



## Ozonioterapia no tratamento auxiliar de éguas inférteis: Potencial angiogênico e antimicrobiano

*Ozone therapy in the supporting treatment of infertile mares: Angiogenic and antimicrobial actions*

Jair Camargo Ferreira\*, Rafael Silva Amaral, Bianca de Souza Cintra

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade de Franca, Franca, SP, Brasil

\* autor de correspondência: UNIFRAN, Av. Dr. Armando de Sáles Oliveira, 201  
Parque Universitario, Franca - SP

### Resumo

A endometrite infecciosa é considerada uma das principais causas de infertilidade em éguas. Por sua vez, alterações degenerativas endometriais interferem diretamente na hemodinâmica uterina, podendo comprometer a fertilização e a manutenção da gestação. Por serem poderosos agentes oxidantes não-específicos, o gás ozônio ( $O_3$ ) e os óleos vegetais ozonizados tem sido utilizados como alternativas às terapias antimicrobianas convencionais. Além de apresentar ação germicida frente a forma livre de fungos e bactérias, a ozonioterapia possui marcante potencial antibiofilme. Adicionalmente, o preenchimento da cavidade uterina de éguas com gás  $O_3$  estimula a angiogênese local sem apresentar efeitos deletérios ao endométrio. Dessa forma, os potenciais antimicrobianos e angiogênicos fazem da ozonioterapia uma promissora alternativa para o tratamento adjuvante de endometrites crônicas em éguas.

**Palavras-chave:** Endometrite, infecção uterina, insuflação uterina, óleo ozonizado, ozônio

### Abstract

*Infectious endometritis is considered one of the main causes of infertility in mares. Similarly, endometrial degenerative changes directly affect the uterine hemodynamics, compromising the fertilization and the maintenance of pregnancy. Based on their powerful non-specific oxidizing action, ozone ( $O_3$ ) and ozonized vegetable oils have been used as alternatives to conventional antimicrobial therapies. In addition to the germicidal effect against the free-living cells of fungi and bacteria,  $O_3$  therapy has showed unspecific anti-biofilm potential. Additionally, the insufflation of the uterine cavity of mares with  $O_3$  stimulates local angiogenesis without inducing deleterious effects on the endometrium. Therefore, the antimicrobial and angiogenic potentials make  $O_3$  therapy a promising alternative for the adjuvant treatment of persistent endometritis in mares.*

**Keywords:** Endometritis, ozonized oil, ozone, uterine infection, uterine insufflation

### Introdução

Segundo a mais recente Pesquisa Pecuária Municipal, o Brasil possui cerca de 5,9 milhões de cavalos, sendo considerado o terceiro criador de equinos do mundo (SIDRA, 2020). Estima-se que o complexo nacional do agronegócio do cavalo movimentava valor superior a R\$ 7 bilhões anuais, gerando mais de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (Arruda e Cintra, 2016). Considerando as numerosas cadeias produtivas da equideocultura, estudos que visam aumentar a taxa de fertilidade de éguas são de grande valia para a economia do país.

A princípio, a endometrite é considerada uma resposta imunológica fisiológica devido a presença do sêmen no lúmen uterino. Todavia, a sua persistência pode comprometer o funcionamento normal do trato reprodutivo, além de predispor a proliferação fúngica e bacteriana. Por sua vez, as endometrites infecciosas estão entre as principais causas de redução na eficiência reprodutiva de éguas. Da mesma forma, alterações histo-morfológicas do tecido uterino são recorrentes em éguas idosas e predisõem processos inflamatórios locais, disfunções no desenvolvimento placentário e infertilidade.

Relatos em modelos *in vitro*, roedores, ruminantes e humanos sugerem um efeito benéfico da terapia com diferentes apresentações do ozônio ( $O_3$ ) na regeneração tecidual e no combate a infecções locais. Consequentemente, a ozonioterapia tem sido utilizada por médicos veterinários de equinos ao

<sup>1</sup>Correspondência: jair.ferreira@unifran.edu.br

Recebido: 14 de outubro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



longo dos últimos anos com intuito de melhorar os índices reprodutivos. Para éguas, porém, estudos científicos sobre ao efeito do O<sub>3</sub> na hemodinâmica e microbiota uterina são escassos.

## Desenvolvimento

### *Afecções uterinas em éguas inférteis*

A endometrite infecciosa é considerada uma das doenças reprodutivas mais importantes na espécie equina. *Escherichia coli*, *Streptococcus* ssp., *Pseudomonas* ssp. e *Klebsiella* ssp. destacam-se dentre os principais patógenos isolados do trato reprodutivo de éguas com histórico de infertilidade (Ferris, 2016). Ademais, infecções uterinas por *Candida albicans* e *Aspergillus* ssp. são recorrentes em éguas de regiões tropicais (Nascimento Junior et al., 2021).

Biofilmes são complexas comunidades microbianas envoltas por uma matriz polimérica extracelular. Bactérias e fungos isolados do lúmen uterino de éguas com endometrite crônica possuem alta capacidade de produção de biofilme (Ferris et al., 2016; Nascimento Junior et al., 2020). Por apresentarem forte adesão a superfícies epiteliais e resistência a terapêutica convencional (Donlan e Costerton, 2002), os biofilmes uterinos são uma importante causa de infertilidade em éguas.

Atualmente, o tratamento para endometrites infecciosas preconiza o uso da lavagem uterina associada à agentes ecbólicos, antiinflamatórios, antibióticos e antifúngicos (Causey, 2006). Todavia, diante da crescente refratariedade das infecções uterinas à terapia convencional, faz-se necessário o desenvolvimento de tratamentos alternativos adjuvantes (Ferris et al., 2016; Scoggin, 2016).

Um adequado aporte sanguíneo tecidual é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o útero equino. Para tanto, fatores inibitórios e estimuladores atuam simultaneamente para propiciar o contínuo desenvolvimento do sistema vascular do trato reprodutivo (Allen et al., 2007). Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa caracterizou um aumento na vascularidade uterina de éguas logo após a infusão de sêmen (Ferreira et al., 2015a) e durante a fase de mobilidade embrionária (Ferreira et al., 2015b), o que demonstra a imediata capacidade adaptativa da rede vascular do útero hígado.

Em éguas, o avançar da idade é usualmente acompanhado pela intensificação das disfunções vasculares uterinas (Grüninger et al., 1998). Da mesma forma, a paridade está associada com a ocorrência de alterações angioscleróticas endometriais (Esteller-Vico et al., 2012) e uma maior resistência vascular uterina (Bollwein et al., 1998). Por sua vez, a vascularidade deficiente do útero induz distúrbios na placentação (Ousey et al., 2012), além de comprometer o contato hematológico na interface fetomaternal (Abd-Elnaeim et al., 2006).

Segmentos uterinos císticos, recorrentes em éguas idosas (Tannus e Thun, 1995), possuem menor vascularidade em comparação com regiões não císticas adjacentes (Ferreira et al., 2008). Além disso, éguas com alterações degenerativas endometriais difusas apresentam elevada resistência vascular uterina nas primeiras horas pós-inseminação (Ferreira et al., 2015b) e vascularidade endometrial deficiente ao longo da fase de reconhecimento maternal da gestação (Ferreira et al., 2015a). Tais achados corroboram com a atual busca por terapias que contribuam com a adequada perfusão sanguínea do útero em fêmeas com idade avançada.

### *Ozonioterapia*

O ozônio (O<sub>3</sub>) é um gás instável com meia vida aproximada de 40 minutos quando exposto a temperatura ambiente. Apesar de ser um potente oxidante e um dos gases mais deletérios da troposfera (Jerrett et al., 2009), o O<sub>3</sub> atua como um estressor terapêutico quando empregado em baixas concentrações (Bocci, 2012). Conseqüentemente, a ozonioterapia pode induzir a síntese de espécies reativas que estão envolvidas em múltiplas vias de sinalização celular. Em seres humanos, a suplementação com O<sub>3</sub> tem sido relacionada com um aumento da circulação sanguínea nos tecidos isquêmicos (Di Filippo et al., 2008) e com a melhora do metabolismo geral em decorrência do aumento no aporte de oxigênio (Borrelli e Bocci, 2002). Nesse sentido, a ozonioterapia induz a ativação do sistema imune e estimula a secreção de fatores de crescimento diversos (Bocci, 1999) sem gerar efeitos colaterais (Travagli et al., 2007).

Quando em altas concentrações, a exposição microbiana a mistura gasosa contendo O<sub>3</sub> induz a degradação de constituintes de membrana (Lake et al., 2004), a oxidação de grupos sulfidrilas (Silva et al., 2011) e a fragmentação do material genético (Khadre et al., 2001). Por apresentar ação antimicrobiana



com amplo espectro de ação, o gás  $O_3$  tem sido utilizado para inativar fungos (Alencar *et al.*, 2011), oomicetas (Carrizo *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2021a) e bactérias resistentes à antibióticos (Tormin *et al.*, 2015, Song *et al.*, 2017).

O gás  $O_3$  pode ser incorporado a óleos vegetais por meio de aborbulhamento, durante o qual reage com as duplas ligações carbono-carbono dos ácidos graxos insaturados para dar origem a espécies altamente reativas (Díaz *et al.*, 2012). Por sua vez, os compostos peroxídicos oferecem uma potente habilidade oxidante ao óleo vegetal ozonizado, tornando-o uma alternativa aos antimicrobianos convencionais (Sechi *et al.*, 2001). A exposição de patógenos diversos ao óleo vegetal enriquecido com  $O_3$  e com alto índice de peróxido resulta na diminuição dos grupos tiol protéicos do envelope celular (Curtiellas *et al.*, 2005) e na degradação de biomoléculas essenciais para a viabilidade microbiana (Chevrier *et al.*, 1988).

O óleo de girassol possui uma composição rica em ácidos linoléico e oleico, o que propicia uma maior síntese de peróxidos durante o processo de ozonização (Zanardi *et al.*, 2013). Estudos diversos relatam a ação bactericida do óleo de girassol ozonizado frente a formas livres de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Serio *et al.*, 2017). Adicionalmente, o uso tópico de óleos ozonizados foi clinicamente efetivo e seguro para o tratamento de infecções cutâneas por bactérias multirresistentes (Song *et al.*, 2017). De forma semelhante, a exposição ao óleo de girassol enriquecido com  $O_3$  inibe o crescimento do *Pythium insidiosum* equino (Ferreira *et al.*, 2021a) e a esporulação de dermatófitos recorrentes em animais domésticos (Ouf *et al.*, 2016), além de melhorar os aspectos clínicos de mulheres com candidíase vulvovaginal (Tara *et al.*, 2016).

#### *Ozonioterapia uterina como agente angiogênico uterino*

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o preenchimento da cavidade uterina com  $O_3$  estimula a proliferação celular sem apresentar efeitos deletérios ao endométrio equino (Ferreira *et al.*, 2021b). Um aumento no número de vasos sanguíneos e no grau de vascularidade endometrial foi observado após sucessivas insuflações uterinas com mistura gasosa contendo baixa ou moderada concentração de  $O_3$  (Figura 1). Da mesma forma, a morfometria das glândulas endometriais foi afetada positivamente pela terapia local (Figura 2), enquanto que sua morfologia não sofreu alterações significativas.

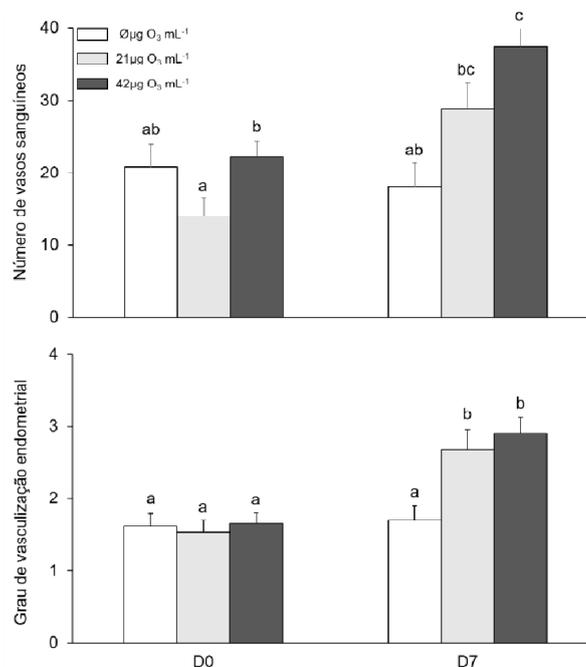


Figura 1. Média  $\pm$  SEM para número de vasos sanguíneos e grau de vascularização endometrial do útero equino imediatamente antes da primeira e 24 h após a terceira insuflação (D0 e D7, respectivamente) com uma mistura



gasosa contendo 0, 21 ou 42  $\mu\text{g O}_3 \text{ mL}^{-1}$  ( $n=9$  éguas/grupo). As cavidades uterinas foram insufladas por 3 min a cada três dias. <sup>a, b, c</sup> Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ). Adaptado de Ferreira *et al.*, 2021b.

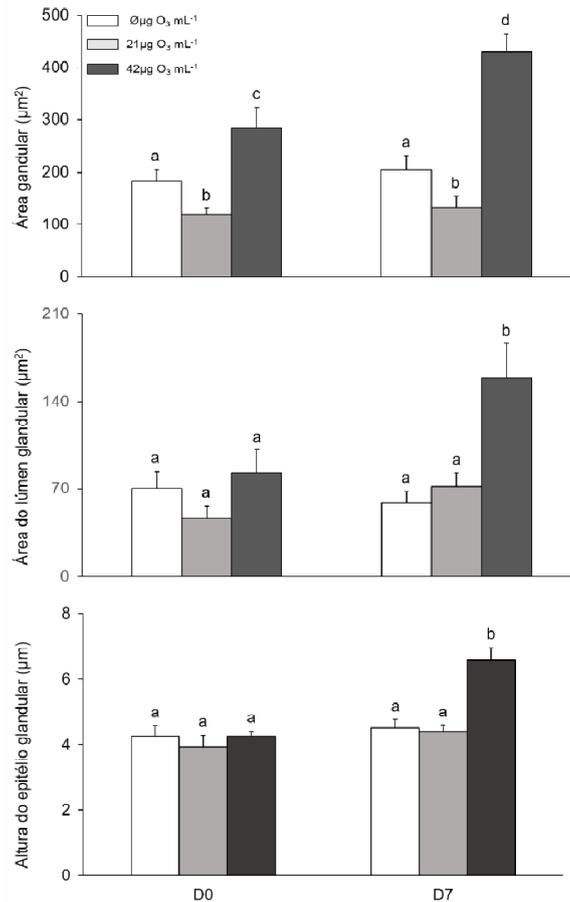


Figura 2. Média  $\pm$  SEM para área da glândula endometrial ( $\mu\text{m}^2$ ), área do lúmen glandular ( $\mu\text{m}^2$ ) e altura do epitélio glandular ( $\mu\text{m}$ ) do útero equino imediatamente antes e 24 h após a última insuflação (D0 e D7, respectivamente) com uma mistura gasosa contendo 0, 21 ou 42  $\mu\text{g O}_3 \text{ mL}^{-1}$  ( $n=9$  éguas/grupo). Os tratamentos foram realizados a cada três dias. <sup>a, b, c, d</sup> Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ). Adaptado de Ferreira *et al.*, 2021b.

Em mulheres, Calderon e colaboradores (2016) sugeriram um efeito favorável da lavagem uterina com solução salina ozonizada na angiogênese endometrial. Além disso, feridas cirúrgicas submetidas à ozonioterapia apresentam vascularidade e regeneração epidérmica mais intensas (Sahin *et al.*, 2016). Como a atrofia endometrial está associada à baixos índices reprodutivos em éguas (Bracher *et al.*, 1992), a exposição uterina ao  $\text{O}_3$  surge como uma possível terapia auxiliar frente a infertilidade.

#### *Ozonioterapia uterina como agente antimicrobiano uterino*

Até o momento, não existem estudos *in vivo* demonstrando o efeito da ozonioterapia frente a infecções uterinas na espécie equina. Todavia, a comprovada eficácia do  $\text{O}_3$  frente a cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecalis* e *Acinetobacter baumannii* (Tormin *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2017) corroboram para sua potencial aplicação no tratamento adjuvante de endometrites crônicas em éguas.

Em vacas com endometrite infecciosa, a insuflação uterina com  $\text{O}_3$  foi recentemente associada a uma redução na população microbiana local (Mali *et al.*, 2020). Além disso, a ozonioterapia intrauterina mostrou-se eficaz para o tratamento de endometrite subclínica (Escandón *et al.*, 2020) e retenção de placenta (Zobel e Tkalcic, 2013), melhorando os índices reprodutivos de vacas leiteiras.

Finalmente, a ozonioterapia também surge como uma promissora alternativa para o tratamento de endometrites crônicas devido a presença de biofilme. Achados iniciais indicam que a exposição ao



óleo de girassol ozonizado por 20 a 120 min foi o suficiente para inativar biofilmes de diversas espécies de *Candida* (Higa *et al.*, 2021; Informação pessoal). Adicionalmente, um hidrogel ozonizado desenvolvido por nosso grupo de pesquisa também apresentou atividade anti-biofilme frente a fungos e bactérias (Reinaldi *et al.*, 2021; Informação pessoal).

### Considerações finais

A ozonioterapia apresenta grande potencial para aplicação na reprodução assistida de éguas. Por não induzir alterações degenerativas ou inflamatórias intensas no tecido endometrial, a insuflação uterina com mistura gasosa O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> pode ser considerada uma terapia segura para indução da angiogênese local. Assim como o gás O<sub>3</sub>, óleos vegetais ozonizados com alto índice de peróxido possuem ação germicida frente as formas microbianas livres e aderidas. Todavia, estudos quanto ao seu potencial efeito tóxico no tecido endometrial se fazem necessários antes de sua aplicação clínica.

### Agradecimentos

FAPESP (2019/22728-2), CAPES (001) e Ozone&Life®

### Referências

- Abd-Elnaeim MMM, Leiser R, Wilsher S, Allen WR.** Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta*, v.27, p.1103- 1113, 2006.
- Alencar ER, Faroni LRA, Soares NFF, Carvalho MCS, Pereira KF.** Effect of the ozonation process on the quality of peanuts and crude oil. *Rev Bras Eng Agric Ambient*, v.15, p.154-160, 2011.
- Allen WR, Brown L, Wright M, Wilsher S.** Reproductive efficiency of flatrace and national hunt thoroughbred mares and stallions in england. *Equine Vet J*, v.39, p.438-445, 2007.
- Arruda RAS, Cintra AG.** Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. *MAPA*, v.56, 2016.
- Bocci VA.** Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci*, v.56, p.270-279, 1999.
- Bocci VA.** How a calculated oxidative stress can yield multiple therapeutic effects. *Free Radic Res*, v.46, p.1068-1075, 2012.
- Borrelli E, Bocci VA.** A novel therapeutic option for Chronic Fatigue Syndrome and Fibromyalgia. *Revista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia*, v.1, p.149-153, 2002.
- Bollwein H, Maiertl J, Mayer R, Stolla R.** Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. *Theriogenology*, v.49, p.1483-1488, 1998.
- Bracher V, Mathias S, Allen WR.** Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in subfertile mares. *Equine Vet J*, 24, 279-84, 1992.
- Calderon I, Cohen M, Sagi-Dain L, Artzi O, Bejar J, Sagi S.** The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium – A preliminary study. *J Obstet Gynaecol*, 36:5, 635-640, 2016.
- Carrijo BN, Pires RH, GB, Guiotto FG, Rodrigues VS, Ferreira JC.** (2021) Ozone gas and ozonized sunflower oil as alternative therapies against *Pythium insidiosum* isolated from dogs, *Ozone Sci Eng*, 2021.
- Causey RC.** Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. *Vet J*, v.172, P.405-21, 2006.
- Chevrier N, Fathey S, Young S.** Oxidative damages and repair in *Euglena gracilis* exposed to ozone. I. SH groups and lipids. *Plant Cell Physiol*, v.29, p.321-327, 1988.
- Curtiellas V, Gómez M, Ledea O, Fernández I, Sánchez E.** 2005. Actividad antimicrobiana del OLEOZON® sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*s. *Rev CENIC Cienc Biol*, 36, 2005.
- Díaz MF, Sánchez Y, Gomez MFD, Hernández F, Veloso MCC, Pereira PAP, Mangrich AS, Andrade JBE.** Physicochemical characteristics of ozonated sunflower oils obtained by different procedures. *Grasas Aceites*, v.63, p.466-474, 2012.
- Di Filippo C, Marfella R, Capodanno P, Ferraraccio F, Coppola L, Luongo M, Mascolo L, Capuano A, Rossi F, D'amico M.** Acute oxygen-ozone administration to rats protects the heart from ischemia reperfusion infarct. *Inflamm. Res*, v.57, p.445-449, 2008.



- Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, v.15, p.167-193, 2002.
- Escandón BM, Espinoza JS, Perea FP, Quito F, Ochoa R, López GE, Galarza DA, Garzón JP.** Intrauterine therapy with ozone reduces subclinical endometritis and improves reproductive performance in postpartum dairy cows managed in pasture-based systems. *Trop Anim Health Prod*, v.52, p.2523-2528, 2020.
- Esteller-Vico A, Liu IK, Couto S.** Uterine vascular degeneration is present throughout the uterine wall of multiparous mares. *Theriogenology*, v.78, p.1078-1084, 2012.
- Ferreira JC, Pires RH, Costa GB, Carrijo BN, Guiotto FG, Rodrigues VS.** The in vitro effect of ozone therapy against equine *Pythium insidiosum*. *J Equine Vet Sci*, v.98, p.103305, 2021a.
- Ferreira JC, Amaral RS, Cardoso LM, Marchió SP, Rodrigues MA, Alves CEF, Meira C.** Endometrial angiogenesis induced by uterine insufflation with an oxygen-ozone gas mixture in mares. *Reprod Domest Anim*, v.56, p.1176-1183, 2021b.
- Ferreira JC, Canesin HS, Ignácio FS, Rocha NS, Pinto CR, Meira C.** Effect of age and endometrial degenerative changes on uterine blood flow during early gestation in mares. *Theriogenology*, v.84, p.1123-30, 2015a.
- Ferreira JC, Ignácio FS, Rocha NS, Thompson DL Jr, Pinto CR, Meira C.** Real-time characterization of the uterine blood flow in mares before and after artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.160, p.90-6, 2015b.
- Ferreira JC, Gastal EL, Ginther OJ.** Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. *Reprod*, v.135, p.541-50, 2008.
- Ferris RA.** Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.32, p.481-498, 2016.
- Ferris RA, McCue PM, Borlee GI, Loncar KD, Hennet ML, Borlee BR.** In vitro efficacy of nonantibiotic treatments on biofilm disruption of gram-negative pathogens and an in vivo model of infectious endometritis utilizing isolates from the equine uterus. *J Clin Microbiol*, v.54, p.631-639, 2016.
- Grüniger B, Schoon H-A, Schoon D, Menger S, Klug E.** Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *J Comp Pathol*, v.119, p.293-309, 1998.
- Higa B, Ferreira JC, Pires RH.** Ação fungicida do óleo de girassol ozonizado sobre biofilmes de espécies de *Candida*. III Encontro Científico Internacional de Ozonioterapia, São Paulo, Brasil, 2021.
- Jerrett M, Burnett RT, Pope CA, Ito K, Thurston G, Krewski D, Shi Y, Calle E, Thun M.** Long-Term Ozone Exposure and Mortality. *N Engl J Med*, v.360, p.1085-1095, 2009.
- Khadre MA, Yousef AE, Kim JG.** Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *J Food Sci*, v.66, p.1242-1252, 2001.
- Lake JC, Felberg S, Malavazzi GR, Goulart DA, Nishiwaki-Dantas MC, Dantas PEC.** Efeito terapêutico da aplicação intra-ocular de ozônio em modelo experimental de endoftalmite por *Staphylococcus epidermidis* em coelhos. *Arq Bras Oftalmol*, v.67, p.575-9, 2004.
- Mali SS, Rangnekar MN, Amle MB, Khillare KP, Mali AB, Mhase PP.** Efficacy of intrauterine ozone therapy in repeat breeder cows with subclinical uterine infection. *Haryana Vet*, v.59, p.83-86, 2020.
- Nascimento Júnior JAA, Oliveira Filho EF, Melo AGP, Correia MTS, Carneiro GF.** Fungal characterization and biofilm formation in mares with endometritis. *Rev Bras Reprod Anim*, v.45, p.33-38, 2021.
- Ouf AS, Moussa TA, Abd-Elmegeed AM, Eltahlawy SR.** Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. *Braz J Microbiol*, v.47, p.697-702, 2016.
- Ousey J, Kölling M, Newton R, Wright M, Allen WR.** Uterine haemodynamics in young and aged pregnant mares measured using Doppler ultrasonography. *Equine Vet J*, v.44, p.15-21, 2012.
- Reinaldi JS, Higa B, Cintra BS, Pedrosa GA, Pires RH, Molina EF, Ferreira JC.** Potencial antimicrobiano e antibiofilme de formulações de hidrogel contendo óleo de girassol ozonizado. III Encontro Científico Internacional de Ozonioterapia, São Paulo, Brasil, 2021.
- Sahin H, Simsek T, Turkon H, Kalkan Y, Ozkul F, Ozkan MT, Erbas M, Altinisik U, Demiraram Y.** The acute effects of preoperative ozone therapy on surgical wound healing. *Acta Cir Bras*, v.31, p.472-478, 2016.
- Scoggin CF.** Endometritis: Nontraditional Therapies. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.32, p.499-511, 2016.
- Serio F, Pizzolante G, Cozzolino G, D'Alba M, Bagordo F, De Giorgi M, Grassi T, Idolo A, Guido M, De Donno A.** A new formulation based on ozonated sunflower seed oil: in vitro antibacterial and



- safety evaluation. *Ozone Sci Eng*, v.39, p.139–147, 2017.
- SIDRA, 2020.** Sistema IBGE de Recuperação Automática –. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>. Acesso em 08 out 2021.
- Silva SB, Luvielmo MM, Geyer MC, Prá I.** Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. *Semina: Ciênc Agrár*, v.32, p. 659- 682, 2011.
- Song M, Zeng Q, Xiang Y, Gao L, Huang J, Huang J, Wu K, Lu J.** The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep*, v.17, p.2449-2455, 2017.
- Song M., Zeng Q, Xiang Y, Gao L, Huang J, Huang J, Wu K, Lu J.** The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep*, v.17, p.2449-2455, 2017.
- Tara F, Zand-Kargar Z, Rajabi O, Berenji F, Akhlaghi F, Shakeri MT, Azizi H.** The Effects of Ozonated Olive Oil and Clotrimazole Cream for Treatment of Vulvovaginal Candidiasis. *Altern Ther Health Med*, v.22, p.44-49, 2016.
- Tannus RJ, Thun R.** Influence of endometrial cysts on conception rate of mares. *J Vet Med*, v.42, p.275–283, 1995.
- Tormin SC, Navarrini A, Almeida JOCF, Travassos LHR., Negri MVG, SILVA RA.** Análise do efeito bactericida do ozônio sobre bactérias multirresistentes. *Arq Méd Hosp Fac*, v. 61, n. 3, 2016.
- Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V.** A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol*, v.41, p.504-511, 2007.
- Zanardi I., Burgassi S, Paccagnini E, Gentile M, Bocci V, Travagli V.** What is the best strategy forenhancing the effects of topically applied ozonated oils in cutaneous infections? *Biomed Res Int*, v.29, p.65-73, 2013.
- Zobel R, Tkalčić S.** Efficacy of ozone and other treatment modalities for retained placenta in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, v.48, p.121-125, 2013.
-