

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANGELICA DE ALMEIDA LUPATELLI

**AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS, UTILIZANDO
ULTRASSOM E OZÔNIO, PARA REMOÇÃO DE TATUAGENS EM
MODELO ANIMAL.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

São José dos Campos, abril 2024

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANGELICA DE ALMEIDA LUPATELLI

**AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS, UTILIZANDO
ULTRASSOM E OZÔNIO, PARA REMOÇÃO DE TATUAGENS EM
MODELO ANIMAL.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Lívia H.M.S. Mélo
Coorientador: Prof. Dr. Leandro Procópio Alves

São José dos Campos, abril 2024

UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

ANGELICA DE ALMEIDA LUPATELLI

**AVALIAÇÃO DE NOVOS PROTOCOLOS, UTILIZANDO
ULTRASSOM E OZÔNIO, PARA REMOÇÃO DE TATUAGENS EM
MODELO ANIMAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Profa. Dra. Lívia H.M.S. Mélo

Orientadora

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. Leandro Procópio Alves

Universidade Anhembi Morumbi

Prof. Dr. André Luiz da Silva Mendes

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

Universidade Anhembi Morumbi

São José dos Campos, abril 2024

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

ANGÉLICA DE ALMEIDA LUPATELLI

Fisioterapeuta, especialista em Fisioterapia Dermatofuncional e Farmacêutica.
Mestranda em Engenharia Biomédica pela Universidade Anhembi Morumbi.

Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L985a Lupatelli, Angélica de Almeida
Avaliação de novos protocolos utilizando ultrassom e ozônio para
remoção de tatuagens em modelo animal / Angélica de Almeida
Lupatelli. – 2024.
79f.; 30 cm.

Orientador: Profa. Dra. Livia H. M. S. Melo.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade
Anhembi Morumbi, São José dos Campos, 2024.
Bibliografia: f. 73-77.

1. Engenharia Biomédica. 2. Ozônio 3. Ultrassom Terapêutico. 4.
Modelo Animal. 5. Tatuagem. 6. Termografia. I. Título.

CDD 610.28

Bibliotecária Iara Neves CRB 8/8799

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a “Deus”, que nos ajudou até aqui.

Dedico também ao meu marido Vinícius Lupatelli, a minha mãe Claudete Almeida (*in memoriam*), e aos demais familiares, essas pessoas sempre me apoiaram e, me ajudaram a realizar este sonho de me tornar Mestre.

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço aos professores, Prof. Dr. Rodrigo Alexis Lazo Osorio, Prof.^a Dra. Livia Helena Moreira da Silva Mélo e Prof. Dr. Leandro Procópio Alves, pela orientação, além de todos os ensinamentos, disponibilidade, confiança e amizade.

Agradeço aos meus colegas: Leandro Azevedo, Luciana Atayde, Marcell Campos, Francisco Dimitre, Alessandra Silvério e Valéria Antunes, todos os colegas de curso, que foram fundamentais ao longo dessa caminhada.

Agradeço também ao coordenador Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro pela organização do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. Minha gratidão a todos os professores pelo sólido conhecimento e experiências compartilhadas, que engrandecem e enriquecem o PPG em Engenharia Biomédica.

Não posso deixar de agradecer à Sra Nídia Macedo, secretária acadêmica, que desde o início, sempre demonstrou sua simpatia, atenção, eficiência e agilidade em responder e atender às dúvidas e solicitações.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de Mestrado, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração,
como para o SENHOR, e não para os homens,
sabendo que receberá do SENHOR a
recompensa da herança. ”

Colossenses 3: 23-24

RESUMO

A tatuagem sempre foi algo bastante complexo, os desenhos, os significados e rito de sua execução, porém a sua remoção ainda é um procedimento doloroso realizado em várias sessões, que desafia os profissionais da área da medicina estética. O desenvolvimento de técnicas para remoção de tatuagens de forma indolor, minimamente invasiva e com mínimos efeitos colaterais foi a proposta deste estudo preliminar. Leitões (n=3) foram tatuados nas laterais das coxas pélvicas (direita e esquerda) com pigmento azul com 5 mm de diâmetro totalmente preenchido, e após 30 dias, as tatuagens (n=21) foram divididas em quatro grupos: Controle (n=3), Ozônio (n=6), Ultrassom (n=6) e híbrido (n=6). O protocolo experimental foi realizado durante 10 semanas consecutivas (10 sessões), uma vez por semana totalizando 70 dias de experimento. Os protocolos consistiram na aplicação semanal, no grupo ozônio aplicou-se intradérmico nas tatuagens o volume de 1,0 mL na concentração de 20 mg/L em cada pigmentação, no grupo ultrassom cada tatuagem recebeu 1 W/cm² de forma contínua por cinco minutos, o grupo híbrido recebeu os protocolos ozônio e ultrassom seguidos e o grupo controle foi apenas para a observação, sem tratamento. Durante todos os procedimentos nos animais, registros com a câmera termográfica foram realizados em cada protocolo testado, após a 10^a semana, foram realizadas biópsias dos fragmentos e enviados ao laboratório para a histopatologia. Com os resultados obtidos observou-se uma redução da pigmentação da derme nos grupos ozônio e ultrassom isoladamente, o grupo híbrido não obteve resultados semelhantes aos outros grupos testados, no entanto, o estudo mostrou-se o potencial do ozônio e do ultrassom para a remoção de tatuagens como técnicas promissoras e seguras para a prática clínica.

Palavras-chave: Engenharia biomédica. Tatuagem. Modelo Animal. Ozônio. Ultrassom terapêutico. Termografia.

ABSTRACT

EVALUATION OF NEW PROTOCOLS USING ULTRASOUND AND OZONE FOR TATTOO REMOVAL IN ANIMAL MODELS.

Tattoos have always been quite complex, with their designs, meanings and rites of execution, but their removal is still a painful procedure that takes several sessions and challenges professionals in the field of aesthetic medicine. The purpose of this preliminary study was to develop techniques for removing tattoos in a painless, minimally invasive way and with minimal side effects. Piglets (n=3) were tattooed on the sides of the pelvic thighs (right and left) with blue pigment with a diameter of 5 mm completely filled, and after 30 days, the tattoos (n=21) were divided into four groups: Control (n=3), Ozone (n=6), Ultrasound (n=6) and hybrid (n=6). The experimental protocol was carried out for 10 consecutive weeks (10 sessions), once a week for a total of 70 days. The protocols consisted of weekly application; in the ozone group, 1.0 mL was applied intradermally to the tattoos at a concentration of 20 mg/L; in the ultrasound group, each tattoo received 1 W/cm² continuously for five minutes; the hybrid group received the ozone and ultrasound protocols in succession; and the control group was just for observation, without treatment. During all the procedures on the animals, thermographic camera recordings were made for each protocol tested, and after the 10th week, biopsies were taken from the fragments and sent to the laboratory for histopathology. The results obtained showed a reduction in pigmentation of the dermis in the ozone and ultrasound groups alone; the hybrid group did not obtain results similar to the other groups tested. However, the study showed the potential of ozone and ultrasound for tattoo removal as promising and safe techniques for clinical practice.

Keywords: Biomedical engineering. Tattoos. Animal model. Ozone. Therapeutic ultrasound. Thermography.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	HIPÓTESE	20
4	JUSTIFICATIVA	21
5	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
5.1	Pele	22
5.1.1	Pele suína.....	28
5.1.1.1	<i>Epiderme</i>	<i>28</i>
5.1.1.2	<i>Derme</i>	<i>29</i>
5.2	Tatuagem.....	30
5.3	Ultrassom Terapêutico (UST)	30
5.3.1	Aplicação da técnica ultrassônica na prática clínica	37
5.4	Ozônio	37
5.5	O mecanismo de ação do ozônio em organismos e tecidos biológicos.....	39
5.6	Termografia.....	42
6	MATERIAIS E MÉTODOS	48
6.1	Animais.....	48
6.2	Equipamentos	51
6.3	Protocolos terapêuticos.....	51
6.3.1	Histologia.....	54
7	RESULTADOS	56
7.1	Avaliação macroscópica.....	56
7.2	Avaliação microscópica – Dados histológicos	57
7.3	Termografia.....	59
8	DISCUSSÃO	65
9	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS	73

APÊNDICE A – Autorização para uso animal do Comitê de Ética em Pesquisa Animal	78
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das camadas da epiderme da pele humana pelo corte histológico.	22
Figura 2: Divisão das camadas da pele e suas estruturas.	24
Figura 3: Imagem microscópica pele humana e suas divisões.	24
Figura 4: Estrutura tecidual das camadas da pele suína e suas estruturas.. .	30
Figura 5: Efeito da fonoforese devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular gerando fusão de ativos para o interior da célula.	35
Figura 6: Equação de tempo, e área de radiação efetiva do ultrassom.	36
Figura 7: Aumento da temperatura local devido a produção de calor..	37
Figura 8: Indicações utilizadas para tratamentos..	40
Figura 9: Imagem frontal realizada por captação térmica em pacientes com alterações mamárias..	43
Figura 10: Imagem térmica captada com câmera termográfica FLIR T640 para auxílio em detecção de estresse no suíno.	44
Figura 11: Representação esquemática da captura de termogramas.....	46
Figura 12: Animais selecionados para o experimento. (A) Leitões no confinamento. (B) Procedimento de tatuagem na pele do animal..	49
Figura 13: Desenho representativo da configuração experimental. As setas mostram a aplicação da tatuagem local/grupo nos lados direito e esquerdo dos leitões. G: Grupo. H: Híbrido. UST:Ultrassom. O ₃ : Ozônio. C: Controle.	50
Figura 14: Procedimento: 30 dias após a tatuagem (A) tricotomia, (B) verificação do tamanho da tatuagem..	50
Figura 15: Esquema do cronograma experimental em dias após a realização das tatuagens. Tatuagem (T - 0 dia), Sessões (1-10º - 7 dias de intervalo - 30-93º dias) e Biópsia (B - 100 dias).	52
Figura 16: Momento dos protocolos experimentais, (A) grupo O ₃ e grupo controle, (B) grupo UST e híbrido.....	53
Figura 17: Momento dos protocolos experimentais. (A) realização da técnica de O ₃ ; (B) realização da técnica de UST. Ambas as técnicas utilizadas no grupo híbrido..	53

Figura 18: Contenção e Momento da captação dos termogramas pré e pós-tratamento.	54
Figura 19: Equipamentos para a biópsia (A) Punch 5mm, (B) lidocaína a 2% injetável para anestesia local.	54
Figura 20: Procedimentos antes e após a biópsia. (A) Biópsia da pele dos animais, (B): Sutura, após a biópsia.....	55
Figura 21: Comparação da despigmentação entre os grupos, Controle, Ozônio, UST e Híbrido. (A/D): primeira aplicação (30 dias), (B/E): quarta aplicação (51 dias), (C/F): décima aplicação (93 dias).....	56
Figura 22: Diferenças histológicas nos protocolos para remoção da tatuagem da pele dos suínos. (A/B) G:C aumento de 10X e 40X; (C/D) G:O ₃ aumento de 10X e 40X; (E/F) G:UST aumento de 10X e 40X; (G/H) G:H aumento de 10X e 40X.....	58
Figura 23: Representação gráfica dos períodos inicial, intermediário e final dos grupos: controle, ozônio, ultrassom e híbrido, com erro padrão médio, delta de temperatura entre os grupos, inicial, intermediário e final	60
Figura 24: Captação termográfica A/B; Grupo híbrido e UST; C/D: Grupo O ₃ e controle, período inicial.	61
Figura 25: Imagens termográficas A/B; Grupo híbrido e UST; C/D: Grupo O ₃ e controle, período intermediário.....	61
Figura 26: Imagens termográficas: A/B; Grupo híbrido e UST; C/D: Grupo O ₃ e controle, período final.....	62
Figura 27: Representação gráfica da diferença de temperatura no período inicial, intermediário e final do grupo controle.	63
Figura 28: Representação gráfica da temperatura no período inicial, intermediário e final do grupo ozônio..	63
Figura 29: Representação gráfica da diferença de temperatura no período inicial, intermediário e final do grupo ultrassom.....	64
Figura 30: Representação gráfica da temperatura nos períodos: Inicial, intermediário e final do grupo híbrido..	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de classificação de fototipo.....	25
Tabela 2: Aplicabilidades do ozônio em desarmonias corporais, faciais e capilares.....	41
Tabela 3: Análise comparativa dos aspectos pigmentares e teciduais dos grupos experimentais.....	57
Tabela 4: Descrição da diferença de temperatura nos períodos: inicial, intermediário e final, para os grupos controle, ozônio, ultrassom e híbrido.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva
ERA	Área de radiação efetiva
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GC	Grupo Controle
GH	Grupo Híbrido
GO ₃	Grupo Ozônio
GUST	Grupo Ultrassom Terapêutico
HE	Hematoxilina-eosina
ISCO ₃	International Scientific Committee of Ozone Therapy
LOPs	Produtos de oxidação lipídica
NETD	Diferença de Temperatura Equivalente de Ruído
PMMA	Polimetilmetacrilato
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada.
RIV	Radiação infravermelha
ROI	Regiões de interesse
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
UST	Ultrassom terapêutico
UV	Radiação ultravioleta

1 INTRODUÇÃO

A tatuagem sempre foi algo bastante complexo, os significados dos desenhos, a forma de sua execução, raízes culturais em algumas sociedades e diferentes técnicas utilizadas foram modificadas de acordo com o tempo (Azevedo, 2018).

De 1960 a 1990, a tatuagem era uma prática quase que predominantemente masculina, mas alcançando popularidade favorecida pela imagem transmitida por muitos artistas, havendo uma alteração na percepção pública e nos dias de hoje as tatuagens estão relacionadas com a autoestima, expressão da individualidade e moda. A tatuagem pode ser definida como uma modificação corporal que se traduz na alteração do pigmento da pele (Elegino, 2014).

A American Academy of Dermatology (2004) identificou cinco tipos principais de tatuagens: traumáticas, amadoras, profissionais, cosméticas e médicas. Destas, as mais utilizadas visam correções estéticas e visuais de cicatrizes, melhorando a autoestima de pacientes vítimas de cirurgias traumáticas, como por exemplo, a mastectomia (Limbar, 2014).

As tatuagens profissionais são feitas com máquinas portadoras de agulhas vibratórias contendo pigmentos de várias cores e estes grânulos são depositados superficialmente na derme. As tatuagens amadoras são feitas com agulhas ou máquinas improvisadas com pigmentos não autorizados, tais como, tinta de caneta, carvão, fuligem. As tatuagens cosméticas são aplicadas em sobrancelhas, pálpebras como delineador, no contorno dos lábios, reconstrução de auréola mamária e no caso de cobertura de cicatrizes. São utilizados pigmentos marrons, preto, rosa e vermelho.

As tatuagens traumáticas são aplicadas quando o pigmento é depositado na pele por abrasão ou força resultante de explosão (asfalto, pólvora) que após o traumatismo confere uma coloração preta ou azulada ao tecido, e as tatuagens médicas são utilizadas em protocolos de radioterapia (Oliveira *et al.*, 2014).

As tatuagens resultam na introdução na epiderme e derme, de pigmentos insolúveis, que permanecem indefinidamente. O pigmento mais comum é o pigmento chinês, de cor preta, introduzido por agulhas que de acordo com a profundidade, a cor pode variar de preta a azulada (Hoffmann, 2011). A aplicação dos pigmentos através de agulhas com vibração retilínea penetra a epiderme camada mais superficial da pele e derme por ser a camada mais profunda, assim esses pigmentos permanecerão estáveis não sendo metabolizados e/ou eliminados pelo organismo mesmo com a ação das células da série branca com células permanentes como os macrófagos fixos (Teotonio, 2011).

As cores das tintas comerciais para tatuagem mostram que o titânio (Ti) e bário (Ba), tinta azul, preta e branca, alumínio (Al), tintas coloridas como o branco e amarela e cobre (Cu), tinta verde são predominantemente utilizados, os metais na composição e variáveis entre marcas e mesmo entre pigmentos semelhantes, as tintas são resultantes de dois grupos de substâncias, os pigmentos e os corantes, que constituem em mais de 50% do produto. Corantes são moléculas orgânicas e quando utilizados combinam-se com um estabilizador. Pigmentos podem ser constituídos de sais metálicos (óxidos, sulfetos, selenetos) ou moléculas orgânicas de diferentes tipos. Ao aplicar os pigmentos na pele eles tendem a se aglomerar e formar partículas insolúveis de diferentes tamanhos, podendo ser de 0,5 a 10 µm. No entanto, a injeção de corantes contendo metais podem causar alergias e inflamações cutâneas (Arl, 2018). No Brasil os materiais destinados para tatuagem e maquiagem definitiva deverão ser registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), segundo a Resolução da Diretoria Colegiada nº 55/2008 (Arl, 2018; Teotonio, 2011).

As tintas de tatuagem são aplicadas na derme e podem ser vistas graças à transparência da epiderme que recobre a derme. Técnicas para a sua remoção, datam desde 543a.c., desenvolvidas pelos gregos que realizavam abrasão seguida de aplicação de sais e produtos químicos. A dermoabrasão bastante utilizada visava a destruição local da pele e consequentemente a remoção do pigmento da tatuagem (Sampaio; Rivitti, 2018).

A cirurgia para a retirada das tatuagens é uma técnica que pode ser utilizada, porém podem deixar cicatrizes lineares devido ao procedimento, e é indicado em casos de tatuagens de grandes extensões ou em locais de difícil abordagem. Pode ser indicada em pacientes que apresentam reações alérgicas aos pigmentos utilizados (Pereira, 2020).

Uma técnica muito utilizada para a remoção das tatuagens é através do laser Nd-YAG, o mecanismo de remoção se dá a partir da liberação de pulsos de alta potência do raio laser, que tem duração extremamente curta (ns); então, ocorre fragmentação da tinta e as altas temperaturas formam ondas acústicas, e através da propagação dessas ondas ocorre destruição das estruturas adjacentes (cromóforo). O pigmento fica na derme, dentro dos fibroblastos e macrófagos. Depois da exposição ao laser, a produção de CO₂ e vapor d'água na derme causa o branqueamento da pele, o que explica a remoção da tinta em partes, sendo que outra parte do pigmento será fagocitada (CHACUR, R. et al, 2014).

Nos Estados Unidos um pigmento de tatuagens está sendo comercializado desde 1999, o Infinitink® (Freedom Ink, EUA), criado especificamente para obter melhor resposta ao tratamento na remoção com laser. Ele é composto de corantes bioabsorvíveis encapsulados em esferas de polimetilmetacrilato (PMMA), além de conter pigmentos adicionais para a absorção por determinados comprimentos de onda. Tatuagens criadas com Infinitink® podem ser removidas em tempo reduzido do que as tatuagens tradicionais (Oliveira, 2013).

A busca pela perfeição, sempre desafiou os profissionais da área da medicina estética, cirurgia e dermatologia, a buscarem métodos mais eficientes, menos invasivos e poucos efeitos adversos.

Destas novas técnicas a utilização do ozônio se mostrou promissora na decomposição de pigmentos pois se trata de um gás oxidante podendo ser aplicado em diferentes contextos clínicos (Turhan *et al.*, 2018).

O ozônio foi descoberto em 1840, por Christian Friedrich Schönbein, ao submeter água a uma descarga elétrica, sentiu um cheiro estranho e pungente, que ele chamou de ozônio. O ozônio é constituído por uma molécula formada

por três átomos de oxigênio e sua primeira aplicação clínica foi realizada durante a I Guerra Mundial para tratar soldados alemães afetados pela gangrena, devido a infecções microbianas por *Clostridium sp.* Seus benefícios e aplicações foram difundidos nos tratamentos de tuberculose, reumatismo, asma, gota e glaucoma sendo utilizado como forma de tratamento em alguns países em humanos. A ozônioterapia é muito estudada e utilizada na medicina, devido ao seu baixo custo e relativa facilidade em sua aplicação comparada as outras técnicas (Silva et al., 2018).

Outra técnica utilizada para a permeação de princípios ativos é o ultrassom terapêutico (UST) que possui capacidade de veicular substâncias na pele através da fonoforese. A fonoforese é a aplicação de transdermoterapia usada com gel ou óleo de acoplamento através do equipamento de UST potencializando a permeabilidade dos princípios ativos na derme. Esta técnica para se obter bons resultados depende da frequência, intensidade, duração, natureza do fármaco utilizado no tratamento (Machado, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudo preliminar para se avaliar novas metodologias de remoção de tatuagens e pigmentos cutâneos minimamente invasivos.

2.2 Objetivos específicos

I. Avaliar a técnica de aplicação do gás ozônio na pele de suíno tatuado visando a remoção do pigmento;

II. Avaliar a técnica de ultrassom terapêutico na pele de suíno tatuado visando a remoção do pigmento;

III. Avaliar a associação das técnicas, ozônio e ultrassom terapêutico, de forma simultânea (híbrido) na pele de suíno tatuado visando a remoção do pigmento;

3 HIPÓTESE

As técnicas aplicadas na rotina da Fisioterapia Dermatofuncional (ozônio, ultrassom terapêutico e ambas associadas) poderiam favorecer a despigmentação na pele tatuada?

4 JUSTIFICATIVA

A ocorrência de tatuagens obsoletas, alergias aos corantes e pigmentos utilizados e infecções após o procedimento da tatuagem são comuns e apresentam um impacto negativo nas pessoas. Os procedimentos utilizados para a remoção de tatuagens podem gerar, desconforto, dor, infecções e até mesmo cicatrizes. Das técnicas utilizadas a laserterapia é a mais utilizada podendo ser dolorida causando grande desconforto no local, deixando cicatrizes, além do alto custo. Das técnicas já consagradas e utilizadas na pele para tratamentos de feridas e lesões musculares, o ozônio e o ultrassom terapêutico são técnicas que apesar de possuírem mecanismos de ação distintos podem ser aplicadas juntas ou isoladas. Dos modelos animais para a experimentação, o suíno apresenta 78% de compatibilidade com a derme humana (Roppa, 2012), portanto sendo a espécie mais recomendada para este propósito visando técnicas minimamente invasivas e com baixos efeitos colaterais.

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Pele

O maior órgão do corpo humano é a pele, sendo responsável por cerca de 16% do peso corporal e tem como a principal função isolar as estruturas internas do ambiente externo, e é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme ou tela subcutânea. A camada externa da pele é a epiderme, sendo avascular com espessura de 75 a 150 μm , sendo de 0,4 a 0,6 mm de espessura na palma das mãos e planta dos pés, tendo como função principal: proteção com formação de barreiras, lubrificação de superfícies, absorção, secreção, transporte, recepção de sensações térmicas, tácteis e luminosas (Junqueira et al., 2023).

Constituída de células epiteliais achatadas sobrepostas que as considerando de dentro para fora, estão dispostas em; germinativa ou basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea conforme figura 1.

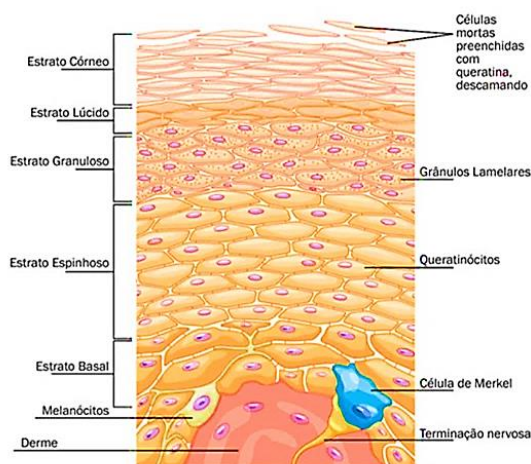


Figura 1: Distribuição das camadas da epiderme da pele humana pelo corte histológico. Fonte: Imagem adaptada de Unifal histologia interativa (2022).

Na camada mais interna células denominadas de queratinócitos se multiplicam e parte se desprende da camada basal e migram para a superfície, esse processo leva cerca de 28 dias, então as células vão sofrendo alterações e em cada camada que passam, uma quantidade de queratina vai se

acumulando, até perderem seu núcleo e na altura do estrato córneo onde as células são denominadas corneócitos sofrem seu processo de descamação natural (Bernardo et al., 2019).

A segunda camada é a derme sendo mais profunda, composta por tecido conjuntivo denso irregular. É uma camada cutânea presente entre a epiderme e o tecido subcutâneo, ricamente constituído por fibras de colágeno e elastina. É capaz de promover a sustentação da epiderme e tem participação nos processos fisiológicos e patológicos do órgão cutâneo. Sua espessura pode variar de 0,6 mm (regiões mais finas) até 3 mm, onde atinge sua proporção máxima, apresenta três regiões distintas: região superficial ou papilar, que mantém contato com a epiderme, é composta por tecido conjuntivo frouxo, com predominância de feixes de fibras colagenosas mais espessas onduladas e em disposição horizontal, possui pequenos vasos linfáticos e sanguíneos, terminações nervosas, colágeno e elastina, corpúsculo de meissner com a função de favorecer nutrientes (Tassinari, 2019; Oliveira, 2011).

A segunda camada é profunda ou reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, com fibras de colagenosas mais espessas em disposições horizontais, formada pela base dos folículos pilosos, glândulas, vasos linfáticos e sanguíneos, terminações nervosas, colágeno e elastina, essa camada fornece oxigênio e nutrientes para a pele; e a terceira região é a adventricial, circundada por folículos pilossebáceos, glândulas e vasos, sendo constituída por feixes finos de colágeno, e na derme estão presentes os anexos cutâneos como glândulas sebáceas e sudoríparas, pêlos e unhas (Tassinari, 2019; Oliveira, 2011).

Entre a epiderme e a derme, está presente a lâmina dermo-epidérmica, a qual permite que essas duas camadas estejam ancoradas, é sintetizada pela camada basal e tem como função ser uma barreira e filtro de nutrientes, entre as camadas (Tassinari, 2019).

A última camada é constituída pela hipoderme ou tela subcutânea, considerada um órgão endócrino, constituídas por adipócitos, tem as funções de armazenar reserva energética, proteger contrachocos, formar uma manta

térmica e modelar o corpo como apresentado na figura 2 (Tassinary, 2019). Em relação a avaliação microscópica as camadas celulares se encontram na figura 3, caracterizando todas as camadas epiteliais que compõem a camada da pele.

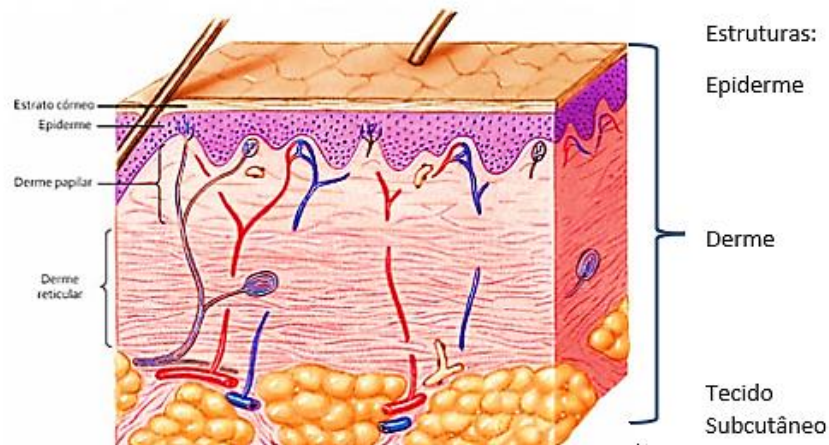


Figura 2: Divisão das camadas da pele e suas estruturas. Fonte: Imagem adaptada de Unifal histologia interativa (2022).

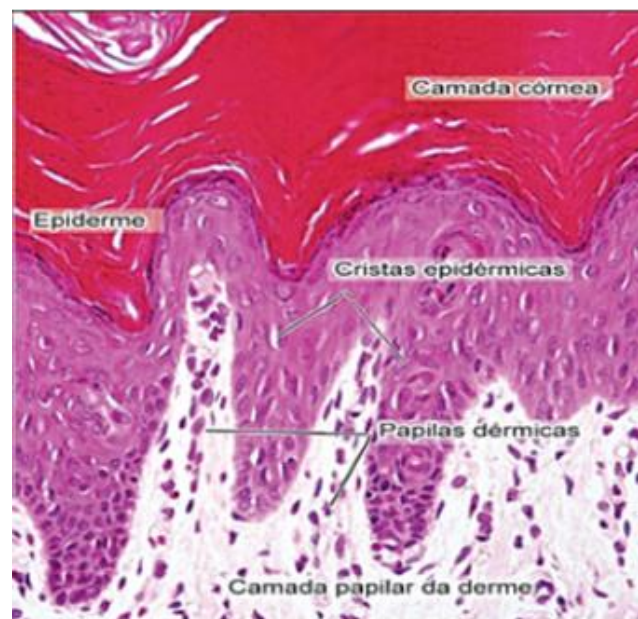


Figura 3: Imagem microscópica pele humana e suas divisões. Fonte: Imagem adaptada de Junqueira (2017).

Quando ocorre uma lesão superficial nas estruturas da pele, como o processo provocado na estrutura epitelial através da pigmentação da pele pela execução de uma tatuagem, ocorrerá inicialmente o processo de cicatrização devido a ruptura da pele com danos ao tecido e sua vascularização, levando a um sangramento, lesão de endotélio e o extravasamento de proteínas intravasculares e extravasculares. Este ambiente serve como um estímulo para hemostasia, inflamação e outros eventos (Martelli, 2016).

De 48 a 96 horas após o ferimento, os leucócitos predominantes nas feridas são os macrófagos que são derivados de monócitos extravasados, os macrófagos são essenciais para cicatrização de lesões. Eles executam diversas tarefas ao longo dos processos inflamatórios e na fase proliferativa da cicatrização de feridas (Martelli, 2016).

Os macrófagos, da mesma maneira que os neutrófilos, removem da ferida detritos através da fagocitose e secreção de proteases, servindo como uma fonte primária de diversas citocinas e fatores de crescimento, os macrófagos são necessários para apoiar o recrutamento e ativação celular, a síntese da matriz extracelular, a angiogênese e a remodelação, além da estimulação da formação de fibroblastos, síntese de colágeno e a neoformação de vasos sanguíneos na ferida. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos permanecem dentro de um ferimento até a sua cura completa (Medeiros, 2016).

No processo de reepitelização, a restauração do epitélio começa precocemente no processo de cicatrização, mas não é facilmente perceptível até vários dias após a lesão. A reepitelização restabelece a barreira externa que minimiza as perdas de líquidos e a invasão bacteriana. O processo de reepitelização começa com espessamento da epiderme ao longo das bordas da ferida (Neves, 2015).

As células basais nas margens da ferida se alongam emitindo prolongamentos à semelhança de pseudópodes, e os hemidesmosomos que as unem são desfeitos, bem como a laminina da camada basal, permitindo a migração das células epiteliais. Os movimentos migratórios são facilitados pela expressão de novas integrinas na superfície celular e a produção de actino-

miosina nos miofibroblastos, que induzem o mecanismo de contração das feridas, também contribui para a progressão de células através da ferida em cicatrização. As células epiteliais são capazes de secretar metaloproteinase para quebrar a fibrina, facilitando o processo de migração celular (Junqueira, 2017).

O movimento das células basais ocorre paralelamente à orientação das fibras de colágeno presentes na ferida, fenômeno conhecido como “guia por contato”. As células epiteliais continuam a proliferar e migrar até que encontrem as células da borda oposta da ferida, quando é concluído o fenômeno migratório. Uma nova camada de epitélio é criada e as células se diferenciam, transformando de células alongadas em cuboidais, com aparência de células basais, quando novamente são unidas através de hemidesmossomos na membrana basal da pele. A proliferação celular subsequente leva ao restabelecimento da epiderme com múltiplas camadas celulares (Martelli, 2016).

Os eventos da reepitelização são influenciados por sinalizações intercelulares, fatores do crescimento e pelas condições metabólicas intrínsecas da própria ferida. A baixa tensão de oxigênio que ocorre após a lesão estimula a produção de TGF- β (Fator de crescimento transformante beta ou transforming growth fator beta) que ajuda a diferenciação das células epiteliais permitindo a migração e mitogênese. O TGF- β e o KGF, Keratinocyte Growth Factor ou fator de crescimento de queratinócitos, estimulam diretamente a replicação celular. Em uma etapa posterior, o contrário ocorre quando há a angiogênese: a elevada tensão de oxigênio estimula a diferenciação de células epiteliais, para completar os eventos da reepitelização, denominada fase proliferativa do 3º dia após lesão, estendendo-se por três a quatro semanas (Medeiros, 2014).

Em relação a pigmentação melânica da pele há dois tipos: a cor intrínseca da pele, geneticamente determinada e imutável; e a facultativa, decorrente da ação dos raios solares e dos hormônios, que é mutável. Esta, quando estimulada pelos raios solares ou UV artificialmente produzidos (Azulay, 2017).

Chama-se unidade melanina-epiderme o conjunto constituído funcionalmente por um melanócito e cerca de 36 queratinócitos. O funcionamento dessas unidades que dependem a cor genética da pele e a cor facultativa, pois os melanócitos fabricam grânulos, os melanossomos, que sofrem a melanização por meio da tirosinase, pela oxidação da tirosina, leva à formação da melanina; os melanócitos injetam, por meio de seus dendritos, os melanossomos no interior dos queratinócitos que os incorporam. Com a maturação dos queratinócitos, os melanossomos são eliminados (Azulay, 2017).

Em decorrência dos diferentes padrões de resposta à radiação determinadas geneticamente, criou-se uma classificação dos vários fotótipos de pele (classificação de Fitzpatrick), que até certo ponto é arbitrária, porém de grande valor prático (Azulay, 2017).

Tabela 1: Tabela de classificação de fototipo.

Fototipo	Cor da pele	Cor dos cabelos	Cor da iris
Fototipo I	Muito clara	Louros	Azuis
Fototipo II	Clara	Ruivos	Azuis/verdes
Fototipo III	Moreno claro	Castanho claro	Castanho Claro
Fototipo IV	Castanho escuro	Castanho escuro	Castanho escuro
Fototipo V	Pardo	Castanho escuro	Castanho escuro
Fototipo VI	Negro	Negro	Negro

Fonte: Adaptada de Dermatologia de Fitzpatrick (2018).

5.1.1

5.1.2 Pele suína

5.1.2.1 *Epiderme*

A camada externa da pele, a epiderme, é um epitélio escamoso estratificado avascular que praticamente não apresenta terminações nervosas, em sua maioria, a epiderme pode ser dividida em várias camadas histológicas (Bacha, 2012).

De profunda a superficial, essas camadas são: (1) uma camada de células cuboides ou colunares em mitose ativa, o estrato basal, segue o contorno da derme subjacente, a qual é firmemente justaposta; (2) o estrato espinhoso, que tem aparência espinhosa devido aos desmossomos (pontes intercelulares) que conectam as células adjacentes; (3) o estrato granuloso, composto por células fusiformes com grânulos de cerato-hialina basofílica; (4) o estrato lúcido, variavelmente presente, composto por células que se coram pouco; (5) o estrato córneo, formado por camadas de células achatadas mortas. A presença e a espessura relativa de cada camada são refletidas na espessura total da pele (Bacha, 2012).

As células do estrato basal sofrem divisão mitótica, que empurra as camadas mais superficiais para ainda mais longe dos vasos sanguíneos da derme subjacente. Com o aumento da distância da fonte de nutrientes, as células se achatam e morrem, deixando uma camada densa de seu constituinte primário, a proteína fibrosa queratina. O ressecamento e o endurecimento das células superficiais, processos chamados de queratinização e cornificação, tornam a superfície cutânea mais firme e resistente à desidratação. Conforme o estrato basal continuamente adiciona células às camadas sobrepostas, o estrato córneo se desprende e é substituído (Kardong, 2016).

5.1.2.2 Derme

A epiderme forma uma lâmina ondulada com projeções semelhantes a dedos, as pregas epidérmicas, que se projetam no tecido conjuntivo subjacente, a derme. A derme apresenta cristas e projeções mamilares (as papilas dérmicas), que formam interdigitações com a epiderme suprajacente (König, 2021). A interface entre as pregas epidérmicas e as papilas dérmicas aumenta a área superficial para a formação de uma junção forte entre essas duas camadas. A derme dispõe de artérias, veias, capilares e vasos linfáticos da pele. As fibras nervosas sensoriais, além de suprir a derme, podem se estender por uma pequena distância até a epiderme (König, 2021).

A cor da pele se deve aos grânulos de pigmento gerados no citoplasma das células pigmentares residentes, os melanócitos, essas células no estrato basal produzem o pigmento, a melanina, de cor castanha, castanho-amarelada ou preta (Kardong, 2016).

Os pacotes de melanina são fabricados pelos melanócitos e transferidos para as células circundantes da epiderme. O mesmo processo incorpora pigmento nas células que formam os pelos. A expressão de diferentes cores na pele e no pelo, provém principalmente da quantidade relativa de melanina produzida nos melanócitos, e não de diferenças no número de melanócitos ou da presença de outros pigmentos como demonstrado na Figura 4 (Kardong, 2016).

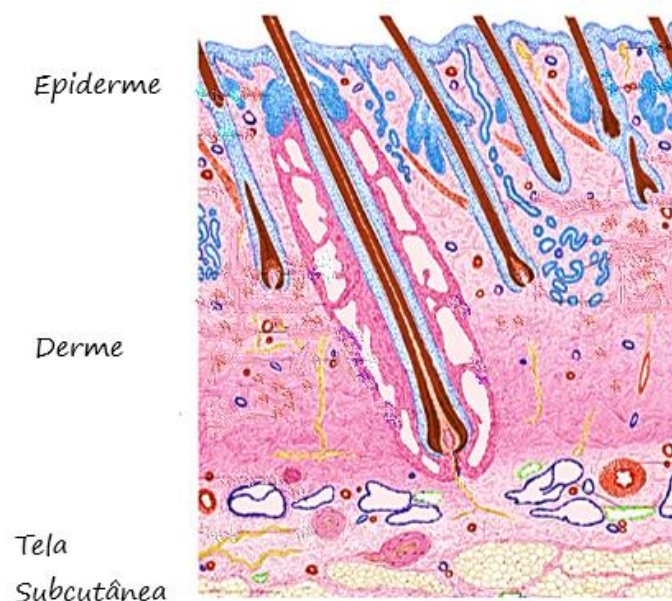


Figura 4: Estrutura tecidual das camadas da pele suína e suas estruturas. Fonte: Adaptação de König (2021).

5.2 Tatuagem

As tatuagens mais antigas foram identificadas em uma múmia com 5.300 anos, encontrada em 1991, em uma região glacial nos alpes da Áustria. O corpo de Ötzi, como ficou conhecido, estava coberto com mais de 50 tatuagens produzidas por incisões finas, os cientistas consideraram que as tatuagens estavam relacionadas aos rituais religiosos e terapêuticos, tatuagens associadas a nobreza e fertilidade foram identificadas em múmias egípcias femininas. Na sociedade romana e grega, as tatuagens serviam para identificar escravos, criminosos e grupos religiosos (Azevedo, 2018).

No Brasil a tatuagem profissional foi introduzida em 20 julho de 1969, pelo dinamarquês Knud Harld Likke Gregersen ou popularmente conhecido como Lucky Tattoo ou Mr. Tattoo, que desembarcou no porto de Santos trazendo a primeira máquina elétrica de tatuagem do Brasil em sua mala. Ele se instalou próximo ao porto de Santos, e seu estúdio possuía um slogan com um público alvo bem definido: "It's not a sailor if he hasn't a tattoo", "não é um marinheiro se não tiver uma tatuagem". Com um número impressionante de 45 mil pessoas tatuadas, o sr. Lucky Tattoo faleceu em 17 de dezembro de 1983, aos 55 anos de idade, em Arraial do Cabo – RJ, vítima de ataque cardíaco. No Brasil, O dia 20 de Julho é comemorado o dia do tatuador, em homenagem ao grande Sr. Luck Tattoo e sua chegada ao Brasil (Lise *et al*, 2013).

O termo "tatatau" ou "tattau" foi devido ao som produzido pelos instrumentos usados na produção das tatuagens dando a origem ao termo inglês "tattoo" atualmente usado. Esta prática foi utilizada pelos europeus, sendo inicialmente adotada por marinheiros, mineiros e militares. A tatuagem ainda foi associada a grupos marginalizados após a 2ª Guerra Mundial e a pessoas que estiveram em encarceramento na cadeia pertencentes a gangues ou a circos itinerantes (Elegino, 2014).

A tatuagem é uma modalidade de desenhos artísticos feitos na pele do corpo que vem crescendo ao longo dos anos, sendo aceita por pessoas de

diferentes idades, gênero ou realidade social. Apesar de muitos anos a tatuagem foi vista como um ato de delinquência e irresponsabilidade, hoje em dia é cada vez mais aceita em diferentes contextos. No entanto, esta prática vem despertando grande preocupação para pessoas que apresentam algum tipo de alergia ou infecção após a prática (Elegino, 2014; Teotônio, 2011).

Grande parte dessas alergias podem ser causadas pelos metais presentes nas tintas, tais como, alumínio (Al), bário (Ba), cobre (Cu), ferro (Fe), estrôncio (Sr), cádmio (Cd), manganês (Mn), chumbo (Pb), antimônio (Sb) e vanádio (V) (Teotônio, 2011).

No Brasil os materiais usados para tatuagem e maquiagem definitiva deveram ser registrados na ANVISA de acordo com a RDC 55/2008. A composição das tintas de tatuagem varia de acordo com o fabricante, e na sua maioria são misturas complexas compostas por veículos (água, glicerina e outros derivados oxigenados), aditivos (polímeros, surfactantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), nanopartículas (NP) e polímeros) e pigmentos (complexos orgânicos ou inorgânicos e NP) (HØGSBERG et al., 2011).

Os pigmentos empregados nas tintas de tatuagem podem ser orgânicos, compreendendo pigmentos azoicos, hidrocarbonetos aromáticos contendo heteroátomos (nitrogênio (N), oxigênio (O) ou cloro (Cl)) ou grupos funcionais (amina, amida, 25 hidroxila, etc.) ou complexos de centros metálicos e ligantes orgânicos. Já com a tinta preta, ela é formada com a combustão incompleta de hidrocarbonetos e é composta basicamente por nanopartículas de carbono (C) e a tinta branca é formada basicamente por dióxido de titânio (TiO₂) (Høgsberg et al., 2011, 2013; Regensburger et al., 2010).

Os pigmentos inorgânicos são geralmente óxidos metálicos, como por exemplo, óxido de alumínio e óxido de titânio, que são adicionados intencionalmente como nanopartículas para criar base ou efeitos de cor (Laux et al., 2015).

Misturas entre pigmentos orgânicos e metais são comumente utilizados para criar diferentes matizes, brilho ou tom das cores (Forte et al., 2009). As concentrações destes elementos podem ser consideradas bastante elevadas,

uma vez que as tintas de tatuagem são misturas toxicologicamente indefinidas com pureza de pigmentos inferiores a 80% (Engel et al., 2010). Os pigmentos são desenvolvidos para utilização em indústrias de tintas, vernizes ou plásticos (Laux et al., 2015) e alguns estudos retratam a similaridade das matizes de cores em tintas para diversas utilizações como esmalte, serigrafia e pôr fim a tatuagem (Bentlin; Pozebon; Depoi, 2009).

Em relação ao processo profissional de tatuar, o pigmento é depositado na parte superior e média da derme através de pequenas agulhas vibratórias adaptadas a uma máquina elétrica manual, que perfuram a pele com uma profundidade inicial até 2 milímetros, a cerca de 30 Hertz. Após a introdução da tinta, um processo inflamatório é desencadeado com afluxo de células inflamatórias e descamação epidérmica, expondo as camadas basais. Na tentativa de eliminar a substância estranha introduzida na pele, os macrófagos dérmicos incorporam e fagocitam o pigmento, a maioria destes migram através dos vasos linfáticos para os gânglios regionais e as outras células que incorporaram o pigmento, como fibroblastos, queratinócitos, e uma escassa percentagem de pigmento extracelular constituem a tatuagem permanente (Limbar, 2014).

Estudos indicam que a concentração de pigmento na pele imediatamente após a tatuagem varia de 0.60 a 9.42 mg/cm², em média 2.53 mg de pigmento em cada cm² da pele tatuada. Esta concentração advém do tipo de tinta usada e da quantidade inoculada e coincide com a forma da agulha e número de pontas (Hogsberg, 2013).

Meses ou anos após a tatuagem, a maior parte do pigmento desaparece estimando-se um decréscimo de 87 a 99%. Esta diminuição será provocada, não só pela migração linfática e eliminação de alguns pigmentos durante a cicatrização, mas também pela decomposição do pigmento após exposição solar repetida. Até ao momento, não há dados sobre a potencial localização de produtos ou subprodutos da tinta em outros órgãos (Wenzel, 2013).

Os riscos associados ao processo de tatuagem mais comuns são: reações inflamatórias exacerbadas, difusão subcutânea da tinta, hipersensibilidade, reações alérgicas, granulomas, reações liquenóides,

pseudolinfoma cutâneo, infecções secundárias bacterianas, viróticas, fúngicas e parasitárias, além de vários tipos de neoplasias cutâneas que foram identificadas após a tatuagem, alguns dos metais como chumbo, cádmio, cromo, níquel, titânio entre outros metais pesados encontrados na tinta preta são potencialmente cancerígenos (Kluger, 2013).

Estudos demonstraram que o carbono preto aumenta a frequência de mutação após exposição à radiação ultravioleta (UV) crônica a uma concentração sub-citotóxica. Por isso, carbono preto, mercúrio e sais de cobalto são classificados pela comissão europeia como possíveis cancerígenos, enquanto o cádmio e os seus compostos derivados são cancerígenos (Kluger, 2013). Por esta razão os pigmentos metálicos foram substituídos por substâncias orgânicas, principalmente compostos azoicos (Bittencourt, 2013).

O corpo é um objeto com que podemos expressar nossa singularidade e experiências de vida. A tatuagem pode ser considerada expressão dessas experiências ou da personalidade do indivíduo, mas é similar a uma cirurgia pois são realizadas com instrumentos adequados que deixa uma marca ou cicatriz permanente no corpo (Limbar, 2014).

Após a realização da tatuagem há uma ocorrência de 7 a 17% dos indivíduos lamentando da decisão tomada e muitos procuram aconselhamento para a sua remoção. Entre as razões mais apontadas estão a insatisfação com o resultado, a deformação da tatuagem que acompanha a mudança corporal e, em 5,2% o desvanecimento ou alteração da cor. A remoção da tatuagem, embora pareça a solução é, no entanto, um problema, apesar dos avanços tecnológicos a remoção é um processo difícil e exaustivo, que envolve geralmente vários tratamentos, com custo elevado deixando cicatrizes (Pereira, 2018).

5.3 Ultrassom Terapêutico (UST)

A medicina regenerativa utiliza recursos eletrofísicos como o ultrassom terapêutico (UST) que é empregado na prática clínica há mais de 60 anos com

a finalidade de promover analgesia, tratar lesões musculoesqueléticas e em tecidos moles (Bem et al., 2010).

No tratamento com ultrassom ocorrem vibrações de alta frequência devido as ondas ultrassônicas levando a propagação de uma onda longitudinal, onde as partículas vibram paralelamente à direção em que a onda é propagada (Bem et al., 2010).

Essas vibrações são conduzidas ao cabeçote, o qual é constituído com um cristal piezelétrico, que ao receber a corrente elétrica, muda a sua espessura na mesma frequência das oscilações elétricas recebidas resultando na emissão de ondas ultrassônicas. O ultrassom terapêutico pode ser encontrado em frequências de 1,0 a 3,0MHz, dependendo da profundidade a ser alcançada, UST de frequência 1MHz alcança entre 2,5 e 5,0 cm, o de frequência 3MHz varia entre 0,8 e 1,6 cm (Vasconcelos, 2021).

O modo de emissão da onda ultrassônica pode ser contínuo ou pulsado. No primeiro caso, há uma saída constante do feixe ultrassônico com ciclo de funcionamento de 100%, neste caso não há interrupções ocorrendo uma predominância do efeito térmico, consequentemente aumentando a permeabilidade da membrana. O efeito térmico causa aumento do metabolismo local. O modo pulsado, o ciclo é interrompido por alguns instantes e por isso a liberação de calor não é tão intensa diminuindo o efeito térmico (Kuhle; Oliveira, 2015).

A energia terapêutica é gerada por um transdutor que transforma a energia elétrica em energia mecânica através do cabeçote do equipamento que ao ser acoplado na pele, essas ondas mecânicas serão emitidas e propagadas somente em contato com um meio. As vibrações geradas causam uma agitação celular ocorrendo a ruptura de suas membranas (Borges, 2012).

Uma das técnicas de aplicação do ultrassom é feita através do contato direto, indicado quando a superfície é plana, sem muitas irregularidades, onde o cabeçote consegue ter bastante contato com o tecido. Deve ser usado com gel a base de água para um melhor acoplamento e propagação da onda acústica com os movimentos feitos em forma de círculos, lentamente e de forma uniforme (Matiello, 2018).

A onda sônica favorece a liberação de ativos com o aumento do fluxo quando são aplicados para a finalidade terapêutica aumentando a liberação localizada tópica ou em tecidos-alvo através da pele, pois a força acústica de baixa frequência também é utilizada na promoção do aumento da permeabilidade da pele, facilitando assim a permeação de macromoléculas, aumentando a permeabilidade celular permitindo a passagem de substâncias entre o meio extracelular e intracelular devido ao efeito mecânico da cavitação, fenômeno que permite introduzir ativos através da pele (Figura 5), processo denominado de fonoforese ou sonoforese (Azagury, 2014).

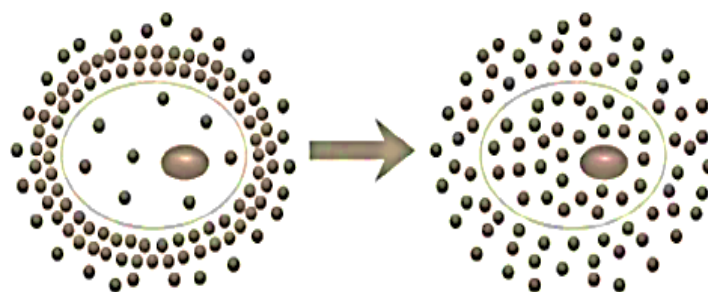


Figura 5: Efeito da fonoforese devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular gerando fusão de ativos para o interior da célula. Fonte: de Fancy Tapis/Shutterstock.com.

Estudos mostraram que a permeação do ativo através da fonoforese em ensaios *in vitro* evidenciaram que inúmeros ativos foram absorvidos pela pele e que a vibração sonora de alta frequência tem a finalidade de acelerar esse processo na permeação cutânea aumentando a taxa de absorção (Tassinari, 2018).

Apesar de ser uma técnica extremamente segura, apresenta algumas contraindicações, tais como, tumores, feridas abertas, diabetes descompensada, insuficiência vascular, pacientes com uso de marca-passo, pacientes com tais condições não devem realizar o tratamento com UST para que não agravem seu quadro. Além disso, não se deve realizar a aplicação na região dos olhos e glândulas (Siqueira, 2014).

Quanto ao tempo de tratamento, ele está diretamente relacionado ao tamanho da área de aplicação e a área de radiação efetiva (ERA). Para obter o

valor da área da região tratada, basta medi-la com uma fita antropométrica. A área de radiação efetiva, por outro lado, depende do aparelho, que é definida como a região da superfície do transdutor do equipamento que gera a onda ultrassônica. O tempo de aplicação é calculado dado pela divisão da área (cm²) tratada pela ERA (área de radiação efetiva), quanto à intensidade da onda ultrassônica, esta varia de acordo com a região aplicada e o modo de emissão, quando o modo de emissão é contínua a intensidade gira em torno de 1 W/cm², atingindo o máximo de 2 W/cm² (Da Rosa, 2018).

$$T = \frac{b \cdot h}{ERA}$$

Figura 6: Equação de tempo, e área de radiação efetiva do ultrassom.

Como consequência da aplicação do ultrassom e permeação das ondas ultrassônicas no tecido, aumentam o fluxo sanguíneo acarretando um aumento do suprimento de oxigênio e, conseqüentemente, no aumento do metabolismo local (figura 7). Concomitante ao aumento de metabolismo local, o efeito tixotrópico, no qual o ultrassom é capaz de transformar substâncias sólidas em géis, ou géis em formas mais líquidas (Matiello, 2018).

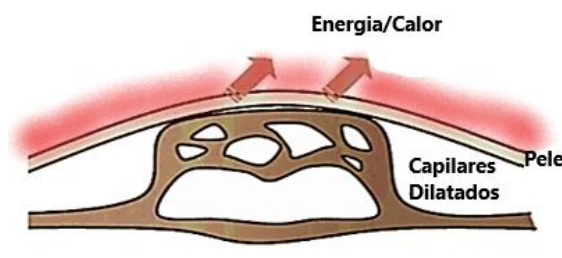


Figura 7: Aumento da temperatura local devido a produção de calor. Fonte: Imagem adaptada de eletroterapia corporal e facial básica (2018).

5.3.1 Aplicação da técnica ultrassônica na prática clínica

Na prática clínica para desarmonias corporais e faciais o ultrassom terapêutico é indicado para o tratamento de gordura localizada e de fibroedema gelóide (celulite). Por causar aumento da permeabilidade da membrana celular, podemos utilizar ativos que causam lipólise e vasodilatação, sendo possível ser aplicado no pós-operatório de cirurgia plástica favorecendo uma melhor cicatrização tecidual, drenagem de edemas e aumentando as atividades dos fibroblastos (da Rosa *et al.*, 2018).

O ultrassom é uma técnica indolor e não invasiva, aplicado com uma substância acopladora (hidrogel) no transdutor que deve ser posicionado de forma perpendicular à pele. A técnica pode ser realizada de acordo com o objetivo do tratamento, na prática totalizando um número de 10 a 15 sessões para obter o efeito desejado (Vasconcelo, 2021).

5.4 Ozônio

Em 1785 ocorreu o primeiro contato humano com o ozônio por meio de experimentos, quando o físico e filósofo holandês Martin Van Marum (1750-1837), submeteu o oxigênio as descargas elétricas geradas por uma máquina eletrostática, sem perceber o físico estava "gerando" ozônio, o qual descreveu como "odor de matéria elétrica" sem investigar o que havia ocorrido (Crosland, 1970).

Em 1840 o ozônio veio a ser descoberto por Christian Friedrich Schonbein (1799-1868), que trabalhava repetindo o experimento de Martin Van Marum, com uma pilha voltaica na presença de oxigênio, a pilha então formou o arco elétrico gerando uma descarga elétrica, fazendo surgir um gás com um cheiro pungente característico, que Schonbein nomeou de ozônio (do grego ὄζειν "ozein" – cheiro) (Schonbein, 1840).

Após a descoberta o primeiro gerador de ozônio foi construído vinte anos depois em 1857, pelo inventor alemão Weber von Siemens, na época o gerador se tratava de um tubo de indução de oxigênio, formado por duas placas de eletrodo interpostas com alta tensão que gerava o ozônio na presença de oxigênio, sendo altamente reativo (Bocci, 2011; Kawahara, 2020).

O ozônio (O_3) também pode ser encontrado na estratosfera terrestre, que está de 30 a 50 km de distância da superfície terrestre, onde ele atua como uma camada protetora, absorvendo parte da radiação UV que é emitida pelo Sol nos comprimentos de onda entre 100–280nm (Chapman, 1930), desta forma oferecendo proteção aos organismos biológicos que habitam o planeta (Bocci, 2011).

Na região da estratosfera o ozônio é gerado naturalmente por meio dos raios UV que incidem sobre o oxigênio ambiente, sendo que uma série de fatores, como temperatura e pressão, agem influenciando para a decomposição do O_3 ocorra rapidamente através da reação exotérmica voltando ao estado natural de moléculas de oxigênio (O_2) e a formação de subprodutos com um grande potencial oxidativo (Bocci, 2011).

Formado por 3 átomos de oxigênio ligados covalentemente o ozônio apresenta massa molecular de 48 g/mol em comparação a molécula diatômica de oxigênio, com massa molecular de 32 g/mol (Wfot, 2020).

O gás ozônio proveniente de geradores costuma ter suas concentrações expressas em mg/L, $\mu\text{g/mL}$, g/m^3 e ppm, sendo que $1 \text{ ppm } O_3 = 0,002 \mu\text{gO}_3/\text{mL}$ (Bocci, 2011).

Para que se possa especificar a dosagem do gás ozônio em um sistema, um dos métodos utilizados é por meio do cálculo da quantidade em massa de ozônio entregue ao sistema (Rakness et al., 1996), através da concentração

(C) de ozônio [$\mu\text{g/mL}$ ou mg/L] multiplicada pela taxa de fluxo de gás Q [L/min], resultando assim na taxa de produção de ozônio (TO_3), em massa por tempo [mg/min], sendo:

$$\text{TO}_3 = C \times Q \quad (1)$$

Quando se obtém o tempo (t) [min ou h] de exposição ao gás ozônio, é possível expressar a quantidade de ozônio em massa (mO_3) [mg ou g] inserida no sistema, assim:

$$\text{mO}_3 = \text{TO}_3 \times t \quad (2)$$

A Dosagem de Ozônio Aplicada também pode ser expressa em mg/cm^2 , ao se dividir a quantidade de ozônio em massa (mO_3) pela área da superfície exposta ao gás ozônio, dada em cm^2 (Van Leeuwen, 2015).

5.5 O mecanismo de ação do ozônio em organismos e tecidos biológicos.

A ozonioterapia consiste na terapia que utiliza uma mistura gasosa com 5% de ozônio (O_3) e 95% de oxigênio medicinal (O_2) aplicado em tecidos biológicos obtendo alguns efeitos, tais como, imunomodulador, analgesia, anti-inflamatório para várias alterações celulares, a técnica pode ser usada de forma isolada em determinados casos, em conjunto com outras técnicas convencionais ou não, como no caso da medicina integrativa (Kawahara, 2020).

Os efeitos biológicos do O_3 envolvem o conhecimento sobre o balanço redox, estresse oxidativo e sua correlação com as patologias acometidas, independente da causa ou tempo de evolução. Muitos dos estímulos celulares que o ozônio promove revertem ou atenuam justamente esses mecanismos, levando ao restabelecimento da homeostase celular (Bocci, 2011).

Administrado por diferentes vias, tais como, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa (auto-hemoterapia maior e menor), intraperitoneal, intradiscal, insuflação retal e vaginal, tópico, miofascial (Fernandes; Lima; Zângaro, 2014).

Os mecanismos de ação do ozônio que ocorrem no plasma sanguíneo, são dois: reação imediata com a produção de espécies reativas de oxigênio

(EROs), formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aldeídos, ozonídeos e em segundo, a lipoperóxidos que são produtos de oxidação lipídica (LOPs). Estes produtos, com a atividade de radicais livres, são capazes de induzir a resposta a partir de mecanismos endógeno-enzimáticos (di Mauro, 2019), em leucócitos, macrófagos e neutrófilos (Diaz, 2015), na medula óssea, promovem a liberação de células tronco, regulação das enzimas antioxidantes e citocinas (Bocci, 2015).

As dosagens baixas (10 a 40 $\mu\text{g/mL}$) apresentam efeitos imunomoduladores e são utilizadas em doenças de comprometimento do sistema imunológico, como por exemplo em câncer e idosos debilitados. Dosagens médias (40 a 60 $\mu\text{g/mL}$) além de imunomoduladoras também estimulam enzimas antioxidantes do sistema de defesa, são aplicadas em doenças crônico-degenerativas, como diabetes, doença pulmonar obstrutiva (DPOC), síndrome de Parkinson, Alzheimer e demência senil, com efeito inibitório sobre os mecanismos, que ocorrem em doenças autoimunes, como artrites reumatóides, e lúpus, e dosagens altas (60 a 80 $\mu\text{g/mL}$) são especialmente empregadas em úlceras infectadas e na preparação de óleo vegetal e água ozonizada (International Scientific Committee of Ozone Therapy – ISCO₃, 2020).

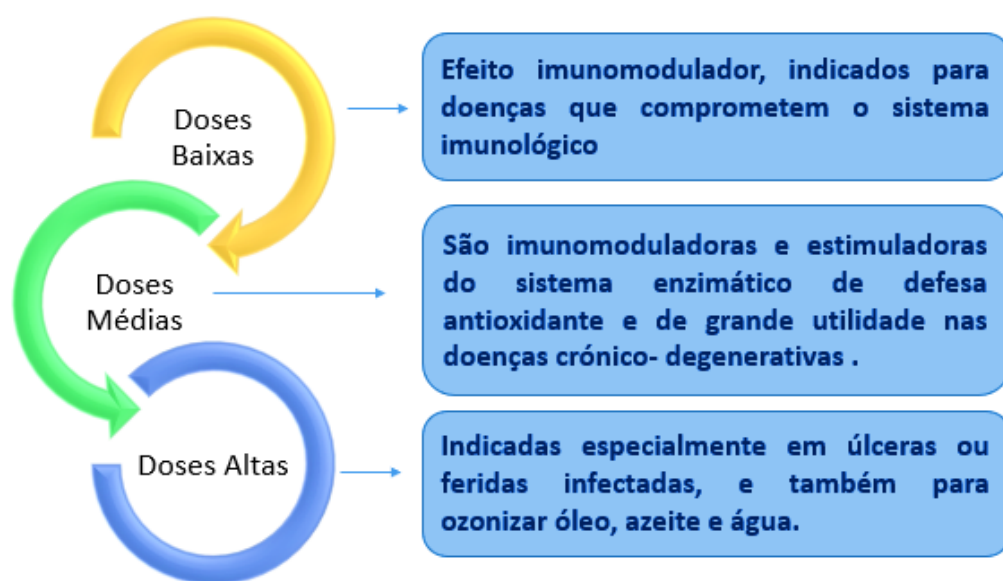


Figura 8: Indicações utilizadas para tratamentos. Fonte: Adaptado de ISCO₃ (2020).

As concentrações utilizadas, por vias subcutâneas são baixas, variam de 5 a 20 ug/mL, e volume de gás O₃ de 1 a 5 mL, por punctura, e empregada nas desarmonias estéticas (ISCO₃, 2020) (Tabela 2).

Tabela 2: Aplicabilidades do ozônio em desarmonias corporais, faciais e capilares.

AFECCÇÃO	CONCENTRAÇÃO	VOLUME
Gordura localizada	20 mcg	200 ml (1 a 5 ml/ponto)
Fibroedema gelóide (FEG)	5 a 20 mcg	200 ml (1 a 2 ml/ponto)
Flacidez Tissular	20 mcg	200 ml (1 ml/ponto)
Estrias	10mcg	200ml (1 ml/ponto)
Fibrose	20mcg	200 ml (5 ml/ponto)
Acne	10 mcg	60 ml (1ml/ponto)
Rugas	1 –2 mcg	0,5 - 1,0 (ponto)
Alopecia	10mcg	60ml (1 ml/ponto)
Disfunções capilares	10mcg	60 ml (1ml/ponto)

Fonte: Adaptada de ISCO₃ (2020).

No Brasil a Portaria MS nº 702, de 21 de março de 2018, trata a respeito da utilização do ozônio, como prática complementar e posteriormente no mesmo ano foi incluído, na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares - PNPIC no SUS (Portaria Nº 971 de Maio de 2006), através da Portaria 1.988, de 20 de dezembro de 2018, que atualizou os procedimentos e serviço especializado de Práticas Integrativas e Complementares e Procedimentos, Medicamentos, Órteses, Próteses e Materiais Especiais do SUS, e no Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018).

Diante de tantas aplicações o ozônio tem sido utilizado para o tratamento de retirada de poluentes químicos em água, como corantes e pigmentos utilizados em indústrias têxteis, caracterizando sua ação catalítica nestes agentes químicos, mostrando-se eficaz na degradação de alguns tipos de metais presentes em tintas utilizadas para o tingimento de tecidos como o zinco, (Zn) e cobre (Cu), sulfatos, nitrato de prata (Ag) e óxido de cromo (Cr) (Zhang, 2009).

Esses metais presentes também nos pigmentos inorgânicos que são geralmente constituídos por óxidos, cromatos e sulfatos de metais, muitos deles tóxicos (chumbo (Pb), cromo (Cr), cobalto (Co), antimônio (Sb) e cádmio (Cd), que conferem diferentes tonalidades de cor às tintas, e são utilizadas nos procedimentos de tatuagens corporais (Teotonio, 2011).

Ainda não há registros sobre a ação do poder oxidante e catalítico do ozônio em pigmentos em tecidos biológicos, porém devido as suas diversas áreas de utilização, pode ser mais uma possibilidade de tratamento dermatológico para a degradação desses agentes na pele.

5.6 Termografia

A temperatura da pele do corpo humano é um bom indicador de saúde, embora as diferenças de temperatura entre um indivíduo saudável e um doente sejam relativas (Duarte, 2020). O primeiro uso do diagnóstico térmico foi realizado por Hipócrates em 480 a.C. ao aplicar argila na região abdominal de um paciente observando que a região onde a argila secaria primeiro seria um indicativo de patologias.

Até o início do século XIX, ninguém suspeitava da existência da porção infravermelha do espectro eletromagnético. Em 1777, Marsilio Landriani, através de um experimento com prisma de Newton, observou o aumento de temperatura em cada cor do espectro visível. Essa teoria iria ser confirmada por William Herschel, em 1800, seguindo o mesmo experimento colocando um termômetro em cada cor do espectro. Herschel notou que, movendo o termômetro para a região escura além do extremo vermelho do espectro, o aquecimento continuava aumentando. O ponto máximo de aumento da temperatura estava muito além da última porção vermelha visível o que hoje conhecemos como ondas de infravermelho (Adam *et al.*, 2017; Carvalho; Pereira; Fernandes, 2014; FLIR, [s. d.]).

John Herschel, em 1840 fez uma impressão de imagem térmica expondo o calor padrão em filme fino de óleo apresentando uma imagem térmica pela luz refletida, onde os efeitos de interferência do filme de óleo tornavam uma

imagem visível aos olhos. John também registrou uma imagem térmica no papel, denominada de "termógrafo" (FLIR, [s. d.]; Scientific Papers, 2013).

A radiação infravermelha (RIV), presente no espectro eletromagnético é emitida por qualquer corpo que esteja acima do zero absoluto. A RIV é dividida arbitrariamente em regiões de comprimento de onda, denominado banda espectral. As bandas espectrais incluem o infravermelho próximo (0,75 a 3 μm), infravermelho médio (3 a 6 μm), o infravermelho longo (6 a 15 μm) e o infravermelho extremo (15 a 100 μm) (Dold, 2016; FLIR, [s. d.]).

Processos inflamatórios e tumores, são condições que sofrem diferença de temperatura, na pele e regiões adjacentes, no caso de um tumor as células são maiores que as células normais, portanto, precisam de mais energia, a patologia causa o aumento da temperatura da pele, devido ao aumento dos capilares venosos, aumento de irrigação sanguínea que fornece a energia extra necessária para eles, em ambos os casos podem ser detectados pela imagem produzida pela câmera infravermelha (Figura 9) (Duarte, 2020).

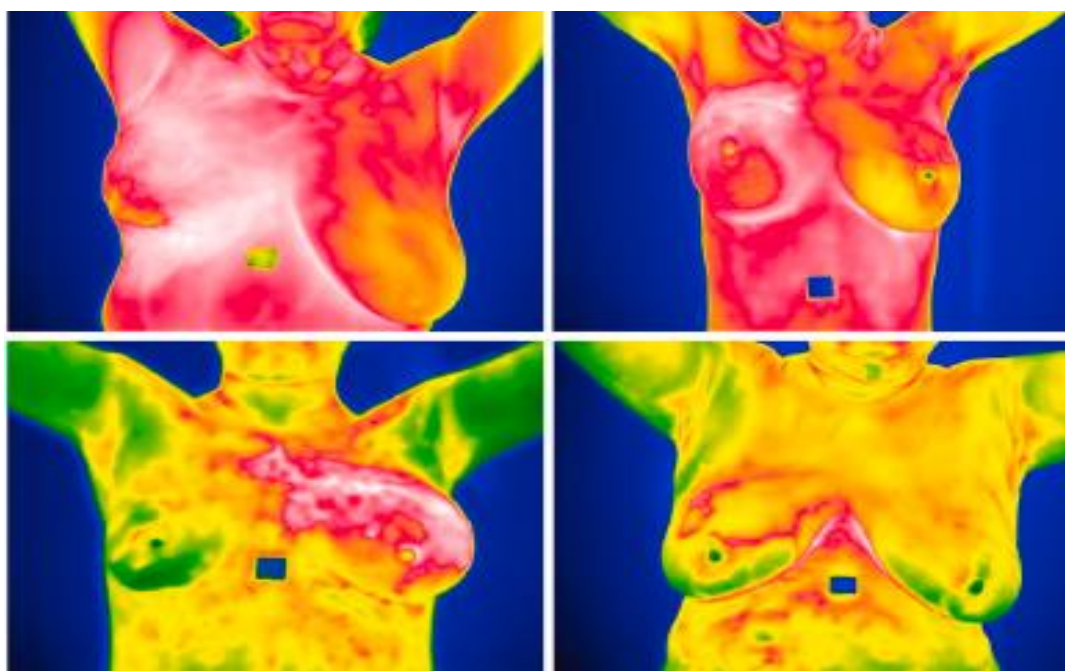


Figura 9: Imagem frontal realizada por captação térmica em pacientes com alterações mamárias. Fonte: Adaptação de Resmini (2021).

A busca por aplicações de imagens térmicas na medicina diagnóstica foi iniciada no século XX, os estudos atuais demonstraram que a termografia pode ser usada para definir o limite entre uma área de tecido normal e uma área de tecido afetada por lesões como por exemplo o câncer (Modrzejewska *et al.*, 2021).

A termografia é uma técnica de imagem segura, não invasiva e reproduzível que pode ser usada para triagem no diagnóstico precoce, mas este diagnóstico deve ser confirmado por outros tipos de exames mais complexos, como por exemplos mamografia, ultrassonografia e histopatológicos. Em animais esta técnica também já é aplicada para se avaliar o nível de estresse do animal submetidos a diferentes manejos de produção (Figura 10).

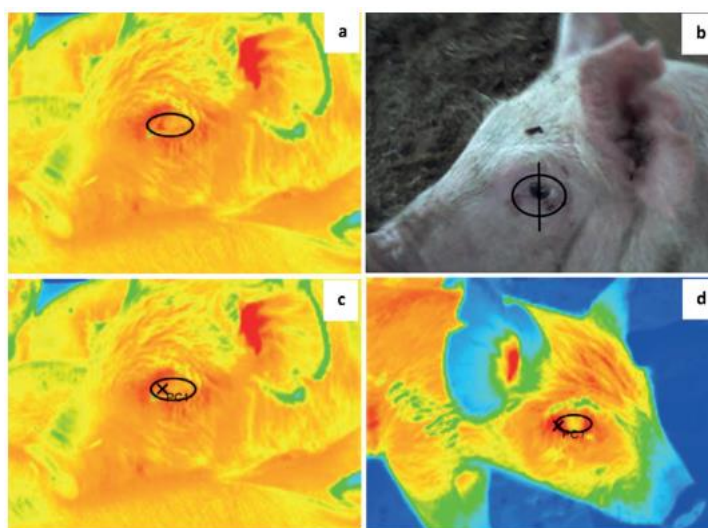


Figura 10: Imagem térmica captada com câmera termográfica FLIR T640 para auxílio em detecção de estresse no suíno. Fonte: Adaptação de Pulido-Rodríguez (2017).

Várias estratégias de diagnóstico não invasivas, foram propostas nas últimas décadas, as modalidades incluem, ressonância magnética, cintilografia, tomografia computadorizada. Porém, a evolução tecnológica do infravermelho, aumentou a popularidade da imagem infravermelha na prática médica nos últimos anos, por ser um método não invasivo, baixo custo e uma técnica de aplicação de espectro potencialmente grande, a técnica alcançou o status de possível condução do paciente a recomendação de uma biópsia (Lucas, 2015).

Segundo a International Consensus and Guidelines for Medical Thermography, a termografia médica é definida como modalidade de captação da radiação infravermelha do corpo ou de partes deste, através da mensura e mapeamento indiretamente na distribuição da temperatura da superfície corporal através de imagens (Lucas, 2015).

Todo objeto emite radiação infravermelha havendo uma correlação entre a temperatura corporal e a intensidade da radiação emitida. É um método passivo, não invasivo, sem necessidade de contato com o objeto de estudo detectando apenas a temperatura da superfície (Covarrubias, 2020).

Na realização do exame termográfico uma escala de cores é visível devido ao fluxo sanguíneo detectado, por duas maneiras: a primeira com pontos quentes exibindo a imagem em cores brancas ou vermelhas, indicando maior circulação do sangue no local decorrente de processos inflamatórios, e a segunda os pontos frios, exibidos com coloração azul ou preta, indicativo de locais com fluxo afetado ou em situação de necrose tecidual (Duarte, 2020).

A termografia infravermelha permite mensurar e mapear o grau e a distribuição das mudanças de temperatura na pele que está sob o controle do sistema nervoso visceral/neurovegetativo (Duarte, 2020). Pode ser notada no corpo em forma de calor nas terminações nervosas, chamadas de termorreceptores que conseguem captar essa radiação (Brioschi, 2010).

Padrões assimétricos igual ou maior a 0,3°C ocorrem quando existem alterações simpáticas ou presença de lesões traumáticas, alterações inflamatórias ou vasculares locais. Deve-se considerar que a termografia não é um exame isolado e deve-se correlacionar o padrão de distribuição térmica com a avaliação clínica, e não é um teste anatômico, mas funcional, quando há suspeita de lesão estrutural deve-se utilizar outros métodos de imagem (Brioschi, 2010).

A realização do exame termográfico deverá ser executada a distância de no mínimo 6 mm com a imagem totalmente preenchida no campo de captura da câmera infravermelha, em relação a distância máxima, dependerá da tecnologia de cada câmera, como apresentado na Figura 11.

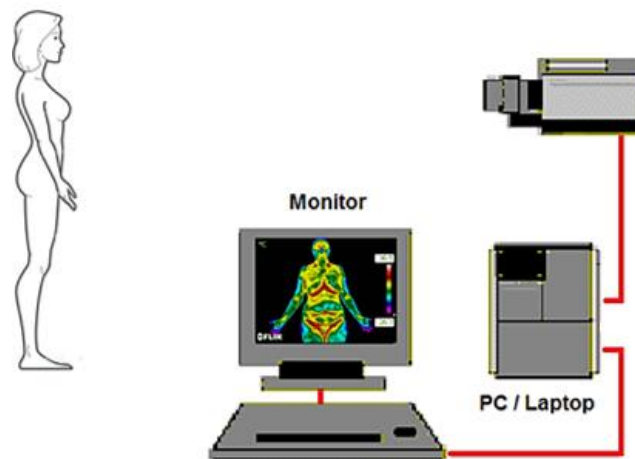


Figura 11: Representação esquemática da captura de termogramas. Fonte: Adaptação de Brioschi (2010).

A energia total emitida por unidade de área denominada corpo negro, é diretamente proporcional à quarta potência de sua temperatura absoluta. A radiação emitida pela maioria dos objetos reais é frequentemente parcial ao emitido pelo corpo negro do mesmo comprimento de onda e temperatura. A radiação do corpo negro é definida como aquela que absorve toda a energia que o alcança não refletindo nenhuma energia. Com base na lei de Planck, a intensidade espectral ($I_{\lambda b}$) da radiação térmica na temperatura (T) e em todos os comprimentos de onda (λ) do corpo negro em relação ao comprimento de onda é definida, conforme demonstrado na equação a seguir (Adam *et al.* (2017):

$$I_{\lambda b}(\lambda, T) = \frac{2\pi hc^2}{\lambda^5 \left(e^{\frac{hc}{\lambda kT}} - 1 \right)} \times 10^{-6} \left[\frac{W}{m^2}, \mu m \right]$$

Onde:

- c Velocidade da luz: $3.0 \times 10^8 \text{ m/s}$
- h Constante de Planck: $6.6 \times 10^{-34} \text{ Js}$
- k Constante de Boltzmann: $1.381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$
- T Temperatura absoluta de um corpo negro
- λ Comprimento de onda (μm)

Com isso, a energia radiada por um objeto real é proporcional a temperatura da superfície que é então capturada pelos detectores infravermelhos (Adam *et al.*, 2017; FLIR, [s. d.]).

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Este projeto foi aprovado no CEUA sob o nº 002/2022. Foram adquiridos para este estudo quatro leitões (dois machos e duas fêmeas) (n=4), após 24 horas da chegada dos animais a propriedade, uma fêmea veio a óbito por causa desconhecida.

Foram utilizados três leitões domésticos (n=3), *Sus scrofa domesticus*, da mesma ninhada, os animais tinham pele clara, eram mestiços, com 45 dias de idade e pesavam 10 kg quando chegaram na propriedade rural. Os animais foram alojados em um recinto coletivo, com alimentação adequada à idade, eram alimentados três vezes por dia, água fresca *ad libitum* e cama de maravalha como cobertura. Os suínos foram identificados por brincos coloridos.

Os animais foram tatuados por um tatuador profissional, utilizando todos os equipamentos e materiais necessários como é realizado em humanos.

Todos os protocolos de assepsia e normas éticas para experimentação animal foram respeitados, garantindo sempre o conforto e o bem-estar. A contenção dos leitões foi feita manualmente e a região corporal utilizada foi higienizada e anestesiada topicamente com lidocaína a 2%, conforme demonstrado na Figura 12.



Figura 12: Animais selecionados para o experimento. (A) Leitoes no confinamento. (B) Procedimento de tatuagem na pele do animal. Fonte: a autora.

No dia 0 cada animal ($n=3$) foi submetido a um total de 7 tatuagens com 5 mm de diâmetro cada: 3 tatuagens no lado esquerdo, uma para Controle (C), duas para Ozônio (O_3), e 4 tatuagens no lado direito, duas para ultrassom terapêutico (UST) e duas para tratamento associado com O_3 e UST (Híbrido). Assim, utilizou-se uma máquina de tatuagem rotativa para injetar a tinta de tatuagem de cor azul royal (#009, Iron Works Ltda, Brasil) na pele do porco a uma profundidade de 2 mm.

A distância entre cada tatuagem e a próxima foi de 2 cm na região lateral das coxas pélvicas. A distribuição das tatuagens seguiu o critério de sequência em que a técnica seria aplicada no lado tatuado correspondente, como mostra a Figura 13.

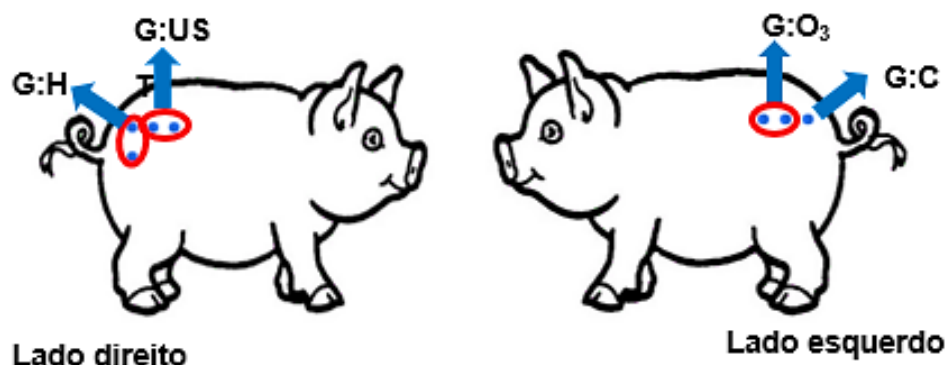


Figura 13: Desenho representativo da configuração experimental. As setas mostram a aplicação da tatuagem local/grupo nos lados direito e esquerdo dos leitões. G: Grupo. H: Híbrido. US: Ultrassom. O₃: Ozônio. C: Controle. Fonte: a autora.

Os protocolos terapêuticos ocorreram 30 dias após o procedimento de tatuagem na pele dos animais, para que houvesse o restabelecimento morfofuncional do tecido uniformização na derme e diminuição da migração transepidérmica do pigmento.

Na sequência foi realizado a tricotomia, para facilitar o processo da tatuagem antes da aplicação das técnicas que fazem parte deste estudo (Figura 14).



Figura 14: Procedimento: 30 dias após a tatuagem (A) tricotomia, (B) verificação do tamanho da tatuagem. Fonte: A autora.

6.2 Equipamentos

Foram utilizados neste estudo os equipamentos: gerador de ozônio da modelo Oxy[®], marca Tonederm[®], com capacidade de gerar até 100 µg/mL de O₃, acoplado ao cilindro de oxigênio medicinal (O₂) para a produção da mistura gasosa ozônio+oxigênio, com a vazão de 500 mL de O₃ medicinal.

O Ultrassom utilizado é modelo Sonomed IV[®], marca Carci[®] operando na frequência de 3 MHz e Câmera Termográfica modelo Flir C2[®], marca FLIR System[®], com resolução de 80×80 pixels, emissividade de 0.98.

6.3 Protocolos terapêuticos

Para excluir a variabilidade genética entre os indivíduos em relação as diferentes respostas individuais aos protocolos terapêuticos propostos devido ao tamanho da amostra, os animais foram submetidos a todos os protocolos, sendo subdividido em marcações na pele (tatuagens) para cada tratamento por animal, desta forma as tatuagens foram divididas nos respectivos grupos:

- **Grupo Controle (GC)** (n=3 total; n=1/animal), a pele foi tatuada, mas não recebeu nenhum protocolo terapêutico, apenas de observação;
- **Grupo Ozônio (GO₃)** (n=6 total; n=2/animal), foram submetidos ao protocolo com ozônio através da aplicação do fluído gasoso injetado no centro da tatuagem o volume de 1,0mL por pigmento do gás através da agulha e seringa de insulina com um ângulo de 45°, utilizando a concentração de O₃ de 20 mg/mL;
- **Grupo Ultrassom (GUST)** (n=6 total; n=2/animal), foram submetidos ao protocolo com US, o transdutor foi acoplado a pele utilizando hidrogel neutro na frequência de 3 MHz, intensidade de 1,0 W/cm², no modo contínuo pelo período de 5 minutos por ERA (Área de Radiação Efetiva) para a área de 3,5 cm²;
- **Grupo Híbrido (GH)** (n=6 total; n=2/animal) foram submetidos a este protocolo a associação dos dois protocolos anteriores, ou seja, primeiro ocorreu a aplicação do protocolo do ozônio e em seguida foi aplicado o

protocolo do ultrassom, o intervalo de tempo entre as duas terapias foi de 3 a 4 minutos. A Figura 15 mostra o cronograma da montagem experimental.

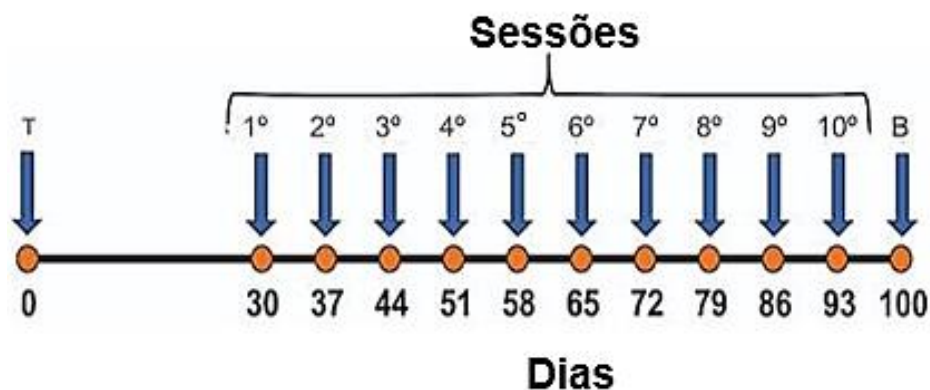


Figura 15: Esquema do cronograma experimental em dias após a realização das tatuagens. Tatuagem (T - 0 dia), Sessões (1-10º - 7 dias de intervalo - 30-93º dias) e Biópsia (B - 100 dias).

Após as tatuagens (dia 0), aguardou-se 30 dias para diminuir os efeitos das lesões causadas na pele pela agulha durante o procedimento da tatuagem e iniciaram-se as sessões terapêuticas experimentais. No total, foram realizadas 10 sessões sobre as tatuagens, com intervalo de sete dias em cada sessão, totalizando 10 semanas de tratamento. Os animais foram contidos manualmente com uma focinheira do tamanho correspondente para se evitar a mordedura, não foi necessário a aplicação de sedação para a realização do protocolo.

Na figura 16 a seguir, a visualização da disposição dos grupos na pele do animal, grupo Ozônio ao lado do grupo Controle, e o grupo UST ao lado do grupo Híbrido no momento dos procedimentos.

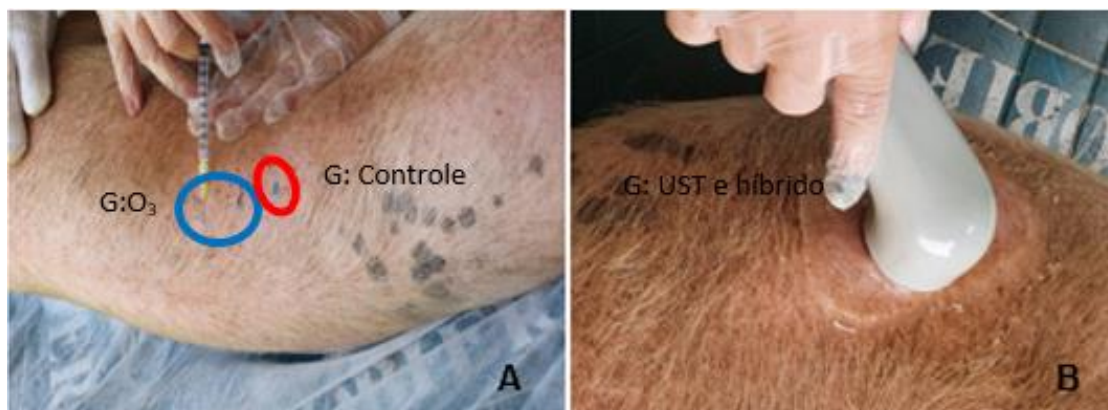


Figura 16: Momento dos protocolos experimentais, (A) grupo O₃ e grupo controle, (B) grupo UST e híbrido. Fonte: A autora.

No grupo Híbrido, foi realizado as duas técnicas terapêuticas (O₃ e UST) como representado na figura 17, a seguir.



Figura 17: Momento dos protocolos experimentais. (A) realização da técnica de O₃; (B) realização da técnica de UST. Ambas as técnicas utilizadas no grupo híbrido. Fonte: A autora.

Para a captação dos termogramas (antes e após os procedimentos) a câmera termográfica foi colocada a 40 cm do objeto de análise (pele do animal), como demonstrado na Figura 18. Ao final do experimento, os termogramas registrados nas etapas pré e após as aplicações das técnicas, foram processados no software FLIR Tools (FLIR®), com a dimensão da ROI foi de 32 pixels.



Figura 18: Contenção e Momento da captação dos termogramas pré e pós-tratamento. Fonte: A autora

6.3.1 Histologia

Na 11^a semana foi realizada uma biópsia na pele dos suínos através da retirada de um fragmento de cada tatuagem com um punch medindo 5mm de profundidade e 1cm de diâmetro do tecido biológico. Os animais foram contidos mecanicamente e receberam um bloqueio anestésico local através de lidocaína a 2% injetável para a realização da biópsia.



Figura 19: Equipamentos para a biópsia (A) Punch 5mm, (B) lidocaína a 2% injetável para anestesia local. Fonte: A autora.

A Figura 20 a seguir, demonstra a biópsia e coleta dos fragmentos, após os procedimentos, sutura simples com fio absorvível foram realizadas em cada tatuagem coletada.

O material coletado foi acondicionado em frascos contendo formaldeído a 10% separados por grupos, e enviados ao para histopatologia para a preparação das amostras.



Figura 20: Procedimentos antes e após a biópsia. (A) Biópsia da pele dos animais, (B): Sutura, após a biópsia. Fonte: A autora.

Foi utilizado um microscópio óptico (TNB-01T®, Anatomic®, Brasil) para aquisição das imagens das lâminas histológicas, utilizando objetiva de 10x, 40x padronizando a escala em todas as lâminas.

7 RESULTADOS

7.1 Avaliação macroscópica

Na avaliação visual a pele dos animais foi considerada como fototipo dois, quando comparadas aos fototipos da pele humana, facilitando a visualização do pigmento artificial azul na aplicação do tecido cutâneo (Azulay, 2017).

Após os 30 dias ao procedimento da tatuagem, para a cicatrização do tecido, foi realizado a primeira sessão dos procedimentos com os diferentes protocolos. As diferenças das tonalidades do pigmento azul tatuado na pele dos animais, foram apresentadas com o avanço das sessões, comparando a primeira sessão (30 dias), quarta sessão (51 dias) e décima sessão (93 dias), nos grupos experimentais O₃, UST e Híbrido.

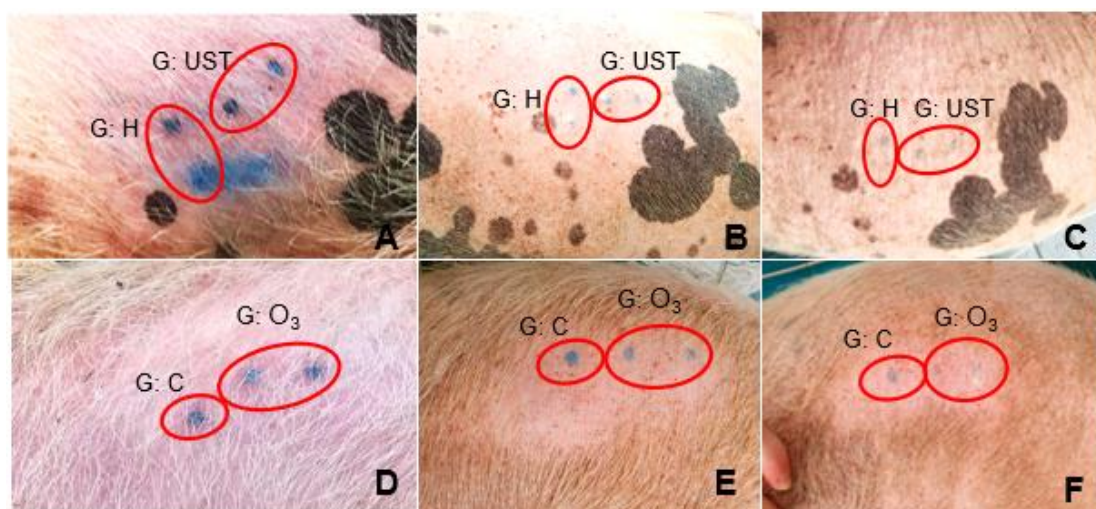


Figura 21: Comparação da despigmentação entre os grupos, Controle, Ozônio, UST e Híbrido. (A/D): primeira aplicação (30 dias), (B/E): quarta aplicação (51 dias), (C/F): décima aplicação (93 dias). Fonte: A autora.

7.2 Avaliação microscópica – Dados histológicos

Em relação aos dados histológicos na comparação entre os grupos experimentais, as características encontradas em relação a quantidade de pigmentos na derme estão descritas abaixo na Tabela 3.

Tabela 3: Análise comparativa dos aspectos pigmentares e teciduais dos grupos experimentais.

Grupo	Aspecto pigmentar (exógeno)	Aspecto do tecido animal
Controle	Presença moderada de grânulos azulados e negros à volta dos vasos sanguíneos	Edema moderado e infiltrado de eosinófilos e linfócitos observados adicionalmente na derme
Ozônio	Quantidade discreta de grânulos azulados e negros	Edema moderado a ligeiro e infiltrado predominantemente linfocítico (menos eosinófilos) observado adicionalmente na derme
Ultrassom	Uma quantidade discreta de grânulos e pigmentos azulados e enegrecidos concentrou-se à volta dos vasos sanguíneos	Edema moderado e infiltração por eosinófilos e linfócitos observados adicionalmente na derme. Na epiderme adjacente, infiltrado neutrofílico e pústulas subcorneais
Híbrido	Uma quantidade moderada de grânulos e pigmentos azulados e enegrecidos concentrava-se à volta dos vasos sanguíneos	Edema moderado a ligeiro e infiltrado predominantemente linfocítico (menor quantidade de eosinófilos) observado na derme

Grupos: G:C (grupo Controle); G:O₃ (grupo Ozônio); G:UST (Grupo ultrassom); G:H (grupo híbrido). Fonte: A autora.

Com a biópsia do fragmento dérmico foram avaliadas as características histológicas nos grupos controle e tratadas, lâminas de tecido cutâneo coradas com HE mostraram variações na intensidade da cor da tinta das áreas tratadas (Figura 22).

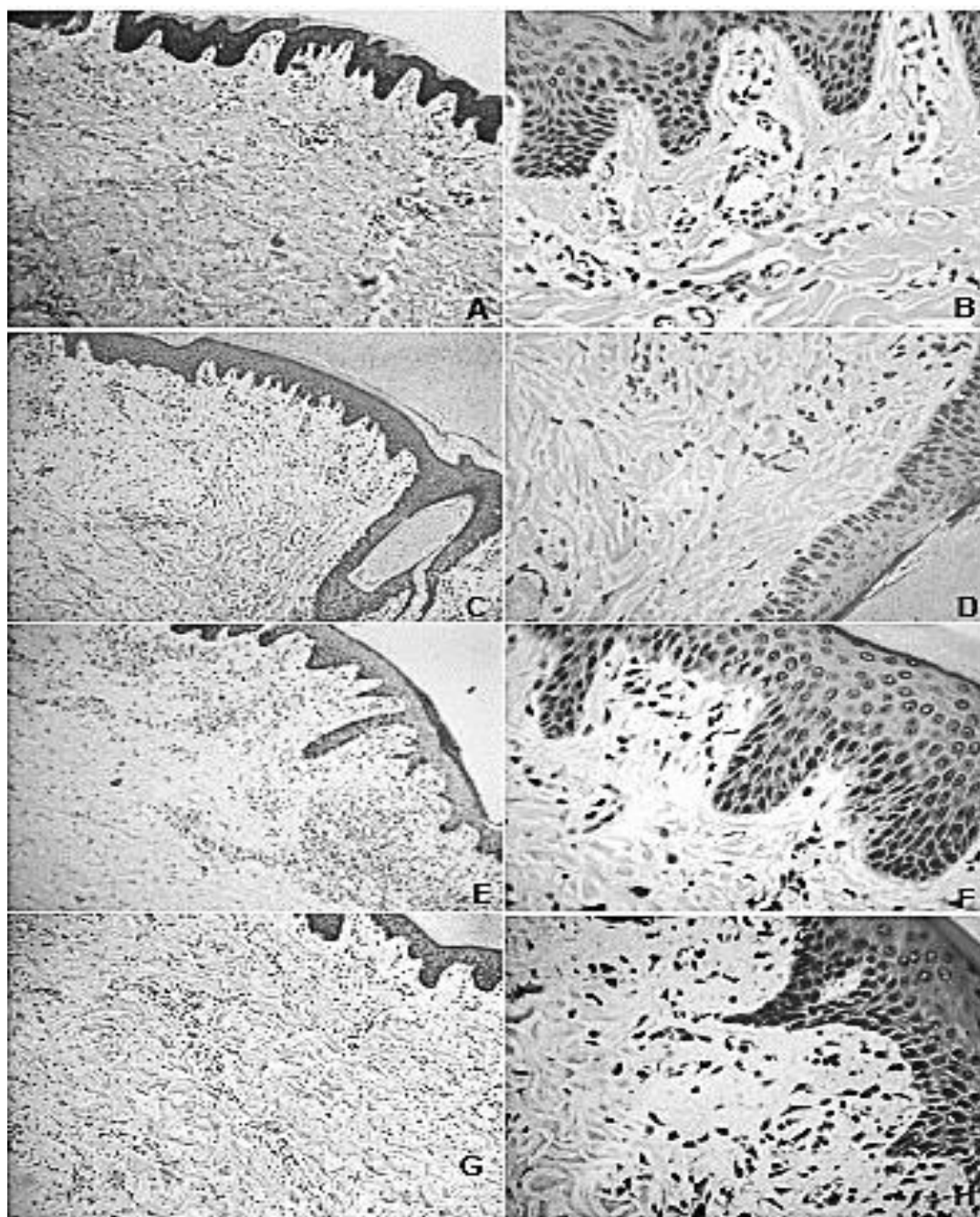


Figura 22: Diferenças histológicas nos protocolos para remoção da tatuagem da pele dos suínos. (A/B) G:C aumento de 10X e 40X; (C/D) G:O₃ aumento de 10X e 40X; (E/F) G:UST aumento de 10X e 40X; (G/H) G:H aumento de 10X e 40X. Fonte: A autora

7.3 Termografia

O monitoramento da temperatura superficial da pele dos animais foi realizado através do registro de termogramas registrados nos períodos: inicial (primeira à terceira sessão), intermediário (quarta à sexta sessão) e final (sétima à décima sessão). Os termogramas foram captados antes e após a aplicação das terapias propostas neste trabalho. Os dados obtidos foram processados em termo da diferença de temperatura ($\Delta T = T_f - T_i$) e os dados compilados foram descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Descrição da diferença de temperatura nos períodos: inicial, intermediário e final, para os grupos controle, ozônio, ultrassom e híbrido.

Grupos	Inicial	Intermediário	Final
Controle	1,2	-0,5	-1,4
Ozônio	0,7	-0,8	-1,7
UST	0,8	1,6	-0,9
Híbrido	1,3	1,8	-1,8

Fonte: A autora.

A Figura 23, a seguir ilustra as alterações de temperaturas promovidas pelas terapias, correspondente aos períodos: inicial (2ª a 4ª sessão), intermediário (5ª a 7ª sessão) e final (8ª a 10ª sessão). No período inicial houve aumento de temperatura em todos os grupos, no período intermediário houve diminuição de temperatura nos grupos controle e ozônio e aumento de temperatura nos grupos UST e híbrido, e no período final se observou diminuição de temperatura em todos os grupos, juntamente com o erro padrão do valor de delta, representado a seguir.

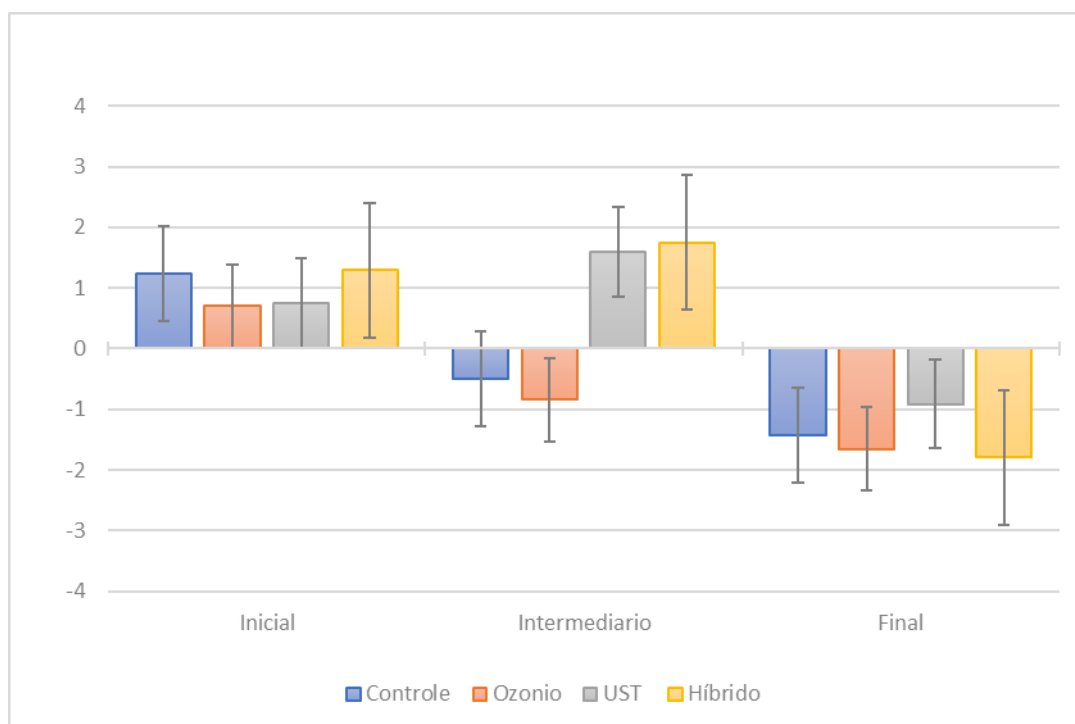


Figura 23: Representação gráfica dos períodos inicial, intermediário e final dos grupos: controle, ozônio, ultrassom e híbrido, com erro padrão médio, delta de temperatura entre os grupos, inicial, intermediário e final. Fonte: A autora.

A captação dos termogramas mostrou um aumento de temperatura no período inicial do estudo na aplicação das técnicas, nos grupos híbrido, UST, O₃ e controle como estão apresentadas nas figuras 24, 25, 26.

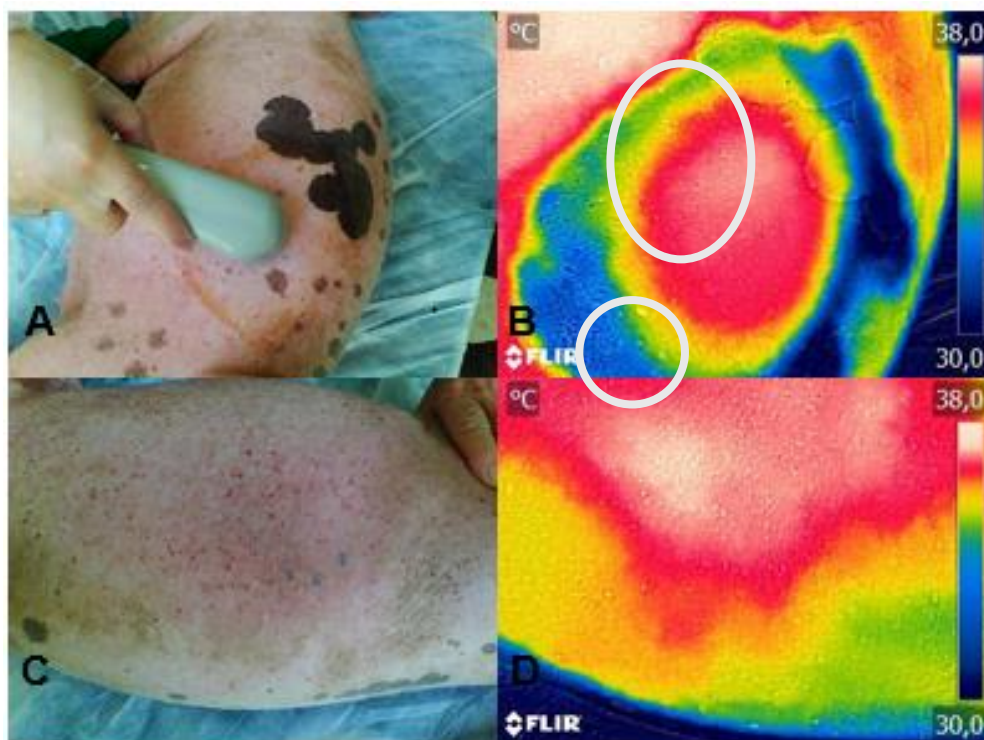


Figura 24: Captação termográfica A/B; Grupo híbrido e UST; C/D: Grupo O₃ e controle, período inicial. Fonte: A autora



Figura 25: Imagens termográficas A/B; Grupo híbrido e UST; C/D: Grupo O₃ e controle, período intermediário. Fonte: A autora.

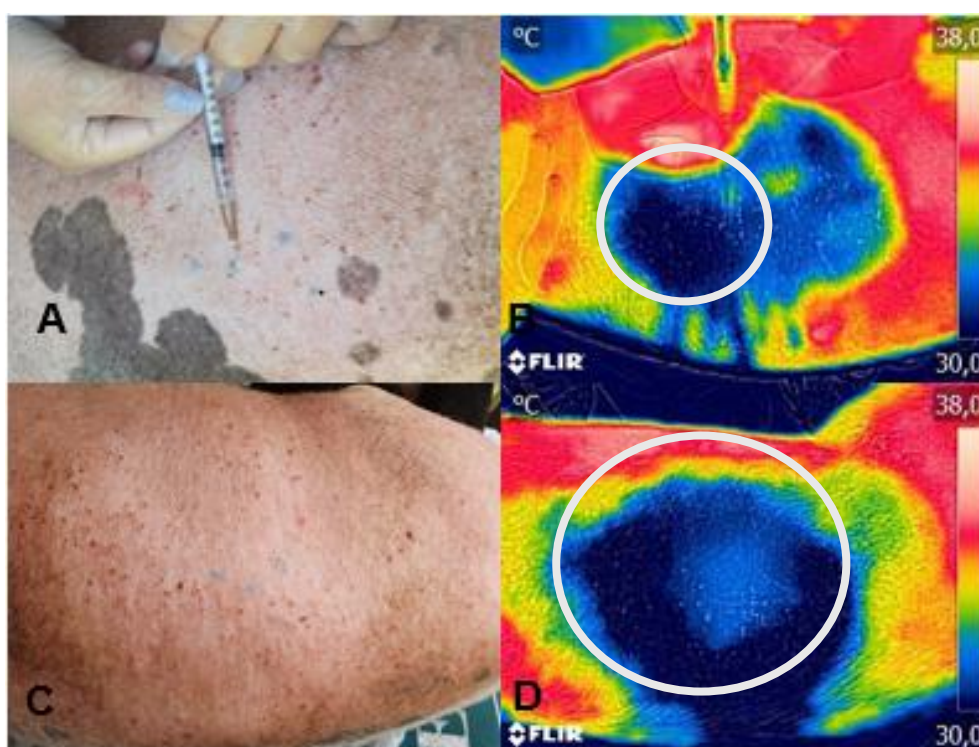


Figura 26: Imagens termográficas: A/B; Grupo híbrido e UST; C/D: Grupo O₃ e controle, período final. Fonte: A autora.

Em relação ao comportamento térmico do grupo Controle (Figura 27), observou-se aumento de 1,2°C para as primeiras sessões, mas no período intermediário houve a diminuição de -0,5°C, enquanto no período final a diminuição na temperatura foi de -1,4°C.

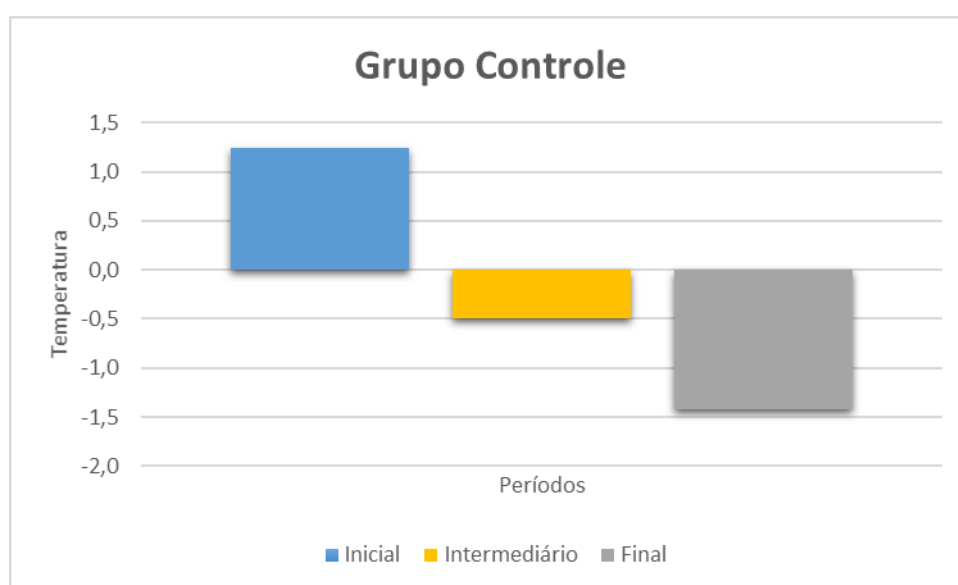


Figura 27: Representação gráfica da diferença de temperatura no período inicial, intermediário e final do grupo controle. Fonte: A autora.

Para o grupo Ozônio (Figura 28), observou-se um aumento de $0,7^{\circ}\text{C}$ no período inicial, enquanto nos períodos intermediário e final houve reduções de $-0,8^{\circ}\text{C}$ e $-1,7^{\circ}\text{C}$, respectivamente.



Figura 28: Representação gráfica da temperatura no período inicial, intermediário e final do grupo ozônio. Fonte: A autora.

Na figura 29, fica demonstrado as temperaturas nos três períodos do grupo UST, no período inicial obteve-se um aumento de temperatura de $0,8^{\circ}\text{C}$, no período intermediário o aumento foi de $1,6^{\circ}\text{C}$ e no período final, a temperatura obteve uma diminuição de $-0,9^{\circ}\text{C}$.

A partir da quarta sessão, na terapia de UST, foi utilizado uma quantidade maior de hidrogel na aplicação da técnica, pois os animais demonstraram maior conforto, o que facilitou o manejo, garantindo que a emissividade das ondas através do acoplamento do UST para maior eficácia na técnica.

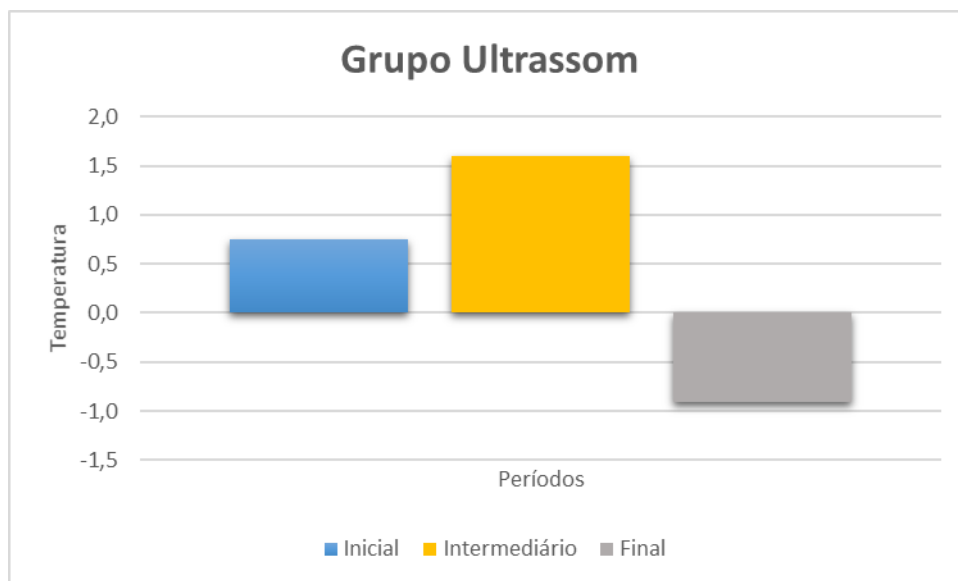


Figura 29: Representação gráfica da diferença de temperatura no período inicial, intermediário e final do grupo ultrassom. Fonte: A autora.

Na Figura 30, a diferença das temperaturas no período inicial foi de 1,3°C, no período intermediário houve um aumento de temperatura de 1,8°C, no período final a temperatura diminuiu para -1,8°C.



Figura 30: Representação gráfica da temperatura nos períodos: Inicial, intermediário e final do grupo híbrido. Fonte: A autora.

8 DISCUSSÃO

Os suínos são os animais que mais se assemelham aos humanos em aspectos morfofuncionais em estrutura e tamanho anatômico, fisiológico e imunológico, com grande potencial para o desenvolvimento de modelos biomédicos (Lunney et al., 2021).

O modelo animal suíno ganhou destaque na pesquisa pré-clínica, principalmente na fisiologia da reprodução, geração de órgãos para xenotransplante utilizando a expressão de transgênicos em tecidos suínos e na fisiologia da pele devido às semelhanças entre as peles suína e humana (Summerfield, Meurens, & Ricklin, 2015; Vodicka et al., 2005). É um modelo interessante para respostas fisiológicas devido à permeabilidade, agentes que promovem a cicatrização e novas formulações para tecidos (Rodrigues Hoffmann, 2017; Vasconcelos de Andrade Lima, de Andrade Lima, & Takano, 2013).

Neste estudo, a utilização do modelo animal suíno para despigmentação de tatuagens visou o desenvolvimento de uma metodologia indolor, segura, com o mínimo de efeitos colaterais em relação às técnicas atuais de remoção de pigmentos de tatuagens da pele humana.

Já foram efetuados estudos comparativos de remoção de tatuagens em ensaios *in vivo* com suínos, utilizando as seguintes técnicas: excisão tangencial de espessura da pele com uso de dextranómero, sal-abrasão, remoção de tatuagem excessiva com solução de ácido tânico, lasers CO₂ e Nd:YAG (Arellano et al, 1982; Baleisis & Rudys, 2023), e confirmaram que a remoção do pigmento foi mais completa com ácido tânico e laser de CO₂, deixando cicatrizes esteticamente mais aceitáveis, porém Arellano et al., (1982) não relataram a cor do pigmento e se as tatuagens eram fechadas completamente como proposto em neste estudo.

Em relação ao pigmento azul tatuada nos leitões deste estudo, Baleisi & Rudys (2023), utilizando um laser Nd:YAG com duração de pulso de 150 ps (PicoSure), e verificaram que o comprimento de onda do equipamento ajustado para 1064 nm obteve alta eficiência na eliminação de tatuagens pretas com

resultados positivos para os pigmentos azul e verde a uma fluência de 3.02 J/cm², mas utilizando o comprimento de onda de 532 nm com uma fluência de 0,96 a 2,39 J/cm², as tatuagens com pigmentos azuis, verdes, vermelhos e amarelos ficaram mais claras e desbotadas, e em ambas as dosimetrias ópticas não foram observados efeitos colaterais.

Existem discussões a respeito de dermatite alérgica após os procedimentos de pigmentação dérmica e os possíveis efeitos nocivos para a saúde humana devido à falta de dados sobre substâncias nas tintas de tatuagem (Wang et al., 2021; Weib et al., 2021).

As tintas de tatuagem contêm inúmeras substâncias, tais como pigmentos coloridos, impurezas, solventes, emulsionantes e conservantes. Sabe-se que as partículas de carbono amorfo preto (negro de fumo), dióxido de titânio branco ou os pigmentos policíclicos que criam inúmeras variedades de cores no espectro visível podem conter químicos alergênicos com potencial desconhecido (Schubert, Kluger, & Schreiver, 2023; Weib et al., 2021).

Devido às reações cutâneas relatadas em diversos estudos de efeitos de pigmentos de tatuagem na pele humana, principalmente em tons coloridos, como vermelho, amarelo, laranja e azul, neste estudo optou-se por um pigmento autorizado pela nossa Agência Nacional de Vigilância Sanitária visando que tais reações alérgicas pudessem ser evitadas ou minimizadas, pois já foram testados quanto à pureza dos compostos orgânicos e inorgânicos do pigmento, assim a cor azul foi escolhida para os procedimentos no modelo animal suíno devido à fácil visualização da coloração na pele do animal e por ser mais difícil a remoção por conter ftalocianina, resultando na decomposição/quebra da 2-Butanona (benzenedicarbonitrila) (Schubert et al., 2023), a presença de ferro, alumínio, titânio e cobre, são mais comuns em pigmentos verdes e azuis (Wang et al., 2021).

Durante o período experimental de 100 dias, não foram observadas reações alérgicas nos animais devido aos pigmentos tatuados ou aos diferentes protocolos de remoção de tatuagens.

Os efeitos da sonicação relacionados aos estudos *in vitro* com ultrassom apresentaram alta variabilidade nas configurações experimentais, gerando

incertezas nos parâmetros das amostras sonicadas, e baixa reprodutibilidade, reduzindo a contribuição científica dos resultados obtidos (Snehota, Vachutka, Ter Haar, Dolezal, & Kolarova, 2020). Neste estudo foi proposto o modelo *in vivo*, visando maior padronização experimental com os animais de mesma origem (ninhada), obtendo-se uma menor variabilidade genética em resposta aos tratamentos e diante dos resultados apresentados nos testes, e entre todos os grupos terapêuticos.

Na estética humana o UST é rotineiramente utilizado, apresenta uma gama de efeitos biológicos induzidos pelo nível de exposição, em baixas potências, o UST pode produzir efeitos celulares reversíveis e benéficos, como no caso da cicatrização óssea, fonoforese e diatermia, enquanto que em altas potências são aplicados na litotripsia, no ultrassom focalizado de alta intensidade (HIFU) amplamente difundido no tratamento térmico de tumores para fins terapêuticos e em tratamentos estéticos para contorno corporal (Matthew; Stretanski, 2024; Mazzoni, Lin, Dubin, & Khorasani, 2019; Ter Haar, 2007).

O efeito terapêutico através da intensidade da onda é obtido por mecanismos de interação térmicos e não térmicos. Em baixas intensidades, a corrente acústica é suscetível e significativa, mas em níveis mais elevados, o aquecimento e a cavitação acústica irão predominar (Ter Haar, 2007).

No estudo para avaliar os efeitos térmicos a diferentes profundidades no músculo axial em equinos, verificou-se que a utilização de UST de 3 MHz, a uma intensidade de 1 W/cm^2 e 2 W/cm^2 , ambos por um período de 10 minutos, obteve-se um aumento da temperatura, mas concluíram que dentre as intensidades testadas, o maior aquecimento ocorreu a 1 cm de profundidade da pele, mais próximo da epiderme, porém quando utilizado 1 MHz - 1 W/cm^2 , foram observados efeitos térmicos a uma profundidade de até 5 cm, atingindo uma área de até 20 cm^2 (Adair & Levine, 2019). No presente estudo, o protocolo com UST utilizou uma frequência de 3 MHz, e uma intensidade de 1 W/cm^2 em modo contínuo de entrega de energia por 5 minutos em uma área total de 15 cm^2 , apesar de ser em uma intensidade maior, por um período menor de tempo, houve efeito térmico com cavitação na epiderme e derme no

modelo animal, possivelmente contribuindo para a remoção da pigmentação azul, provavelmente devido às interações contínuas entre as ondas de ultrassom e as bolhas de cavitação baseadas em uma abordagem de duas fases contínuas para líquidos borbulhantes, ideal para a amplitude de movimento como um sinal celular, seus efeitos foram cessados após o tratamento.

A utilização da fonoforese, que consiste na utilização de ondas acústicas de ultrassom para auxiliar a penetração de substâncias no tecido subcutâneo muito utilizado na fisioterapia (Goraj-Szczypiorska, Zajac, & Skalska-Izdebska, 2007), em diversas patologias associadas ou não a medicamentos, como osteoartrite de joelho, distúrbios musculoesqueléticos (Boonhong, Suntornpiyapan, & Piriyaarukul, 2018; Coskun Benlidayi, Gokcen, & Basaran, 2018), foi proposto neste estudo no protocolo híbrido relacionado à aplicação intradérmica do gás ozônio (1,0 mL na concentração de 20 µg/L) dentro do pigmento e no seu entorno, e na sequência a aplicação do UST de alta frequência, acreditava-se na possibilidade da ação conjunta dos princípios da fonoforese, mas entretanto, tais efeitos não foram observados, apesar da avaliação macroscópica demonstrar uma diminuição da despigmentação da tatuagem na pele do animal, porém nas avaliações histológicas os pigmentos exógenos estavam moderadamente presentes com resultados inferiores quando comparados aos outros protocolos testados. O UST de alta frequência promove a cavitação através de ondas acústicas, gerando um efeito térmico local, contribuindo negativamente para a lipoperoxidação da membrana celular através da ação do ozônio, anulando-o, ou reduzindo suas propriedades de indução celular.

Os efeitos do ozônio no tecido subcutâneo foram relatados em diferentes estudos em modelos animais, como queimaduras de segundo grau injetando ozônio no tecido subcutâneo lesionado (Karakaya et al., 2021), sinalização celular para diferenciação basal de queratinócitos no tratamento da psoríase (Gao et al., 2020), uso intradérmico de solução salina ozonizada como promotor de crescimento na cicatrização de feridas na pele de ratos diabéticos

(Hesham et al., 2023). Em todos os estudos, os resultados foram confirmados através de técnicas histológicas, como foi feito neste estudo.

Estudos indicam que o ozônio pode facilitar o processo de cicatrização de feridas através do aumento da microcirculação, com uma infiltração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, induzindo e regulando leucócitos e macrófagos, induzindo um processo de cicatrização de feridas mais precoce, levando à reepitelização para reparação de feridas (Diaz-Luis, Menendez-Cepero, Diaz-Luis, & Ascanio-Garcia, 2015; Liu et al., 2023). Na tatuagem azul, pigmentos que receberam apenas ozônio, foi observada pigmentação exógena, com leve edema e infiltrado predominantemente linfocitário na derme, muito semelhante aos pigmentos que receberam o UST para despigmentação, mas com edema moderado e infiltrado, eosinofílico e linfocitário na derme, e os pigmentos tratados com o protocolo híbrido (O_3 +UST) além do edema, o infiltrado foi predominantemente linfocitário como observado no grupo controle.

Sabe-se que o ozônio desempenha um papel na regulação do sistema imunitário durante o tratamento de doenças, aumentando o número de leucócitos e aumentando a capacidade fagocítica dos granulócitos, promovendo a formação de monócitos e ativando os linfócitos T (Kucuksezer et al., 2014). Nos três protocolos desenvolvidos para a remoção de pigmentos azuis, observou-se um efeito de maior ou menor intensidade no processo de despigmentação, mas novos estudos devem ser testados como em tatuagens antigas para saber se o mesmo perfil celular será mantido. Por fim, outras dosagens de ozônio, intensidades de UST e intervalos entre aplicações com intervalos mais curtos para estabelecê-lo como uma técnica potencial para a remoção de tatuagens.

A avaliação termográfica foi empregada neste estudo por tratar-se de uma técnica não invasiva, sem necessidade de contato físico, não causando estresse ao animal, sendo capaz de medir o calor emitido pela superfície alvo através da radiação infravermelha, correspondendo à temperatura da pele (Souza et al, 2018), possibilitando avaliar o animal em diversas situações. No

caso deste estudo, utilizamos os termogramas para monitorar a variação da temperatura induzida pelas terapias.

A termografia é uma ferramenta útil no bem-estar animal, identificando lesões subclínicas, e possíveis alterações provenientes do uso das técnicas propostas, prevenindo lesões (da Silva, et al, 2022). Tanto o O₃ quanto o UST, geraram aumento de temperatura em função de seus mecanismos de ação, observados pela variabilidade da temperatura no local da utilização nos protocolos testados durante a execução das técnicas. Em todos os grupos houve aumento de temperatura no início da aplicação dos protocolos. Pode-se atribuir esse aumento aos mecanismos de ação do UST (Guirro et al, 2023, Valandro et al, 2015), e pela ação da infusão do gás ozônio na pele dos animais (Severo et al, 2019). No entanto, no grupo controle não houve aplicação de nenhuma técnica havendo também o aumento de temperatura. Desta forma, o que se discute é a influência do estresse aumentado nos animais devido a adaptação ao manuseio (Pulido-Rodríguez, 2017).

No período intermediário, houve um aumento, somente do grupo UST e híbrido, isso pode ser atribuído ao fato dos mecanismos de ação da técnica UST, havendo o efeito térmico e cavitacional, não ocorrendo nos demais grupos, controle e O₃.

No período final, todos os grupos apresentaram a diminuição de temperatura, não foi realizado a medição ocular dos animais para avaliar o estresse, a proposta do estudo foi avaliar a temperatura no local das terapias, para a segurança e conforto dos animais. A hipótese que mais se adequa é que no período final os animais já estavam adaptados com as técnicas utilizadas, ambientados ao local em que estavam inseridos e ao manuseio dos tratadores e pesquisadores.

Neste estudo não foi realizada a avaliação da superfície total da pele dos animais, a temperatura corporal pode ser captada através de termogramas oculares ou do dorso total, por razões anatômicas a temperatura ocular pode estar associada à temperatura do núcleo corporal por sua proximidade ao cérebro (Pulido-Rodríguez, 2017).

Durante a revisão bibliográfica não foram encontradas pesquisas que abordassem a utilização da termografia no monitoramento da temperatura em técnica intradérmica de gás O_3 , tão pouco na captação para a utilização de técnicas de UST, para remoção de tatuagem, porém a utilização da termografia colaborou para a segurança no controle de temperatura ao aplicar técnicas que geram o efeito cavitacional e térmico, sendo útil na adequação da técnica de ultrassom, onde foi necessário aumentar a camada do hidrogel no período intermediário para a aplicação do UST na pele dos animais, possibilitando segurança, conforto e qualidade na emissividade das ondas emitidas pelo ultrassom.

Os exames histológicos não demonstraram lesões na pele dos animais em detrimento a utilização das técnicas O_3 e UST, caracterizando as técnicas seguras, com baixas reações adversas, sendo um tratamento em potencial adjuvante na remoção de pigmentos exógenos.

9 CONCLUSÃO

Neste estudo preliminar a aplicação do ozônio gasoso e o ultrassom terapêutico conseguiram despigmentar de forma parcial os pigmentos azuis tatuados no modelo animal suíno, confirmado com as análises histológicas, entretanto a associação de ambas as técnicas não obteve os mesmos resultados mantendo-se mais próximo ao grupo controle. Novos estudos se fazem necessários testando outras dosagens, frequências de aplicações, tatuagens antigas, aumentando as possibilidades de ganhos fisiológicos e estéticos na fisioterapia dermatofuncional com o uso destas terapias, inclusive para a prevenção e/ou melhora de índices preditivos de intercorrências dermatológicas advindas das práticas de remoção de tatuagens.

REFERÊNCIAS

- ACARI, B. G.; HENSCHER, M. T.; LACERDA O. **Ultrassom terapêutico no tratamento da lipodistrofia localizada**. Balneário Camburiú: Univali, 2013.
- ADAM, M. *et al.* Computer aided diagnosis of diabetic foot using infrared thermography: a review. **Computers in Biology and Medicine**, New York, v. 91, p. 326-336, 2017.
- ALIZADE, Z. *et al.* Revisão dos mecanismos e efeitos dos dispositivos não invasivos de contorno corporal na celulite e gordura subcutânea. **Int J Endocrinol Metab**, [s. l.], v. 14, n. 4, 2016.
- AZAGURY, A. *et al.* Ultrasound mediated transdermal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 72, p. 127-143, 2014.
- BACHA JUNIOR, W. J.; BACHA, L. M. **Color atlas of veterinary histology**. 3rd ed. Hoboken: Wiley Blackwell, 2012.
- BERNARDO, A. F. C. *et al.* Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. **Revista Saúde em foco**, v. 1, n. 11, p. 1221-1233, 2019.
- BITTENCOURT, M. D. E. Dermatofibroma in a black tattoo: report of a case. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 614-616, 2013.
- BOCCI, V. **Ozone: a new medical drug**. Amsterdam: Springer Netherlands, 2011.
- BOCCI, V.; BORRELLI, E. It is time that health authorities promote the use of oxygen-ozone therapy as an integrative therapy of orthodox drugs. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, [s. l.], p. 1-9, 2015.
- BOCCI, V.; ZANARDI, I.; TRAVAGLI, V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. **J Transl Med**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 66, 2011.
- BORGES, O. F. *et al.* Ação do laser terapêutico e do ultrassom na regeneração nervosa periférica. **Acta Ortopédica Brasileira**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 98-103, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 1.988, de 20 de dezembro de 2018**. Brasília, 2018.

BRIOSCHI, M. L. *et al.* **Princípios e indicações da termografia médica**. São Paulo: Andreoli, 2010.

CHAPMAN, S. A theory of upper atmospheric ozone. **Q J R Meteorol Soc**, v. 3, p. 103-25, 1930.

CHACUR, R. *et al.* Remoção de tatuagem com laser Q-switched NdYAG em população brasileira. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 29, n. 3, p. 404–409, jul. 2023.

COVARRUBIAS, N. P. *et al.* Termografía portátil en cirugía plástica: el nuevo estetoscopio del cirujano reconstructivo. **Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 319-327, 2020.

DI MAURO, R. *et al.* As propriedades bioquímicas e farmacológicas do ozônio: o cheiro de proteção em doenças agudas e crônicas. **Jornal Internacional de Ciências Moleculares**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 634, 2019.

DIAZ-LUIS, J. *et al.* In vitro effect of ozone in phagocytic function of leucocytes in peripheral blood. **Journal of Ozone Therapy**, [s. l.], v. 1, n. 1, 2015.

DOLD, B. **Infrared radiation in modern technology**. [S. l.: s. n.], Apr. 2016.

DUARTE, G. G. *et al.* Uso da termografia para o tratamento de lesões de pele: revisão sistemática da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, [s. l.], v. 3, n. 5, 2020.

ELEGINO-STEFFENS, D. U. *et al.* Um caso de septicemia grave após a tatuagem tradicional de Samoa. **Hawaii J Med Public Health**, [s. l.], v. 72, n. 1, 2013.

FORTE, G. *et al.* Market survey on toxic metals contained in tattoo inks. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 23, p. 5997–6002, 15 nov. 2009.

FLIR. **User's manual FLIR IR Monitor**. [S. l.]: FLIR, [s. d.].

HERSCHEL, W. **The scientific papers of Sir William Herschel**. London: CUP, 2013.

HOFFMANN, G. Tintas de tatuagens são reprovadas em teste. *In*: SWI. [S. l.], 2009. Disponível em: http://www.swissinfo.ch/por/reportagens/Tintas_de_tatuagem_sao_reprovadas_em_teste.html?cid=7508120. Acesso em: 18 out. 2023.

HOGSBERG, T.; HUTTON, C. K.; SERUP, J. High prevalence of minor symptoms in tattoos among a young population tattooed with carbon black and organic pigments. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 846-852, 2013.

HØGSBERG, T. et al. Tattoo inks in general usage contain nanoparticles. **The British journal of dermatology**, v. 165, n. 6, p. 1210–8, dez. 2011.

HØGSBERG, T. et al. Black tattoo inks induce reactive oxygen species production correlating with aggregation of pigment nanoparticles and product brand but not with the polycyclic aromatic hydrocarbon content. **Experimental dermatology**, v. 22, n. 7, p. 464–9, jul. 2013.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2017.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**: Texto e Atlas. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2023.

KARDONG, K. V. **Vertebrados**: anatomia comparada, função e evolução. [Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2016.

KAWAHARA, R.; JOAQUIM, J. G. F. Ozonioterapia quando a compreensão faz toda a diferença. **B APAMVET**, [s. l.], p. 17-21, 2020.

KHULLE, B. C.; OLIVEIRA, S. P. Ultrassom no tratamento de fibroedema gelóide. In: TCC ONLINE. [S. l.], 2015. Disponível em: <https://tcconline.utp.br/media/tcc/2017/05/ultrassom-no-tratamento-de-fibroedema-geloide.pdf>. Acesso em: 18 out. 2023.

KLUGER, N.; KOLJONEN, V. Tattoos, inks, and cancer. **The Lancet Oncology**, London, v. 13, n. 4, p. e161-8, 2012.

LUCAS, R. W. C. Termografia aplicada à fisioterapia e às perícias fisioterapêuticas. In: CONSENSO Internacional e Diretrizes em Termografia Médica. 3. ed. [S. l.: s. n.], 2015.

MAGGI, L. et al. Software didático para modelagem do padrão de aquecimento dos tecidos irradiados por ultra-som fisioterapêutico. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 204-214, 2008.

MARTELLI, A. et al. Microcorrente no processo de cicatrização: revisão da literatura. **Archives of Health Investigation**, [s. l.], v. 5, n. 3, 2016.

MATIELLO, A. A. et al. **Fundamentos de eletroestética**. Porto Alegre: Grupo A, 2018.

MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Jornal de Pesquisa Cirúrgica e Clínica**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 84, p. 257-262, 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Maternidade suína**: boas práticas para o bem-estar na suinocultura. Brasília, DF: AECS, 2018.

MODRZEJEWSKA, A. *et al.* Termografia em oncologia clínica oftalmológica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, [s. l.], v. 84, n. 1, 2021.

MONTSERRAT, F. G. *et al.* (2023). The Role of Physical Therapies in Wound Healing and Assisted Scarring. **International journal of Molecular Science**, 24(8), 7487. <https://doi.org/10.3390/ijms24087487>.

NEVES, E. M. D. S. F. T. **Macrófagos**: biologia, diversidade e função. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2015.

OLIVEIRA, G. B.; COHEM, C. S.; ALVES, V. Remoção de tatuagens com laser: revisão de literatura. **Dermatologia Cirúrgica e Cosmética**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 289-295, 2013.

PEREIRA, P. R. *et al.* Primary skin diseases and cutaneous manifestation of systemic diseases in swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 40, 2020.

PIRES, L. **Riscos associados às tatuagens decorativas**. [S. l.]: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2014.

PULIDO-RODRÍGUEZ, Lina Fernanda *et al.* Termografia infravermelha da superfície ocular como indicador de estresse em suínos na fase de creche. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 453-458, 2017.

RIVITTI, E. A. **Dermatologia de Sampaio e Rivitti**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2018.

ROPA, L. A importância dos suínos em medicina humana. **Mig-PLUS Agroindustrial**, [s. l.], 2012.

SCIORSI, R. L. *et al.* **Ozone therapy in veterinary medicine**: a review. [S. l.: s. n., s. d.].

SILVA, A. *et al.* Ozonioterapia: um tratamento clínico em ascensão na medicina veterinária. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, [s. l.], v. 31, n. 15, 2018.

SIQUEIRA, K. D. S. **Ultrassom terapêutico de alta potência no tratamento da lipodistrofia localizada abdominal**: ensaio clínico randomizado duplo cego. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4735>. Acesso em: 29 jul. 2021.

TAPIA, A. S.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. La ozônioterapia y su fundamentación científica. **Ozone Therapy Global Journal**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 163-198, 2012.

TASSINARY, J. A. *et al.* Avaliação dos efeitos do ultrassom terapêutico sobre a cafeína e verificação da liberação em sistema de difusão vertical. **Química Nova**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 1539-1543, 2011.

TASSINARY, J. Raciocínio clínico aplicado a estética facial. **Ed Estética experts**, [s. l.], p. 32-42, 2019.

TURHAN, K. *et al.* Decolorization of textile basic dye in aqueous solution by ozone. **Elsevier**, Istanbul, v. 92, n. 3, p. 897-901, 2005.

VAN LEEUWEN, J. Proposed OS&E requirement: measuring ozone dosage. **Ozone Sci Eng**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 191-192, 2015.

VASCONCELOS, G. S. *et al.* **Fisioterapia traumato-ortopédica e esportiva**. Porto Alegre: Grupo A, 2021.

WENZEL, S. M. *et al.* Adverse reactions after tattooing: review of the literature and comparison to results of a survey. **Dermatology**, Basel, v. 226, n. 2, p. 138-47, 2013.

WFOT, C. C. C; **WFOT's review on evidence-based ozone therapy**. [Spain]: WFOT, 2020.

WULFF, F. *et al.* Potencial da termografia infravermelha na detecção de manifestações patológicas ocultas ocasionadas pela umidade acidental em paredes de alvenarias cerâmicas com revestimento de argamassa e pintura. **Revista de Arquitetura IMED**, Passo Fundo, v. 5, n. 1, p. 28-47, 2016.

ZAHRA, I.; BABYN, P.; CHAPMAN, D. Mechanical, and biological effects of ultrasound: a review of present knowledge. **Ultrasound in Med & Biol**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 1085-1104, 2017.

ZÂNGARO, R. A.; FERNANDES, A. B.; LIMA, C. J. Ozônio: fundamentos e aplicações. *In*: ANDRADE, A. O. *et al.* **Tecnologias, técnicas e tendências em engenharia biomédica**. Uberlândia: Canal 6, 2014. p. 94-113.

ZHANG, J. *et al.* Degradation of methylene blue in aqueous solution by ozone-based processes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 185-189, 2009.

APÊNDICE A – Autorização para uso animal do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BARRA MANSA
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UBM
R. Vereador Pinho de Carvalho, 267, Centro, Barra Mansa – RJ.
Prédio II, 1º andar, Sala 2 - Tel.: (24) 3325-0205.
E-mail: ceua@ubm.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“USO DAS TÉCNICAS: ULTRASSOM E OZÔNIO PARA A REMOÇÃO DE TATUAGENS EM PELE SUÍNA”** protocolo nº 002/2022 sob a responsabilidade de ANGÉLICA DE ALMEIDA LUPATELLI, LEANDRO PROCÓPIO ALVES e RODRIGO ALEXIS LAZO OSORIO e sob a orientação do Prof. MSc. RAPHAEL ANDRADE DE CASTRO e da Prof.^a Dr.^a LÍVIA HELENA MOREIRA DA SILVA MÉLO, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BARRA MANSA (CEUA UBM), em reunião de 14/06/2023.

Vigência do projeto	2023/1.º Semestre a 2023/2.º Semestre
Espécie / Linhagem	<i>Sus scrofa domestica</i> / doméstico
Nº de Animais	04
Peso/Idade	10 Kg/PV / 45 dias
Sexo	Masculinos / Femininos - (dois de cada)
Origem	Propriedade Rural em São José dos Campos - SP

Barra Mansa, 07 de julho de 2023.

Prof.^a Dr.^a Simone Pontes Xavier Salles
Vice Coordenadora CEUA/UBM

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BARRA MANSA - UBM // ENTIDADE MANTENEDORA - SOBEU - ASSOCIAÇÃO BARRAMANSENSE DE ENSINO

// CAMPUS BARRA MANSA . Rua Vereador Pinho de Carvalho, 267 . Centro . Barra Mansa . RJ . CEP 27330 550 . Tel.: (24) 3325-0222 . Fax (24) 3323-3690

// CAMPUS CICUTA . Rua Luís Guilherme de Ataíde Cruz, 714 (antiga Rua 35) . Fazenda Santa Cecília . Barra Mansa . RJ . Tel.: (24) 2102-0222 . Fax: (24) 2102-0243