transferência de massa gás-líquido. Essa taxa de transferência depende principalmente da sua cinética de decomposição / reação, e, da relação de bolhas produzidas (quantidade e dimensão), regulada principalmente pela Lei de Henry (solubilidade dos gases em líquidos). A determinação do coeficiente de massa transferida na interface ozônio-sangue depende de inúmeras variáveis, as quais inseridas em um modelo matemático podem auxiliar na compreensão e resolução dessa complexa questão. Os coeficientes de transferência de massa e ordem de reação utilizados no presente modelo tiveram principalmente como base aqueles disponíveis na literatura científica e utilizados para a ozonização da água (Sheffer e Esterson, 1982; Farooq e Ahmed, 1989; Kuosa, Laari e Kallas, 2004; Gourich *et al*., 2008), uma vez que o sangue é constituído consideravelmente de água.

Introduzindo nesse modelo a quantidade de ozônio fornecida pelo gerador (g_{in} em mg/L), pode-se obter a estimativa da concentração de ozônio transferida ao sangue (C_L) com vistas, por exemplo, a induzir uma ativação oxidativa imunomodulatória sistêmica no organismo alvo, sem no entanto comprometer a integridade dos seus hemocomponentes. Indiretamente a essa ativação oxidativa controlada, esse fenômeno de ozonização do fluido pode ser capaz também de debelar uma doença ou um micro-organismo invasor do tipo viral ou bacteriano (diversas dessas aplicações em micro-organismos, vide capítulo 2.4 Ozônio na área da saúde). Seja qual for o objetivo de uso do ozônio no sangue é de fundamental importância respeitar os limiares oxidativos de maneira a atingir o objetivo sem causar prejuízos que comprometam a qualidade do sangue ou o equilíbrio biológico do organismo.

5.3.1. Concentração de ozônio na fase líquida

Assim como na primeira versão do modelo em que a equação foi desenvolvida por Sheffer e Esterson (1982), a origem do problema era baseada em uma estimativa de parâmetros não lineares. A análise do modelo matemático evidencia a interdependência de algumas variáveis com o valor de C_L, mostrando que quando estes aumentam ou diminuem a concentração de ozônio na fase líquida (C_L) é alterada. Neste sentido as principais relações observadas foram as seguintes:

- ✓ Aumento de Q (fluxo de líquido) = $\downarrow C_L$
- ✓ Aumento de G (fluxo de gás) = $\downarrow C_L$
- ✓ Aumento de V (volume do reator) = $\uparrow C_L$

Vale ressaltar que no presente estudo buscou-se a transferência de massa para o sangue respeitando-se a integridade dos seus hemocomponentes. Como o sangue apresenta alta concentração de matéria orgânica e baixa concentração de matéria inorgânica (Motrescu *et al*., 2006), para a preservação dos hemocomponentes é necessário que após o processo de ozonização do sangue, este apresente baixa concentração de ozônio na fase líquida $\downarrow C_L$. Desta forma após o efeito da ozonização no fluido, limitamos a sua decomposição e a sua reatividade garantindo assim a preservação da qualidade sanguínea.

As variações crescentes de k_1 e k_2 expressaram que o valor de C_L é reduzido rapidamente ao longo do processo de ozonização devido ao potencial antioxidante do sangue, que o ozônio em concentrações adequadas apresentará uma transferência de massa ao fluido e preservará sua integridade, onde os eventos biológicos gerados pela ozonização podem representar benefícios parao sistema em questão.

5.3.2. Validação experimental do modelo matemático

Não se dispõe na atualidade de instrumentações capazes de determinar diretamente a concentração de ozônio no sangue, inviabilizando assim a obtenção de uma validação mais detalhada e profunda do modelo matemático. Em um trabalho autoral, anterior a esta tese, foi investigado o uso de um dispositivo óptico operando na região do vermelho-infravermelho para correlacionar o valor da saturação de oxigênio quando o fluido biológico fosse ozonizado (Carvalho *et al.*, 2014), esta abordagem poderá ser uma futura ferramenta para quantificar a concentração do ozônio presente no sangue.

Outra abordagem sugerida para as futuras pesquisas diz respeito às investigações sobre a cinética química do sangue ozonizado e a medição experimental de sua concentração, resultados estes a serem corroborados por um modelo matemático utilizando ordens de reação adequadas e pertinentes apenas ao processo ozônio-sangue. No caso da água ozonizada reagindo com compostos orgânicos, alguns estudos sugerem que as reações envolvidas são de primeira e de segunda ordem (Hewes e Davison, 1971; Lovato, Martín e Cassano, 2009). Estipula-se que para o sangue as reações com o ozônio sejam de ordem zero e de primeira ordem.

É importante ainda que este tema raramente explorado apresente metodologias que compreendam as práticas consolidadas da ozonioterapia, por exemplo, com o uso do sangue total sem diluição, com o uso das concentrações dentro ou próximas da janela-terapêutica, e ainda, com o uso das razões similares de volume na exposição ozônio-sangue, do contrário, os resultados da cinética química podem induzir interpretações incorretas sobre os efeitos do ozônio no sangue, como nos trabalhos de Cataldo & Gentilini (2005a, 2005b).

O modelo proposto foi ajustado de modo a descrever que a transferência de massa ozônio-sangue, sob os dados dos parâmetros operacionais oferecidos, especifica as concentrações necessárias para uma prática de ozonioterapia na qual o sangue esteja integro para ser infundido ou estocado. Isso pode ser alcançado através da regulação da dose de ozônio frente a capacidade antioxidante do sangue, diretamente relacionada pela

influência de k_1 e k_2. Essa capacidade antioxidante do sangue ozonizado pode ser expressa por alguns parâmetros, tais como: estado antioxidante total, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, glutationa reduzida (GSH), atividades das enzimas antioxidantes entre outras. Com essa relação acreditamos ser possível estreitar ainda mais a viabilidade de equacionamento do fenômeno, e inserir tais parâmetros nas equações propostas.

Com relação ao estudo do modelo matemático utilizado, é desejável que o mesmo seja continuado, levando em conta uma maior gama de parâmetros físico-químicos relativos a transferência de massa ozônio-sangue, bem como o desenvolvimento de um novo arranjo experimental cujos resultados possam ser validados com maior riqueza de detalhes pelo modelo em questão, sendo este considerado um passo subsequente.

6. CONCLUSÃO

6.1. Eficácia na transferência de massa

Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que a transferência de massa ozônio-água é realizada com maior eficácia pelo venturi do que quando realizada pelo difusor de bolhas, no presente caso da ordem de seis vezes superior.

6.2. Protocolos para a ozonização do sangue

Os resultados obtidos permitem inferir que as concentrações das séries eritrocitária, leucocitária e plaquetária se mantém relativamente estáveis durante a ozonização com fluxo de 0,125 L/min para as duas diferentes concentrações de ozônio utilizadas neste trabalho (33 e 62 mg/L), com estabilidade no protocolo de ozonização do sangue no frasco sob pressão de ozônio-venturi.

6.3. Modelo matemático – ozônio-sangue

O modelo matemático utilizado neste trabalho se mostrou adequado para validar o estudo em questão permitindo o cálculo de importantes variáveis envolvidas no processo tais como o ozônio residual levando-se em conta as taxas de decomposição e reação do ozônio.

ANEXO

Uma universidade
de fronteiras
e mentes abertas.

universidade anhembi morumbi
Laureate International Universities

CÂMPUS CENTRO (MOOCA)
R. Dr. Almeida Lima, 1.134
CÂMPUS MORUMBI
Av. Roque Petroni Jr., 630
CÂMPUS PAULISTA 1
Av. Paulista, 2.000
CÂMPUS PAULISTA 2
R. Treze de Maio, 1.266
CÂMPUS VALE DO ANHANGABAÚ
R. Libero Badaró, 487
CÂMPUS VILA OLÍMPIA
R. Casa do Ator, 275
4007-1192
(Regiões Metropolitanas)
0800 015 9020
(Demais Localidades)
www.anhembi.br

São Paulo, 11 de abril de 2017

CEUA N 0077201461

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS - CEUA

A Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Anhembi Morumbi, em sua Reunião realizada no dia 28**/03/2017**, analisou a pesquisa intitulada "*O uso do ozônio na desinfecção de hemocomponentes*", a ser realizada na dependências da Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, a ser desenvolvida pelos pesquisadores **Adriana Barrinha Fernandes, Lívia Helena Moreira da Silva Melo, Henrique Cunha Carvalho,** sob responsabilidade do (a) Prof. (a) **Renato Amaro Zângaro,** docente da Universidade Anhembi Morumbi emitindo o seguinte parecer:

(X) Aprovado

(_) Com pendência

(_) Reprovado

Angélica Trazzi Bento de Moraes

Coordenador da Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA

Secretaria da Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DALAIN, S. M. *et al.* Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. **Pharmacological Research,** v. 44, n. 5, p. 391-96, 2001. ISSN 1043-6618.

AL-OMIRI, M. K. *et al.* Improved tooth bleaching combining ozone and hydrogen peroxide—A blinded study. **Journal of Dentistry,** v. 46, p. 30-35, 2016a. ISSN 0300-5712.

AL-OMIRI, M. K. *et al.* Ozone treatment of recurrent aphthous stomatitis: a double blinded study. **Scientific Reports,** v. 6, p. 27772, 2016b. ISSN 2045-2322.

ANDREWS, T. On the constitution and properties of ozone. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London,** v. 146, p. 1-13, 1856. ISSN 1364-503X.

ANITUA, E. *et al.* Ozone dosing alters the biological potential and therapeutic outcomes of plasma rich in growth factors. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 2, p. 240-47, 2015. ISSN 1600-0765.

ARMSTRONG, B. Anatomy and Physiology. In. Christine M. Blue. **Darby's Comprehensive Review of Dental Hygiene.** Maryland Heights: Mosby/Elsevier, 2017. cap. 3, p. 85. ISBN 978-03-233-1671-2.

AYDOGAN, S.; ARTIS, A. S. How ozone treatment affects erythrocytes. In: Seda Artis. **Hemodynamics - New Diagnostic and Therapeutic Approaches**: InTech, 2012. cap. 4, p. 164. ISBN 978-95-351-0559-6.

BAIETH, H. S.; ELASHMAWI, I. S. Influence of ozone on the rheological and electrical properties of stored human blood. **Journal of Biomedical Research**, v. 26, n. 3, p. 185-92, 2012. ISSN 1674-8301.

BALLARDINI, E. Changes in haemochromocytometric values in horses after ozone auto-haemotransfusion. **Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**, v. 5, n. 1, p. 47-52, 2006. ISSN 1720-6561.

BARONE, A. *et al.* Ozonetherapy protects from in-stent coronary neointimal proliferation. Role of redoxins. **International Journal of Cardiology,** v. 223, p. 258-61, 2016. ISSN 0167-5273.

BATAKLIEV, T. *et al*. Ozone decomposition. **Interdisciplinar Toxicology,** v. 7, n. 2, p. 47-59, 2017. ISSN 1337-9569.

BAYER, R.; WASSER, G. Effects of oxidative stress on erythrocyte deformability. **Proceedings of SPIE**, 1996. p. 333-41. ISSN 0277-786X.

BAYLAR, A. *et al.* Numerical modeling of venturi flows for determining air injection rates using fluent v6.2. **Mathematical and Computational Applications,** v. 14, n. 2, p. 97, 2009. ISSN 2297-8747.

BECK, E. G.; WASSER, G.; VIEBAHN-HÄNSLER, R. The current status of ozone therapy empirical developments and basic research. **Forsch Komplementärmed**, v. 5, p. 61-75, 1989. ISSN 1424-7364.

BIEDUNKIEWICZ, B. *et al.* Blood coagulation unaffected by ozonated autohemotherapy in patients on maintenance hemodialysis. **Archives of Medical Research,** v. 37, n. 8, p. 1034-37, 2006. ISSN 0188-4409.

BIŃ, A. K. Ozone solubility in liquids. **Ozone: Science & Engineering,** v. 28, n. 2, p. 67-75, 2006. ISSN 0191-9512.

BOCCI, V. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. **Journal of International Medical Research,** v. 22, n. 3, p. 131-44, 1994. ISSN 0300-0605.

BOCCI, V. *et al.* An integrated medical treatment for type-2 diabetes. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 8, n. 1, p. 57–61, 2014. ISSN 1871-4021.

BOCCI, V. *et al.* Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. **Mediators of Inflammation,** ID 26785, 2007. ISSN 1466-1861.

BOCCI, V. *et al.* Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, v. 12, n. 3, p. 67–75, 1998. ISSN 0393-974X.

BOCCI, V. *et al.* Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. **Platelets,** v. 10, n. 2-3, p. 110-16, 1999. ISSN 0953-7104.

BOCCI, V. How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects. **Free Radical Research**, v. 46, n. 9, p. 1068-75, 2012. ISSN 1071-5762.

BOCCI, V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 216, n. 3, p. 493-504, 2006a. ISSN 0041-008X.

BOCCI, V. **Ozone - A new medical drug**. Springer Netherlands, 2011. 315 p. ISBN 978-90-481-9234-2.

BOCCI, V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. **Mediators of Inflammation,** v. 13, n. 1, p. 3-11, 2004. ISSN 1466-1861.

BOCCI, V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research,** v. 37, n. 4, p. 425-35, 2006b. ISSN 0188-4409.

BOCCI, V.; ALDINUCCI, C. Rational bases for using oxygen-ozonetherapy as a biological response modifier in sickle cell anemia and beta-thalassemia: a therapeutic perspective**. Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents,** v. 18, n. 1, p. 38-44, 2004. ISSN 0393-974X.

BOCCI, V.; VALACCHI, G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. 4, 2015. ISSN 2296-2646.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical Gas Research,** v. 1, n. 1, p. 6, 2011a. ISSN 2045-9912.

BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **Journal of Translational Medicine,** v. 9, n. 1, p. 66, 2011b. ISSN 1479-5876.

BRAIDY, N. *et al.* Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: focus on diabetes and spinal pain. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2705–14, 2018. ISSN 1097-4652.

BRIENS, C. L. *et al.* Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer in a downward venturi-bubble column combination. **Chemical Engineering Science,** v. 47, n. 13, p. 3549-56, 1992. ISSN 0009-2509.

BUCKLEY, R. D. *et al.* Ozone and human blood. **Archives of Environmental Health**: **An International Journal,** v. 30, n. 1, p. 40-3, 1975. ISSN 0003-9896

BULIÉS, J. C. E. Una solución para exposiciones óseas postraumáticas: asociación de injerto de epiplon mayor con ozonoterapia. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas,** v. 15, n. 2, 1996. ISSN 0864-0300.

BURGASSI, S. *et al.* How much ozone bactericidal activity is compromised by plasma components? **Journal of Applied Microbiology,** v. 106, n. 5, p. 1715-21, 2009. ISSN 1364-5072.

CARDILE, V. *et al.* Effects of ozone on some biological activities of cells *in vitro*. **Cell Biology and Toxicology,** v. 11, n. 1, p. 11-21, 1995. ISSN 0742-2091.

CARVALHO, H. C. *et al.* Dissolved ozone in biological fluid monitored by optical device operating in the red-infrared region. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica,** v.30, n. 2, p. 127-31, 2014. ISSN 2446-4740.

CATALDO, F.; GENTILINI, L. Chemical kinetics measurements on the reaction between blood and ozone. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 36, n. 1–2, p. 61-65, 2005a. ISSN 0141-8130.

CATALDO, F.; GENTILINI, L. On the action of ozone on whole bovine blood. **Polymer Degradation and Stability.** v. 89, n. 3, p. 527–33, 2005b. ISSN 0141-3910.

CHAPMAN, S. A theory of upper atmospheric ozone. **Memoirs of the Royal Meteorological Society,** v. 3, p. 103-25, 1930. ISSN 0035-9009.

CLAVO, B. *et al.* Ozone therapy for tumor oxygenation: a pilot study. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine,** v. 1, n. 1, p. 93-98, 2004. ISSN 1741-427X.

CONSTANTIN, T.; BÎRŢOIU, I. A. Prelliminary study on ozone therapy in postpartum endometritis of dairy cows. **Agriculture and Agricultural Science Procedia,** v. 10, p. 384-89, 2016. ISSN 2210-7843.

CROSLAND, M. Eighteenth Century - Martinus van Marum. Life and Work. v 1. Ed. by Forbes R. J. et al. **The British Journal for the History of Science**, Cambridge, Reino Unido**,** v. 5, n. 2, p. 207, 1970. ISSN 1474-001X.

CRUICKSHANK, W. Some experiments and observations on galvanic electricity. **A Journal of Natural Philosophy, Chemistry, and the Arts,** v. 4, n. 1, p. 187-91, 1801.

CUCI, Y. et al. Venturilerin ozon enjeksiyon performansmm yapay sinir aglari ile modellenmesi. **KSU Journal Of Engineering Sciences,** v. 19, n. 3, p. 135-37, 2016. ISSN 1018-3639.

DEATON, C. M. *et al.* Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. **Equine Veterinary Journal,** v. 37, n. 3, p. 243-49, 2005. ISSN 2042-3306.

DELGADO-ROCHE, L.; FERNÁNDEZ, J. R.; ÁLVAREZ, D. R. Glutathione peroxidase-1 expression is up-regulated by ozone therapy in ApoE deficient mice. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 4, p. 323-26, 2014. ISSN 2210-5220.

DELGADO-ROCHE, L.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; RE, L. Ozone oxidative preconditioning prevents atherosclerosis development in New Zealand white rabbits.

Journal of Cardiovascular Pharmacology, v. 61, n. 2, p. 160-65, 2013. ISSN 0160-2446.

DI PAOLO, N. *et al.* Necrotizing fasciitis successfully treated with extracorporeal blood oxygenation and ozonization (EBOO). **International Journal of Artificial Organs**, v. 25, n. 12, p. 1194-98, 2002. ISSN 0391-3988.

DÍAZ BATISTA, A. et al. Efecto del ozono sobre la activación plaquetaria en pacientes con enfermedades vasculares periféricas: Informe preliminar. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas,** v. 20, p. 42-44, 2001. ISSN 1561-3011.

DÍAZ LUIS, J.; ABRAHAM, M. C.; CEPERO, M. S. Efecto modulador de la ozonoterapia sobre la actividad del sistema inmune. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 29, n. 2, 2012. ISSN 1561-2996.

DING, N. *et al.* Kinetics of ozone inactivation of infectious prion protein. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 79, n. 8, p. 2721-30, 2013. ISSN 1098-5336.

DOAN, L. *et al.* Clinical and cost effectiveness of eight disinfection methods for terminal disinfection of hospital isolation rooms contaminated with Clostridium difficile 027. **Journal of Hospital Infection,** v. 82, n. 2, p. 114-21, 2012. ISSN 0195-6701.

DU, H.; LIN, J.; ZUERCHER, C. Higher efficiency of CO_2 injection into seawater by a venturi than a conventional diffuser system. **Bioresource Technology,** v. 107, p. 131-34, 2012. ISSN 0960-8524.

DUARTE, H. A. *et al.* Beneficios de la intervención con ozonoterapia em pacientes con pie diabético neuroinfeccioso. **Revista Cubana de Angiología y Cirugía Vascular**, v. 15, n. 1, p. 12-21, 2014. ISSN 1682-0037.

DUKIĆ, W. *et al.* The efficacy of gaseous ozone on some cariogenic bacteria. **Collegium Antropologicum,** v. 37, n. 1, p. 109-13, 2013. ISSN 0350-6134.

ĐURIČIĆ, D. *et al.* Comparison of intrauterine antibiotics versus ozone medical use in sheep with retained placenta and following obstetric assistance. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 51, n. 4, p. 538-40, 2016. ISSN 1439-0531.

ELSHIMY, A., GOHAR, N. Fungal infection in egyptian patients with diabetic foot ulcer (prevalence, spectrum, and antifungal susceptibility). **Egyptian Journal of Medical Microbiology,** v. 24, n. 2, p. 61-68, 2015. ISSN 1110-2179.

FAROOQ, S.; AHMED, M. Modeling of an ozone-wastewater system's kinetics. **Water Research,** v. 23, n. 7, p. 809-15, 1989. ISSN 0043-1354.

FERRAZ, I. P. *et al*. Estudo do efeito do ozônio gasoso na hemólise e na desinfecção de sangue contaminado com *Escherichia coli* ATCC 25922. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 104-08, 2003. ISSN 1809-3019.

FISCHER, M.; ZINOVIK, I.; POULIKAKOS, D. Diffusion and reaction controlled dissolution of oxygen microbubbles in blood. **International Journal of Heat and Mass Transfer,** v. 52, n. 21–22, p. 5013-19, 2009. ISSN 0017-9310.

FONTES, B. *et al.* Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. **BMC Infectious Diseases,** v. 12, n. 1, p. 358, 2012. ISSN 1471-2334.

GAMISANS, X.; SARRÀ, M.; LAFUENTE, F. J. Fluid flow and pumping efficiency in an ejector-venturi scrubber. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification,** v. 43, n. 2, p. 127-36, 2004. ISSN 0255-2701.

GIUNTA, R. *et al.* Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. **Annals of Hematology,** v. 80, n. 12, p. 745-48, 2001. ISSN 0939-5555.

GOLDSTEIN, B. D. *et al.* The effect of ozone on mouse blood in vivo. **Archives of Environmental Health: An International Journal,** v. 16, n. 5, p. 648-50, 1968. ISSN 0003-9896.

GOLDSTEIN, B. D.; BALCHUM, O. J. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,** v. 126, n. 2, p. 356-58, 1967. ISSN 0037-9727.

GONENCI, R.; TABUR, M.; OZSOY, S.Y. Preventive and curative effects of medical ozone in rats exposed to experimental osteomyelitis. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 355-59, 2017. ISSN 0253-8318.

GONG, X. *et al.* A numerical study of mass transfer of ozone dissolution in bubble plumes with an Euler–Lagrange method. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 4, p. 1081-93, 2007. ISSN 0009-2509.

GÓRNICKI, A.; GUTSZE, A. *In vitro* effects of ozone on human erythrocyte membranes: an EPR study. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 4, p. 963-71, 2000. ISSN 0001-527X.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, J. A.; SAUPE, A. Ozonation of Water and Waste Water. – A practical guide to Understanding Ozone and its Application. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. ISBN 978-35-273-1962-6.

GOURICH, B. *et al.* Comparison of hydrodynamic and mass transfer performances of an emulsion loop-venturi reactor in cocurrent downflow and upflow configurations. **Chemical Engineering Journal**, v. 140, n. 1-3, p. 439-47, 2008. ISSN 1385-8947.

GULMEN, S. *et al.* Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis. **Journal of Surgical Research**, v. 185, n. 1, p. 64-9, 2013. ISSN 0022-4804.

GUVEN, A. *et al.* Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 44, n. 9, p. 1730-35, 2009. ISSN 0022-3468.

GUVEN, A. *et al.* The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 43, n. 9, p. 1679-84, 2008. ISSN 0022-3468.

HADDAD, M. A. *et al.* Behavior of hematological variables in horses treated with ozone therapy. **Revista Electrónica de Veterinaria,** v. 10, n. 7, p. 1-12, 2009a. ISSN 1695-7504.

HADDAD, M. A. *et al.* Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 61, p. 539-46, 2009b. ISSN 0102-0935.

HALDKAR, R. K.; GUPTA, K. V.; SHEOREY, T. Modeling and flow analysis of piezoelectric based micropump with various shapes of microneedle. **Journal of Mechanical Science and Technology,** v. 31, n. 6, p. 2933-41 2017. ISSN 1976-3824.

HERSCHEL, C.; MERRIMAN, M.; FRANCIS, J. B. Discussion of the venturi water meter: an instrument making use of a new method of gauging water, applicable to the cases of very large tubes, and of a small value only, of the liquid to be gauged. **Transactions of the American Society of Civil Engineers,** v. 18, n. 1, p. 133-41, 1888.

HEWES, C. G.; DAVISON, R. R. Kinetics of ozone decomposition and reaction with organics in water. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 17, n. 1, p; 141-74, 1971. ISSN 1547-5905.

INDURKAR, M. S.; VERMA, R. Effect of ozonated oil and chlorhexidine gel on plaque induced gingivitis: A randomized control clinical trial. **Journal of Indian Society of Periodontology,** v. 20, n. 1, p. 32-35, 2016. ISSN 0972-124X.

ISCO3 - International Scientific Committee of Ozone Therapy. **Madrid declaration on ozone therapy**. n. 2, p. 50, 2015.

JAFARI, A. *et al.* Effect of regular aerobic exercise with ozone exposure on peripheral leukocyte populations in Wistar male rats. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 14, n. 5, p. 277-83, 2009. ISSN 7135-7136.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Wiley, 1993, 417 p. ISBN 978-08-121-1437-9.

JIAO, X. J.; PENG, X. Clinial study of medical ozone therapy in chronic hepatitis B of 20 patients. **Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology,** v. 22, n. 6, p. 484-85, 2008. ISSN 1003-9279.

KAWAHITO, K.; NOSÉ, Y. Hemolysis in different centrifugal pumps. **Artificial Organs**, v. 21, n. 4, p. 323-26, 1997. ISSN 1525-1594.

KAZANCIOGLU, H. O.; KURKLU, E.; EZIRGANLI, S. Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery,** v. 43, n. 5, p. 644-48, 2014. ISSN 0901-5027.

KIM, H. S. *et al.* Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal of Korean Medical Science,** v. 24, n. 3, p. 368-74, 2009. ISSN 1011-8934.

KISHIMOTO, N.; NAKAMURA, E. Effects of ozone-gas bubble size and pH on ozone/UV treatment **Ozone: Science & Engineering,** v. 33, n. 5, p. 396-402, 2011. ISSN 0191-9512.

KUOSA, M.; LAARI, A.; KALLAS, J. Determination of the Henry's coefficient and mass transfer for ozone in a bubble column at different pH values of water. **Ozone: Science & Engineering,** v. 26, n. 3, p. 277-86, 2004. ISSN 0191-9512.

KURODA, K. *et al.* The safety and anti-tumor effects of ozonated water *in vivo*. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 16, n. 10, p. 25108, 2015. ISSN 1422-0067.

LABUSCHAGNE, C. *et al.* Ozone concentration dependent autohaemotherapy effects on baboon antioxidant capacity and DNA integrity and repair capacity of lymphocytes. **African Journal of Biotechnology,** v. 8, n. 5, p. 715-20, 2009. ISSN 1684-5315.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. **Ozone in Water Treatment: Application and Engineering**. Oxfordshire: Taylor & Francis, 1991. ISBN 978-08-737-1474-7.

LANGØ, T.; MØRLAND, T.; BRUBAKK, A. O. Diffusion coefficients and solubility coefficients for gases in biological fluids and tissues: a review. **The Undersea and Hyperbaric Medicine,** v. 23, n. 4, p. 247-72, 1996. ISSN 1066-2936.

LEME, J. et al. A new model of centrifugal blood pump for cardiopulmonary bypass: design improvement, performance and hemolysis tests. **Artificial Organs**, v. 35, n. 5, p. 443-47, 2011. ISSN 1525-1594.

LOEB, B. L. Ozone: Science & Engineering: thirty-three years and growing. **Ozone: Science & Engineering,** v. 33, n. 4, p. 329-42, 2011. ISSN 0191-9512.

LOPES DE JESUS, C. C. *et al.* Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. **PLoS One,** v. 12, n. 7, p. e0179185, 2017. ISSN 1932-6203.

LÓPEZ, L. G. **Efecto de la ozonoterapia sobre los parámetros hematológicos y constantes fisiológicas en equinos**. 2007. 41 f. Proyecto (Licenciatura) – Escuela Agrícola Panamericana, Universidad Zamorano, 2007.

LOVATO, M. E.; MARTÍN, C. A.; CASSANO, A. E. A reaction kinetic model for ozone decomposition in aqueous media valid for neutral and acidic pH. **Chemical Engineering Journal,** v. 146, n. 3, p. 486-97, 2009. ISSN 1385-8947.

LUQUETA, G. R. et al. Evaluation of disposable medical device packaging materials under ozone sterilization. **Research on Biomedical Engineering**, v. 33, n.1, p. 58-68, 2017. ISSN 2446-4732.

LUTMER, R. F.; BUSCH, K. A.; DELONG, P. L. Effect of nitric oxide, nitrogen dioxide, or ozone on blood carboxyhemoglobin concentration during low-level carbon monoxide exposures. **Atmospheric Environment,** v. 1, n. 1, p. 45-48, 1967. ISSN 1352-2310.

MADRIGAL, J. L. C. **Tratado de ozonoterapia.** Bogota: La Salud Naturalmente, 2007, 238 p. ISBN 978-84-611-7689-2.

MARSON, R. F. *et al.* Use of ozonated water for disinfecting gastrointestinal endoscopes. **Ozone: Science & Engineering,** v. 38, n. 5, p. 346-51, 2016. ISSN 0191-9512.

MARTÍN, N. A.; GARCÍA, G. R. Ozone therapy for patient poisoned by carbon monoxide. **Revista Española de Ozonoterapia**, v. 6, n. 1, p. 165-86, 2016. ISSN 2174-3215.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. *et al.* Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease. **European Journal of Pharmacology,** v. 691, n. 1-3, p. 156-62, 2012. ISSN 0014-2999.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; PÉREZ-DAVISON, G. Ozone as U-shaped dose responses molecules (hormetins). **Dose Response,** v. 9, n. 1, p. 32-49, 2011. ISSN 1559-3258.

MEDIZONE, I. AsepticSure™ oxidative catalyst. EPA Reg. # 90607 G. 48p. 2016.

MÉNDEZ PÉREZ, N. I.; CALUNGA FERNÁNDEZ, J. L.; MENÉNDEZ CEPERO, S. Ozonoterapia en el síndrome de malabsorción intestinal secundario a parasitismo por *Giardia lamblia*: estudio preliminar. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas,** v. 22, n. 3, p. 145-49, 2003. ISSN 0864-0300.

MILLER, F. J. *et al.* A model of the regional uptake of gaseous pollutants in the lung. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 79, n. 1, p. 11-27, 1985. ISSN 0041-008X.

MILLER, G. E.; ETTER, B. D.; DORSI, J. M. A multiple disk centrifugal pump as a blood flow device. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 37, n. 2, p. 157-63, 1990. ISSN 0018-9294.

MOLINARI, F. *et al.* Cerebrovascular pattern improved by ozone autohemotherapy: an entropy-based study on multiple sclerosis patients. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 55, n. 8, p. 1163-75, 2017. ISSN 1741-0444.

MONDÉJAR BARRIOS, M. D.; ROSAS DURAND, L. O. Aplicación de la ozonoterapia en pacientes con artritis reumatoide. **In Crescendo**, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2016. ISSN 2307-5260.

MOREIRA, J. P. L. **Efeito da auto-hemoterapia menor, auto-hemoterapia menor ozonizada e insuflação de ozônio sobre parâmetros hematimétricos e bioquímicos de cães hígidos.** 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

MOROSI, C.; SIRITO, M.; SILVESTRI, E. Experimental ultrasound study monitoring diffusion of an oxygen-ozone gas mixture in adipose tissue. **International Journal of Ozone Therapy,** v. 6, n. 1, p. 25-28, 2007. ISSN 1972-3539.

MOTRESCU, I. *et al.* Spectrophotometric analysis of the blood plasma for different mammals. **Romanian Journal of Biophysics**. v. 16, n. 3, p. 215–20, 2006. ISSN 1843-424X.

MURRAY, B. K. *et al.* Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. **Journal of Virological Methods,** v. 153, n. 1, p. 74-77, 2008. ISSN 0166-0934.

MUSTAFAEV, E. M. *et al.* The role of ozone therapy in prevention of pyoinflammatory complications after transurethral resection of prostatic adenoma. **Urologiia**, n. 1, p. 18-23, 27, 2007. ISSN 1728-2985.

NAKAO, A. *et al*. Therapeutic antioxidant medical gas. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition,** v. 44, n. 1, p. 1-13, 2009. ISSN 0912-0009.

NOWICKA, D. Thermography improves clinical assessment in patients with systemic sclerosis treated with ozone therapy. **BioMed Research International,** v. 2017, p. 5842723, 2017. ISSN 2314-6133.

OHTSUKA, H. *et al.* Changes in leukocyte population after ozonated autohemoadministration in cows with inflammatory diseases. **The Journal of Veterinary Medical Science,** v. 68, n. 2, p. 175-78, 2006. ISSN 0916-7250

OUF, S. A. *et al.* Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 47, n. 3, p. 697-702, 2016. ISSN 1517-8382.

OZEN, B. F.; MAUER, L. J.; FLOROS, J. D. Effects of ozone exposure on the structural, mechanical and barrier properties of select plastic packaging films. **Packaging Technology and Science**, v. 15, n. 6, p. 301-11, 2002. ISSN 1099-1522.

OZKAN, F.; OZTURK, M.; BAYLAR, A. Experimental investigations of air and liquid injection by venturi tubes. **Water and Environment Journal,** v. 20, n. 3, p. 114-22, 2006. ISSN 1747-6593.

PAPADOPOULOU, V. *et al.* Circulatory bubble dynamics: From physical to biological aspects. **Advances in Colloid and Interface Science,** v. 206, p. 239-49, 2014. ISSN 0001-8686.

PATHAPATI, S. S. *et al.* Optimization of mixing and mass transfer in in-line multi-jet ozone contactors using computational fluid dynamics. **Ozone: Science & Engineering,** v. 38, n. 4, p. 245-52, 2016. ISSN 0191-9512.

PECORELLI, A. *et al.* NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 267, n. 1, p. 30-40, 2013. ISSN 0041-008X.

PEDERSON, T. H.; KARLSEN, H. M. **An *in vitro* study of the new medtronic BioMedicus BPX80 centrifugal pump with respect to the handling micro-gas**

bubbles. A technical report by Medisnske Teknisk Sekkehetskonstroll, Oslo, Norway, January 21, 1998.

PETRY, G. *et al. In vitro* inactivation of herpes virus by ozone. **Ozone: Science & Engineering,** v. 36, n. 3, p. 249-52, 2014. ISSN 0191-9512.

PLOPPER, C. G. *et al.* Dose-dependent tolerance to ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 127, n. 1, p. 124-31, 1994. ISSN 0041-008X.

RE, L. *et al.* Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway *in vivo*? A preliminary result. **European Journal of Pharmacology**, v. 742, n. 5, p. 158-62, 2014. ISSN 0014-2999.

RE, L. *et al.* Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. **Archives of Medical Research,** v. 39, n. 1, p. 17-26, 2008. ISSN 0188-4409.

REIS, F. J. *et al.* The use of ozone in high frequency device to treat hand ulcers in leprosy: a case study. **Tropical Medicine and Health,** v. 43, n. 3, p. 195-99, 2015. ISSN 1348-8945.

REYNOLDS, A.; ERMENTROUT, G. B.; CLERMONT, G. A mathematical model of pulmonary gas exchange under inflammatory stress. **Journal of Theoretical Biology,** v. 264, n. 2, p. 161-73, 2010. ISSN 0022-5193.

RUBIN, M. B. The history of ozone. The Schöbein period, 1839-1868. **Bulletin for the History of Chemistry,** v. 26, n. 1, p. 40-56, 2001. ISSN 1053-4835.

SAGAI, M.; BOCCI, B. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? **Medical Gas Research,** v. 1, n. 29, p. 18, 2011. ISSN 2045-9912.

SANTANA-RODRÍGUEZ, N. et al. Ozone therapy protects against rejection in a lung transplantation model: a new treatment? **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 104, n. 2, p. 458-64, 2017. ISSN 0003-4975.

SCHÖNBEIN, C. F. Recherches sur la nature de l'odeur qui se manifeste dans certaines actions chemiques. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences,** v. 150, p. 706-10, 1840.

SCHULZ, C. R.; BELLAMY, W. D. The role of mixing in ozone dissolution systems. **Ozone: Science & Engineering,** v. 21, n. 4, p. 329-50, 2000. ISSN 0191-9512.

SCHULZ, S. et al. Treatment with ozone/oxygen-pneumoperitoneum results in complete remission of rabbit squamous cell carcinomas. **International Journal of Cancer,** v. 122, n. 10, p. 2360-67, 2008. ISSN 0020-7136.

SENTÜRK, U. K. et al. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **Journal of Applied Physiology (1985**), v. 91, n. 5, p. 1999-2004, 2001. ISSN 8750-7587.

SHEFFER, S.; ESTERSON, G. L. Mass transfer and reaction kinetics in the ozone/tap water system. **Water Research,** v. 16, n. 4, p. 383-89, 1982. ISSN 0043-1354.

SIEMENS, W. Ueber die elektrostatische induction und die verzögerung des stroms in flaschendräten. **Annual Review of Physical Chemistry,** v. 102, p. 66-120, 1857. ISSN 0066-426X.

SINISCALCO, D. et al. Intraperitoneal administration of oxygen/ozone to rats reduces the pancreatic damage induced by streptozotocin. **Biology**, v. 7, n. 1, p. 10, 2018. ISSN 2079-7737.

SLOAN, D. **Effects of ozone on blood components.** 2010. 92 f. Tese (Doctor of Philosophy) - Department of Environmental and Occupational Health, University of South Florida, Florida, 2010.

SORET, J. L. Sur les rélations volumétriques de l'ozone. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences,** v. 57, p. 604-09, 1863. ISSN 1631-0683.

STAMLER, J. S. *et al.* Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2034-37, 1997. ISSN 1095-9203.

SZPONDER, T. *et al.* The combined use of ozone therapy and autologous platelet-rich plasma as an alternative approach to foot rot treatment for sheep. A preliminary study. **Small Ruminant Research**, v. 156, p. 50-56, 2017. ISSN 0921-4488.

TAKIC, L. *et al.* Ozone absorption in mechanically stirred reactor. **Journal of the Serbian Chemical Society,** v. 72, n. 8-9, p. 847-55, 2007. ISSN 0352-5139.

TAYAMA, E. *et al.* Hemolysis test of a centrifugal pump in a pulsatile mode: the effect of pulse rate and RPM variance. **Artificial Organs**, v. 21, n. 12, p. 1284-87, 1997. ISSN 1525-1594.

TEIGE, B.; MCMANUS, T. T.; MUDD, J. B. Reaction of ozone with phosphatidylcholine liposomes and the lytic effect of products on red blood cells. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 12, n. 3, p. 153-71, 1974. ISSN 0009-3084.

TEIXEIRA, L. R. *et al.* Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. **The Veterinary Journal,** v. 197, n. 3, p. 794-99, 2013. ISSN 1090-0233.

TEKE, K. *et al*. Preventive effect of intravesical ozone supplementation on n-methyl-n-nitrosourea-induced non-muscle invasive bladder cancer in male rats. **Experimental Animals**, v. 66, n. 3, p. 191-98, 2017. ISSN 1341-1357.

TERASAKI, N. *et al.* Changes of immunological response after experimentally ozonated autohemoadministration in calves. **The Journal of Veterinary Medical Science,** v. 63, n. 12, p. 1327-30, 2001. ISSN 0916-7250.

TESSIER, J. *et al.* The use of ozone to lighten teeth. An experimental study. **Acta Odontológica Latinoamericana,** v. 23, n. 2, p. 84-89, 2010. ISSN 0326-4815

TRAVAGLI, V. *et al.* Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. **International Journal of Toxicology,** v. 29, n. 2, p. 165-74, 2010. ISSN 1091-5818.

TRAVAGLI, V. *et al.* A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 41, n. 5, p. 504-11, 2007. ISSN 0141-8130.

TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; BOCCI, V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 39, n. 4-5, p. 317-20, 2006. ISSN 0141-8130.

TSUJINO, T.; SHIMA, A. The behaviour of gas bubbles in blood subjected to an oscillating pressure. **Journal of Biomechanics,** v. 13, n. 5, p. 407-16, 1980. ISSN 0021-9290.

TSUZUKI, N. *et al.* Effects of ozonated autohemotherapy on the antioxidant capacity of Thoroughbred horses. **The Journal of Veterinary Medical Science,** v. 77, n. 12, p. 1647-50, 2015. ISSN 0916-7250.

UEBELHART, B. *et al.* Study of a centrifugal blood pump in a mock loop system. **Artificial Organs**, v. 37, n. 11, p. 946-49, 2013. ISSN 1525-1594.

VALACCHI, G. *et al.* Ozonated oils as functional dermatological matrices: effects on the wound healing process using SKH1 mice. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 458, n. 1, p. 65-73, 2013. ISSN 0378-5173.

VALACCHI, G.; BOCCI, V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. **Mediators of Inflammation,** v. 8, n. 4-5, p. 205-09, 1999. ISSN 0962-9351.

VAN LIEW, H. D.; BURKARD, M. E. Bubbles in circulating blood: stabilization and simulations of cyclic changes of size and content. **Journal of Applied Physiology,** v. 79, n. 4, p. 1379-85, 1995. ISSN 8750-7587.

VERRAZZO, G. *et al.* Hyperbaric oxygen, oxygen-ozone therapy, and rheologic parameters of blood in patients with peripheral occlusive arterial disease. **The Undersea and Hyperbaric Medicine,** v. 22, n. 1, p. 17-22, 1995. ISSN 1066-2936.

VIEBAHN-HÄNSLER, R.; LEÓN FERNÁNDEZ, O. S.; FAHMY, Z. Ozone in medicine: The low-dose ozone concept—guidelines and treatment strategies. **Ozone: Science & Engineering,** v. 34, n. 6, p. 408-24, 2012. ISSN 0191-9512.

WAINSTEIN, J. *et al.* Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. **Diabetes Technology & Therapeutics,** v. 13, n. 12, p. 1255-60, 2011. ISSN 1520-9156.

WOLFF, H. H. Die behandlung peripherer durchblutungsstörungen mit ozon. **Erfahrungsheilkunde,** v. 23, p. 181-84, 1974.

WRIGHT, D. T. *et al.* Ozone stimulates release of platelet activating factor and activates phospholipases in guinea pig tracheal epithelial cells in primary culture. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 127, n. 1, p. 27-36, 1994. ISSN 0041-008X.

YANG, W. J. Dynamics of gas bubbles in whole blood and plasma. **Journal of Biomechanics,** v. 4, n. 2, p. 119-25, 1971. ISSN 0021-9290.

YANG, W. J. *et al.* Experimental studies of the dissolution of gas bubbles in whole blood and plasma—I. Stationary bubbles. **Journal of Biomechanics,** v. 4, n. 4, p. 275-81, 1971a. ISSN 0021-9290.

YANG, W. J. *et al.* Experimental studies of the dissolution of gas bubbles in whole blood and plasma—II. Moving bubles or liquids. **Journal of Biomechanics,** v. 4, n. 4, p. 283-88, 1971b. ISSN 0021-9290.

YOSHIKAWA, T. *et al.* Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. I. Effect of phenanthrene, pyrene, and their ozonized products on blood chemistry in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 79, n. 2, p. 218-26, 1985. ISSN 0041-008X.

ZAKY, S. *et al.* Preliminary results of ozone therapy as a possible treatment for patients with chronic hepatitis C. **Journal of Alternative and Complementary Medicine,** v. 17, n. 3, p. 259-63, 2011. ISSN 1075-5535.

ZÂNGARO, R. A.; FERNANDES, A. B.; LIMA, C. J. Ozônio – Fundamentos e Aplicações. In. Andrade, A. O.; Soares, A. B.; Cardoso, A.; Lamounier, E. A.

Tecnologias, Técnicas e Tendências em Engenharia Biomédica. Uberlândia: Canal 6, 2014, cap., p. 94-113. ISBN 978-85-791-7289-2.

ZEE, H.; MONTE, A. **Ozone auto-haemotherapy in lower limb ulcerations**. In: World Ozone Congress, 2001, London. International Ozone Association (IOA). p.1628.

ZHANG, J. *et al.* Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity,** v. 2014, p. 273475, 2014. ISSN 1942-0900.

ZIMRAN, A. *et al.* Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. **Acta Haematologica,** v. 102, n. 3, p. 148-51, 2000. ISSN 0001-5792.

ZOUTMAN, D.; SHANNON, M.; MANDEL, A. Effectiveness of a novel ozone-based system for the rapid high-level disinfection of health care spaces and surfaces. **American Journal of Infection Control,** v. 39, n. 10, p. 873-79, 2011. ISSN 0196-6553.