

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MÁRIO FERNANDO ALVES BRAGA

EFEITOS DE BIOESTIMULADORES HIDROXIAPATITA E ÁCIDO POLI-D-
LÁCTICO ASSOCIADOS OU NÃO A OZONIOTERAPIA NO REPARO DE FERIDAS
CRÔNICAS EM RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DE CONTRAÇÃO DA FERIDA.

Uberlândia - MG

Julho/2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MÁRIO FERNANDO ALVES BRAGA

EFEITOS DE BIOESTIMULADORES HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO E ÁCIDO
POLI-D-LÁCTICO ASSOCIADOS OU NÃO A OZONIOTERAPIA NO REPARO DE
FERIDAS CRÔNICAS EM RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DE CONTRAÇÃO DA
FERIDA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como pré-
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia pelo curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia de Souza Castro Filice

Uberlândia - MG

Julho/2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DE BIOESTIMULADORES HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO E ÁCIDO
POLI-D-LÁCTICO ASSOCIADOS OU NÃO A OZONIOTERAPIA NO REPARO DE
FERIDAS CRÔNICAS EM RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DE CONTRAÇÃO DA
FERIDA.

Mário Fernando Alves Braga

Profa.Dra. Letícia de Souza Castro Filice
Faculdade de Medicina (FAMED)

Instituto de Biotecnologia homologado pela
Coordenação do Curso de Biotecnologia __/__/__.

Profa.Dra. Rute Magalhães Brito

Uberlândia - MG
Julho/2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

EFEITOS DE BIOESTIMULADORES HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO E ÁCIDO
POLI-D-LÁCTICO ASSOCIADOS OU NÃO A OZONIOTERAPIA NO REPARO DE
FERIDAS CRÔNICAS EM RATOS WISTAR: AVALIAÇÃO DE CONTRAÇÃO DA
FERIDA

Mário Fernando Alves Braga

Aprovado pela Banca Examinadora em: __/__/__. Nota:

Profa. Dra. Leticia de Souza Castro Filice – Faculdade de
Medicina – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Msc. Isabela dos Santos Rocha – Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade
Federal de Uberlândia (UFU)

Msc. Willian Elias – Técnico do laboratório de técnicas
histológicas – Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

Uberlândia, 17 de julho de 2026.

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer a mim, ao longo deste processo complicado e desgastante, me ter feito caminhar nos momentos em que pensei em desistir diante das dificuldades encontradas nesta trajetória acadêmica.

Sou grato à minha família, em especial à minha mãe Vani Alves Braga e meu pai Mário Gonçalves Braga por me educarem, sempre me apoiarem e me incentivarem a conquistar minhas ambições e desejos. Grato à minha madrinha Patrícia Luiz Machado, à minha madrinha Mara Gonçalves Braga, à minha madrinha Marta Gonçalves Braga, à minha tia Marcia Maria Gonçalves Braga, à minha avó Terezinha Maria Braga, por sempre me incentivarem a dar o meu melhor e por serem os pilares nas horas em que mais precisei.

Sou grato pela minha orientadora Letícia de Souza Castro Filice pela amizade, paciência e dedicação ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho, por todo conhecimento transmitido a mim. Possuo muito orgulho de ser seu orientado durante a graduação e ter realizado 3 iniciações científicas e a produção deste trabalho.

Sou grato à Tatiana Lara Perini Amâncio pelo apoio concedido a todas as minhas solicitações enviadas ao Instituto de Biotecnologia, grato ao Biotério de roedores da UFU e aos integrantes dele por fornecerem suporte a tudo o que foi necessário, grato ao Laboratório de Nanobiotecnologia Luiz Ricardo Goulart Filho por me acolher durante a graduação e permitir a realização deste trabalho.

Sou grato aos meus amigos que obtive durante a graduação, por atuarem junto a mim e por serem companheiros durante esses anos. Agradeço em especial aos meus amigos Aurea Camilli Ramos, Isabela dos Santos Rocha, Kellen Marques, Lucas Peres, Luma Lara dos Reis, Murilo Ávila, Otávio Silveira Rizzi, e Wellington Paiva, por sempre serem presentes e serem ótimos amigos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil e o Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

RESUMO

As feridas crônicas representam um importante problema de saúde pública, pois apresentam reparo tecidual prolongado, elevada suscetibilidade a complicações e impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, a ozonioterapia e os bioestimuladores de colágeno apresentam potencial para favorecer a cicatrização. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da hidroxiapatita de cálcio (CaHA), do ácido poli-D-lático (PDLA) e da ozonioterapia, utilizados isoladamente ou em associação, sobre a contração de feridas crônicas induzidas em ratos Wistar. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, distribuídos em seis grupos experimentais, com cinco animais cada: controle, ozonioterapia, CaHA, CaHA associada à ozonioterapia, PDLA e PDLA associado à ozonioterapia. As lesões cutâneas foram produzidas na região dorsal por meio de punch circular de 6 mm e submetidas à aplicação tópica de peróxido de hidrogênio a 35% para indução da cronicidade. Os tratamentos foram iniciados após dez dias da indução das feridas. A evolução das lesões foi acompanhada por registros fotográficos, e suas áreas foram determinadas no software ImageJ para cálculo do percentual de contração. Os dados foram avaliados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido de análise de variância de uma via e pós-teste de Dunnett, considerando-se $p < 0,05$. O grupo tratado com PDLA apresentou o maior percentual médio de contração das feridas (57,83%), diferindo significativamente do controle ($p = 0,0012$). A ozonioterapia isolada também promoveu aumento significativo da contração, com média de 49,03% ($p = 0,0052$). Os grupos CaHA, CaHA associada à ozonioterapia e PDLA associado à ozonioterapia não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Conclui-se que o PDLA e a ozonioterapia, utilizados isoladamente, favoreceram a contração das feridas no modelo experimental avaliado, enquanto suas associações não produziram benefício estatisticamente significativo adicional.

Palavras-chave: cicatrização; feridas crônicas; ácido poli-D-lático; hidroxiapatita de cálcio; ozonioterapia.

ABSTRACT

Chronic wounds represent an important public health problem because they are associated with prolonged tissue repair, increased susceptibility to complications, and a significant negative impact on patients' quality of life. In this context, ozone therapy and collagen biostimulators have the potential to improve wound healing. This study aimed to evaluate the effects of calcium hydroxylapatite (CaHA), poly-D-lactic acid (PDLA), and ozone therapy, administered alone or in combination, on the contraction of experimentally induced chronic wounds in Wistar rats. Thirty male Wistar rats were allocated into six experimental groups of five animals each: control, ozone therapy, CaHA, CaHA combined with ozone therapy, PDLA, and PDLA combined with ozone therapy. Cutaneous wounds were created on the dorsal region using a 6-mm circular biopsy punch and were subjected to topical application of 35% hydrogen peroxide to induce chronicity. Treatments were initiated ten days after wound induction. Wound progression was monitored through serial photographic documentation, and wound areas were measured using ImageJ software to calculate the percentage of wound contraction. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test, followed by one-way analysis of variance and Dunnett's multiple-comparison post hoc test, with statistical significance established at $p < 0.05$. The PDLA-treated group showed the highest mean wound contraction percentage (57.83%) and differed significantly from the control group ($p = 0.0012$). Ozone therapy alone also significantly increased wound contraction, with a mean value of 49.03% ($p = 0.0052$). The CaHA, CaHA combined with ozone therapy, and PDLA combined with ozone therapy groups showed no statistically significant differences compared with the control group. In conclusion, PDLA and ozone therapy administered separately improved wound contraction in the experimental model, whereas their combinations did not provide a statistically significant additional benefit.

Keywords: wound healing; chronic wounds; poly-D-lactic acid; calcium hydroxylapatite; ozone therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das camadas da pele Fonte: Carvalho et al. (2024).	13
Figura 2: Evolução macroscópica representativa das feridas crônicas nos diferentes grupos experimentais durante o período de tratamento. Fonte: Próprio autor	25
Figura 3 – Evolução temporal da contração das feridas nos diferentes grupos experimentais. Fonte: Próprio autor.....	27
Figura 4 – Comparação do percentual de contração das feridas entre os grupos experimentais.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais.....	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CaHa	Hidroxiapatita de Cálcio (<i>Calcium Hydroxyapatite</i>)
PDLA	Ácido Poli-D-Láctico (<i>Poly-D-Lactic Acid</i>)
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
REBIR – UFU	Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia
HEPA	High Efficiency Particulate Air

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
1.1 Feridas Crônicas.....	12
1.2 Pele.....	12
1.3 Bioestimuladores.....	15
1.4 Ozonioterapia.....	15
2.Objetivo geral.....	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Modelo animal.....	17
3.2 Cálculo do tamanho amostral.....	18
3.3 Indução de lesão crônica	19
3.4 Análise das imagens	20
3.5 Tratamentos.....	21
3.6 Método de Eutanásia.....	22
3.7 Análise Macroscópica.....	23
3.8 Análise Estatística	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Análise Macroscópica.....	24
4.2 Avaliação de contração de ferida.....	26
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1.INTRODUÇÃO

1.1 Feridas Crônicas

As feridas crônicas representam um importante desafio para os sistemas de saúde devido à elevada prevalência, ao prolongado tempo de cicatrização, ao elevado custo assistencial e ao impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes. Essas lesões caracterizam-se pela interrupção do processo fisiológico de reparo tecidual, permanecendo em um estado inflamatório persistente que compromete a progressão ordenada das fases de cicatrização. Em condições fisiológicas, o reparo tecidual ocorre por meio das fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Não obstante, nas feridas crônicas, a persistência da fase inflamatória impede a adequada formação do tecido de granulação e a remodelação da matriz extracelular, culminando na falha do processo cicatricial (Harding, Morris e Patel, 2002; Bowers e Franco, 2020). Diversos fatores podem contribuir para a cronicidade da ferida, como a presença de infecção, insuficiência vascular e hiperglicemia. Essas condições podem alterar a resposta imunológica e o fornecimento de nutrientes essenciais para o processo de reparação. A presença de biofilmes bacterianos também dificulta a resposta inflamatória e o processo de cicatrização, criando um ambiente favorável à persistência da infecção (Harding, Morris e Patel, 2002; Zhao et al., 2016).

O tratamento das feridas crônicas permanece um desafio clínico, exigindo abordagem multifatorial que envolve controle da infecção, manejo do microambiente da lesão e utilização de terapias capazes de estimular o reparo tecidual. Entre essas estratégias destacam-se curativos avançados, oxigenoterapia hiperbárica, terapias celulares e biomateriais regenerativos (Zhao et al., 2016).

1.2 Pele

A compreensão da estrutura e da organização funcional da pele é fundamental para o entendimento dos mecanismos envolvidos na cicatrização, uma vez que esse tecido constitui o principal alvo das alterações estruturais e celulares observadas durante o reparo das feridas crônicas.

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha funções essenciais para a manutenção da homeostase, atuando como barreira física, química e imunológica entre o

organismo e o ambiente externo. Além da proteção contra agentes mecânicos, químicos e microbiológicos, participa da termorregulação, percepção sensorial, metabolismo da vitamina D e manutenção do equilíbrio hídrico, sendo fundamental para a sobrevivência do organismo (BLAIR et al., 2020; GUSHIKEN et al., 2021).

Estruturalmente, a pele é composta por três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme constitui a camada mais superficial e é formada predominantemente por queratinócitos organizados em diferentes estratos celulares. Essa camada é responsável pela proteção contra a invasão de microrganismos e pela redução da perda transepidérmica de água. Além dos queratinócitos, a epiderme contém melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, que participam de funções relacionadas à pigmentação, resposta imunológica e percepção sensorial, respectivamente (ABDO et al., 2020).

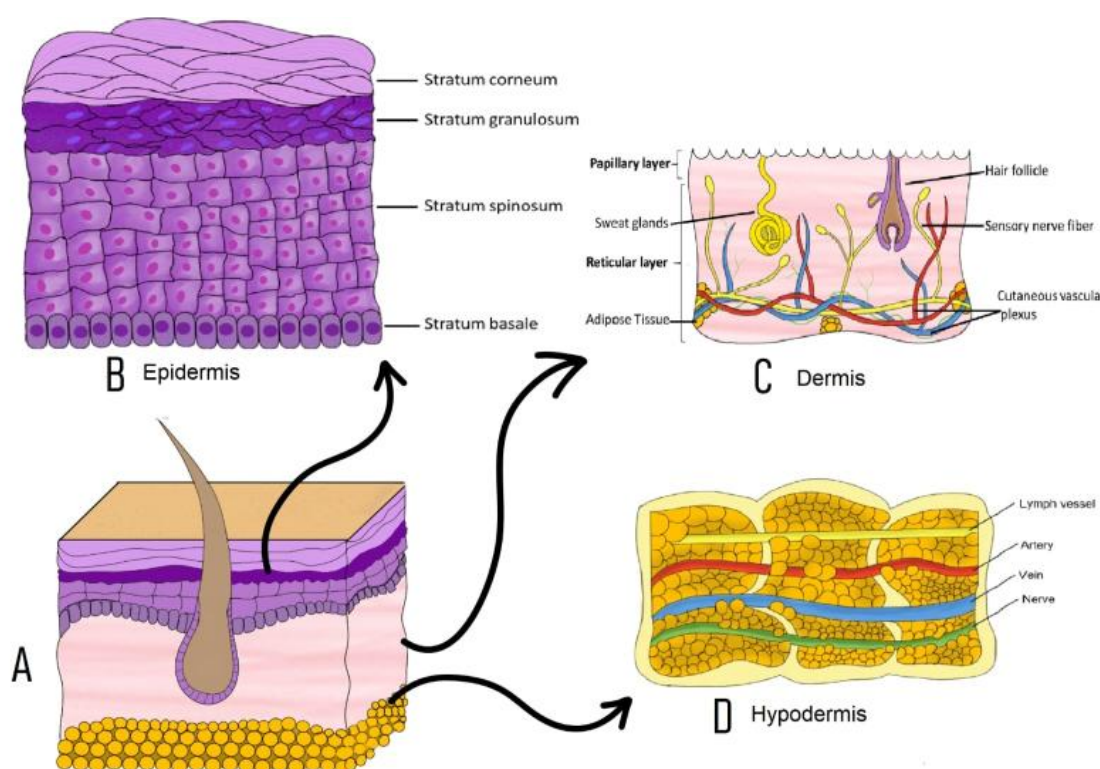


Figura 1: Representação esquemática das camadas da pele Fonte: Carvalho et al. (2024).

(A) Representação esquemática da organização estrutural da pele; (B) a epiderme corresponde à camada mais externa da pele; (C) a derme encontra-se conectada à epiderme e é constituída por tecido conjuntivo rico em colágeno, responsável pela resistência e elasticidade cutânea. Nessa camada localizam-se glândulas sudoríparas,

glândulas sebáceas, pelos, folículos pilosos, músculos, terminações nervosas, vasos sanguíneos e células dendríticas; (D) a hipoderme constitui a camada mais profunda da pele, localizada abaixo da derme, sendo também denominada tecido subcutâneo.

A derme localiza-se abaixo da epiderme e é composta principalmente por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, fibras elásticas e matriz extracelular. Essa camada fornece resistência mecânica e elasticidade à pele, além de abrigar vasos sanguíneos, terminações nervosas e anexos cutâneos. Os fibroblastos representam a principal população celular dérmica e são responsáveis pela síntese e remodelação dos componentes da matriz extracelular, desempenhando papel fundamental na manutenção estrutural do tecido e nos processos de reparação após lesões (BLAIR et al., 2020; BORALDI et al., 2024).

A hipoderme, ou tecido subcutâneo, é constituída predominantemente por tecido adiposo associado ao tecido conjuntivo frouxo. Essa camada atua como reserva energética, isolante térmico e amortecedor mecânico, contribuindo para a proteção das estruturas mais profundas e para a distribuição das forças exercidas sobre a superfície corporal (ABDO et al., 2020).

A integridade da pele depende da interação coordenada entre células residentes, matriz extracelular e mediadores bioquímicos. Quando ocorre uma lesão, inicia-se uma complexa cascata de eventos biológicos que envolve inflamação, proliferação celular, angiogênese e remodelação tecidual. Nesse contexto, os fibroblastos desempenham papel central na deposição de colágeno e na formação do tecido de granulação, contribuindo diretamente para a restauração da arquitetura tecidual. O colágeno, principal proteína estrutural da matriz extracelular cutânea, é indispensável para a resistência mecânica da pele e para a adequada evolução do processo cicatricial (MATHEW-STEINER; ROY; SEN, 2021).

Embora o processo fisiológico de cicatrização seja eficiente na maioria dos casos, diversas condições podem interromper essa sequência coordenada de eventos, resultando no desenvolvimento de feridas crônicas. Alterações estruturais ou funcionais nos componentes da pele podem comprometer o reparo tecidual e favorecer o desenvolvimento de feridas de difícil cicatrização. Essas alterações frequentemente resultam na manutenção de um ambiente inflamatório persistente, característico das feridas crônicas, que representam um importante problema de saúde pública devido à

elevada morbidade, impacto na qualidade de vida e custos associados ao tratamento (CAÑEDO-DORANTES; CAÑEDO-AYALA, 2019; GUSHIKEN et al., 2021)

1.3 Bioestimuladores

Nos últimos anos, biomateriais bioestimuladores têm despertado crescente interesse como estratégias terapêuticas para favorecer o reparo tecidual. Entre os materiais mais estudados destacam-se a hidroxiapatita de cálcio (CaHA) e o ácido poli-D-lático (PDLA), capazes de estimular a atividade fibroblástica e a síntese de colágeno por meio de resposta inflamatória subclínica controlada, seguida pela deposição de matriz extracelular e neocolagênese (Breithaupt; Fitzgerald, 2015). Contudo, ainda são escassos os estudos que investigam seus efeitos em modelos experimentais de feridas crônicas, especialmente quando associados à ozonioterapia.

O ozônio, uma molécula oxidante altamente reativa, tem sido empregado como terapia coadjuvante para doenças cutâneas devido ao seu baixo custo e à sua ação não invasiva. Estudos *in vitro* demonstraram que o ozônio é capaz de ativar fibroblastos, alterando estruturalmente essas células, que possuem papel crucial no processo cicatricial. Tal característica apresenta importantes implicações terapêuticas, destacando a necessidade de avaliação em sistemas vivos que apresentem uma multiplicidade de interações humorais e celulares (CISTERNA et al., 2021).

Diante da dificuldade de cicatrização de feridas crônicas com a terapia convencional, o estudo da ação cicatricial *in vivo* da hidroxiapatita de cálcio (CaHa), do ácido polilático (PDLA) e do ozônio é promissor. Para isso, a indução cirúrgica de feridas crônicas na região dorsal de ratos Wistar, da espécie *Rattus norvegicus*, utilizando peróxido de hidrogênio, surge como abordagem relevante, pois gera uma resposta inflamatória intensa, sendo necessário o uso de doses de analgésicos para controle da dor (LOSS, 2013).

1.4 Ozonioterapia

A ozonioterapia consiste na utilização terapêutica do ozônio medicinal (O₃), reconhecido por suas propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras e moduladoras da resposta oxidativa. Nas últimas décadas, essa abordagem vem sendo investigada como alternativa complementar para o tratamento de diferentes condições clínicas, incluindo feridas crônicas, devido ao seu potencial para favorecer a regeneração tecidual.

O principal mecanismo de ação da ozonioterapia envolve a capacidade do ozônio de estimular a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo a oxigenação dos tecidos e aumentando a capacidade antioxidante local. Essa resposta contribui para a ativação de processos bioquímicos que favorecem a cicatrização, como a síntese de colágeno e a formação de novos vasos sanguíneos. Além disso, o ozônio atua na redução de biofilmes bacterianos, dificultando a persistência de infecções no local da ferida (ELVIS et al., 2011).

No contexto das feridas crônicas, a ozonioterapia tem mostrado benefícios significativos, especialmente em condições como úlceras diabéticas e úlceras de pressão. Estudos demonstram que o uso combinado de ozônio com outras terapias, como bioestimuladores, pode acelerar o processo de cicatrização e melhorar a qualidade do tecido regenerado, a sua administração pode ser feita de diversas formas, incluindo aplicação tópica, insuflação ou água ozonizada, devendo respeitar os protocolos de segurança, já que o ozônio em concentrações inadequadas pode causar danos aos tecidos (SILVA FILHO et al., 2024).

Diante desse cenário, torna-se relevante investigar estratégias terapêuticas capazes de favorecer a reparação de feridas crônicas. Embora a ozonioterapia e os bioestimuladores apresentem potencial regenerativo, permanecem limitadas as evidências experimentais comparando seus efeitos isolados e associados. Assim, o presente estudo busca contribuir para o avanço do conhecimento acerca dessas abordagens terapêuticas utilizando um modelo experimental padronizado de feridas crônicas em ratos Wistar.

2.Objetivo geral

Avaliar os efeitos da hidroxiapatita de cálcio, do ácido poli-D-láctico e da ozonioterapia, empregados isoladamente ou em associação, sobre a contração de feridas crônicas experimentalmente induzidas em ratos Wistar.

2.1 Objetivos específicos

1. Realizar lesão cutânea nos ratos *Wistar* e as tornar crônicas por meio de protocolo com peróxido de hidrogênio;
2. Tratar as feridas com os bioestimuladores e ozonioterapia;
3. Verificar e quantificar a contração das feridas;

4. Realizar análise macroscópica das feridas tratadas;
5. Realizar fotografia e medição das feridas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

O projeto foi apresentado à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia e aprovado conforme protocolo nº 23117.026478/2024-33 se encontrando de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas ditadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

O marco regulatório brasileiro para a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica foi estabelecido pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, conhecida como Lei Arouca. Essa legislação regulamenta os procedimentos relacionados ao uso científico de animais, visando garantir sua utilização de forma ética, responsável e em conformidade com os princípios do bem-estar animal. Além disso, a lei instituiu o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e tornou obrigatória a criação das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) nas instituições que desenvolvem atividades de pesquisa e ensino envolvendo modelos animais, atribuindo a esses órgãos a responsabilidade de avaliar, normatizar e fiscalizar os protocolos experimentais, assegurando sua adequação ética e científica (BRASIL, 2008).

A utilização de modelos animais permanece essencial para o avanço do conhecimento biomédico, especialmente em estudos relacionados ao reparo tecidual, uma vez que os processos envolvidos na cicatrização dependem de interações complexas entre células, mediadores inflamatórios, matriz extracelular, vascularização e resposta imunológica sistêmica, aspectos que não podem ser completamente reproduzidos em modelos *in vitro*. Nesse contexto, os ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) destacam-se como um dos modelos experimentais mais utilizados em pesquisas biomédicas devido à sua facilidade de manejo, curto ciclo de vida, baixo custo de manutenção e ampla caracterização fisiológica e genética.

Além disso, os roedores apresentam elevada homologia genética com os seres humanos, compartilhando uma parcela significativa de genes e vias biológicas conservadas entre as espécies, o que permite a obtenção de resultados com relevante

potencial translacional para a medicina humana. Dessa forma, a utilização desses animais contribui para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na cicatrização e para a avaliação da eficácia e segurança de novas abordagens terapêuticas destinadas ao tratamento de feridas crônicas.

Paralelamente aos aspectos éticos e científicos, a qualidade sanitária dos animais constitui um fator determinante para o bem-estar animal e para a reprodutibilidade dos resultados experimentais. Alterações no estado microbiológico podem influenciar respostas fisiológicas e imunológicas, comprometendo a confiabilidade dos dados obtidos. Assim, instalações destinadas à criação e experimentação animal devem adotar programas rigorosos de monitoramento sanitário, seguindo protocolos reconhecidos internacionalmente, como aqueles propostos pela *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA), visando assegurar condições adequadas de saúde e manejo dos animais utilizados em pesquisa (MÄHLER et al., 2014).

Foram utilizados 30 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), com sete semanas de idade, pesando em média 300-330g provenientes da rede do Biotério central da UFU (REBIR) para indução de feridas crônicas.

Os animais foram alojados em mini isoladores, próprios para a espécie, medindo 32 cm de comprimento, 20 cm de largura e 21 cm de altura e receberão como cama, maravalha de *Pinus eliotti*, autoclavada, posicionados em *Racks* ventilados. A água filtrada por radiação ultravioleta e a ração irradiada foram fornecidas ad libitum. Os animais foram mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas respectivamente, em sala com controle de temperatura e umidade ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $55\% \pm 5\%$).

A troca dos animais foi realizada semanalmente, ou quando houve necessidade. No mini isolador a entrada de ar e a exaustão são filtradas por filtro HEPA, isolando o animal do macroambiente. Ademais, em cada mini-isolador foi alojado no máximo 5 animais por gaiola.

3.2 Cálculo do tamanho amostral

Para cálculo do tamanho mínimo e máximo da amostra em estudo de grupos experimentais diferentes, utilizando o teste *one-way* ANOVA, utilizaremos o grau de liberdade (*degree of freedom* -DF) mínimo do teste = 08 e máximo = 20, conforme Arifin, Zahiruddin 2017.

O grau de liberdade nas fórmulas será substituído com graus de liberdades mínimo (08) e máximo (20) para obter o número mínimo e máximo de animais por grupo:

$$\text{Mínimo } n=08/k + 1$$

$$\text{Máximo } n=20/k + 1$$

Sendo n = número de indivíduos por grupo e

k = número de grupos

Para a confecção dos gráficos e análise estatística iremos analisar cada animal separadamente, não iremos fazer um comparativo entre as diferentes linhagens de animais nem entre os diferentes sexos. Deste modo serão utilizados 6 grupos experimentais para a comparação dos testes analisados, por exemplo.

$$n = DF/k + 1$$

$$n \text{ mínimo será, } n=8/2 + 1 = 4,0$$

$$n \text{ máximo será, } n=20/2 + 1 = 11,0$$

Dessa forma o número mínimo e máximo de animais por grupo, manterá os graus de liberdade dentro dos limites mínimo e máximo, como mostrado abaixo:

$$DF = N - k$$

N = número total de indivíduos

Por exemplo, utilizando-se um n mínimo de 4,0: $DF = N - k$, $DF=12-2=10$ e utilizando-se um n máximo de 11: $DF = N - k$, $DF=22-2 = 20$. Então, utilizaremos o número de 5 animais por grupo que está entre o limite mínimo e máximo dos graus de liberdade.

3.3 Indução de lesão crônica

As lesões cutâneas foram induzidas nos animais utilizando punch circular de biópsia de 6 mm de diâmetro, sendo confeccionadas duas feridas paralelas na região dorsal superior de cada animal. Inicialmente, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano, utilizando concentração de 3–5% para indução anestésica e 1–3% para manutenção, administrado em oxigênio medicinal. Adicionalmente, foi realizada anestesia por via intraperitoneal com associação de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), a fim de garantir adequada analgesia e profundidade anestésica durante o

procedimento. Após a confirmação do plano anestésico, foi realizada a tricotomia da região dorsal, seguida de antisepsia com gaze embebida em álcool etílico a 70%.

Como protocolo analgésico pós-operatório, foi administrado tramadol na dose de 10 mg/kg por via subcutânea imediatamente após o procedimento cirúrgico e a cada 12 horas durante os três primeiros dias subsequentes à indução das lesões. Adicionalmente, foi administrada morfina na dose de 2 mg/kg por via subcutânea, conforme necessidade clínica e avaliação dos parâmetros de dor e desconforto dos animais, de acordo com o protocolo de bem-estar animal estabelecido para o estudo.

Após a antisepsia, foram realizadas duas lesões cutâneas excisionais na região dorsal, uma se utilizando de punch circular de biópsia de 6 mm de diâmetro, tesoura cirúrgica e pinça e outra ferida se utilizando de pinça e tesoura com cerca de 12mm de comprimento e 6mm de largura. Para indução da cronicidade das feridas, foram aplicados topicamente 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 35%, duas vezes ao dia, durante 20 dias consecutivos. Durante esse período, as lesões foram fotografadas para acompanhamento macroscópico do processo cicatricial.

As feridas foram registradas por meio de documentação fotográfica diariamente e mensuradas com o auxílio de um paquímetro digital, nos dias zero, dois, quatro, seis, sete, oito, 10, 12, 14, 16, 18, 20.

3.4 Análise das imagens

As imagens das feridas realizadas com punch circular de 6mm foram analisadas utilizando o software *ImageJ bundled with 64-bit Java 8*. Inicialmente, foi realizada a calibração da escala das imagens utilizando como referência as medidas obtidas com paquímetro durante o acompanhamento experimental. Após a calibração, a área das feridas foi determinada por meio do delineamento manual de suas bordas, permitindo a obtenção da área lesionada em mm².

As fotografias foram obtidas de forma padronizada ao longo de todo o período experimental, mantendo-se a mesma distância focal, angulação e posicionamento dos animais durante os registros fotográficos. Todas as mensurações e registros fotográficos foram realizados por um único avaliador, visando reduzir variações metodológicas e garantir maior uniformidade na obtenção dos dados.

As imagens foram analisadas individualmente em cada período experimental, possibilitando o acompanhamento da evolução do processo cicatricial ao longo do estudo.

Os valores obtidos foram posteriormente organizados para elaboração de gráficos e realização das análises comparativas entre os grupos experimentais.

3.5 Tratamentos

Os tratamentos foram iniciados após 10 dias da indução das feridas. A água ozonizada 8mg/mL foi administrada topicamente sobre as lesões na quantidade de 100 µL por ferida (200 µL por animal), uma vez ao dia, durante 20 dias consecutivos. Nos animais pertencentes ao grupo controle, foi aplicada solução de cloreto de sódio a 0,9% na mesma quantidade e frequência de administração.

A hidroxiapatita de cálcio (CaHa) na concentração de 300 mg/mL foi diluída em solução fisiológica estéril, ozonizada ou não, conforme o grupo experimental, seguindo as recomendações do fabricante para preparo do produto. Após a preparação, foram administrados 100 µL por ferida (200 µL por animal) por via intralesional nos dias 10 e 20 após a indução das lesões.

O ácido poli-D-láctico (PDLA) foi reconstituído em água destilada estéril na concentração de 18,75 mg/mL, ozonizada ou não, de acordo com o grupo experimental, seguindo as orientações do fabricante para obtenção de uma suspensão homogênea e estéril. Após a reconstituição, foram administrados 100 µL por ferida (200 µL por animal) por via intralesional nos dias 10 e 20 após a indução das lesões.

Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais: grupo controle tratado com solução de cloreto de sódio a 0,9%; grupo tratado com água ozonizada; grupo tratado com hidroxiapatita de cálcio (CaHa); grupo tratado com hidroxiapatita de cálcio associada à água ozonizada; grupo tratado com ácido poli-D-láctico (PDLA); e grupo tratado com ácido poli-D-láctico associado à água ozonizada.

Tabela 1: Grupos experimentais

Grupo	n	Tratamento	Via de administração	Volume administrado
Controle (NaCl)	5	Solução de cloreto de sódio 0,9%	Tópica	100 µL por ferida (200 µL/animal)
O ₃	5	Água ozonizada	Tópica	100 µL por ferida (200 µL/animal)
CaHa	5	Hidroxiapatita de cálcio diluída em soro fisiológico estéril	Intralesional	100 µL por ferida (200 µL/animal)
CaHa + O ₃	5	Hidroxiapatita de cálcio diluída em soro fisiológico ozonizado associada à água ozonizada tópica	Intralesional + tópica	100 µL por ferida (200 µL/animal)
PDLA	5	Ácido poli-D-láctico diluído em água destilada estéril	Intralesional	100 µL por ferida (200 µL/animal)
PDLA + O ₃	5	Ácido poli-D-láctico diluído em água destilada ozonizada associado à água ozonizada tópica	Intralesional + tópica	100 µL por ferida (200 µL/animal)

3.6 Método de Eutanásia

Os procedimentos foram realizados na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Ao término do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia mediante administração intraperitoneal de uma associação de cetamina (Syntec do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e xilazina (Syntec do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), utilizando-se uma superdose anestésica correspondente a dez vezes a dose anestésica recomendada para a espécie, promovendo anestesia profunda seguida de óbito. A confirmação da morte foi realizada por meio da ausência de movimentos respiratórios, ausência de batimentos cardíacos e ausência de reflexos. Todos os procedimentos foram conduzidos em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), respeitando os princípios éticos e de bem-estar animal adotados pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia.

Após a eutanásia, as carcaças foram acondicionadas e descartadas de acordo com os procedimentos operacionais da REBIR-UFU. Inicialmente, foram mantidas sob congelamento e, posteriormente, encaminhadas para incineração por empresa especializada contratada pela Universidade Federal de Uberlândia para a coleta, transporte e destinação final desse tipo de resíduo biológico.

3.7 Análise Macroscópica

As feridas foram acompanhadas macroscopicamente ao longo de todo o período experimental por meio de observação direta e registros fotográficos. Durante as avaliações, foram observadas características relacionadas ao processo de cicatrização, incluindo coloração da lesão, aspecto das bordas, presença de crostas, tecido de granulação, sinais de inflamação, sangramentos e secreções.

As observações macroscópicas foram utilizadas para acompanhar qualitativamente a evolução das lesões durante o período experimental, complementando as análises de área obtidas por meio dos registros fotográficos.

3.8 Análise Estatística

Os dados referentes à contração das feridas foram analisados no programa GraphPad Prism 9.0. Inicialmente, a normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Como todos os grupos apresentaram distribuição compatível com a normalidade ($p > 0,05$), as comparações entre os grupos experimentais foram

realizadas por análise de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguida do pós-teste de Dunnett, empregado para comparar individualmente cada grupo tratado com o grupo controle. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão, considerando cinco animais por grupo.

4. RESULTADOS

4.1 Análise Macroscópica

A evolução macroscópica das lesões foi acompanhada por documentação fotográfica seriada obtida nos dias 0, 4, 8, 12, 16 e 20 após o início dos tratamentos (Figura 2). No dia 0, todas as lesões apresentavam aspecto semelhante entre os grupos experimentais, caracterizado por áreas ulceradas bem delimitadas, exposição do leito da ferida e ausência de tecido cicatricial visível.

A partir do quarto dia experimental, observou-se formação de crostas superficiais em todos os grupos avaliados, associada à redução inicial da área das lesões. Nesse período, verificou-se também a presença de tecido de granulação e sinais de reorganização tecidual nas regiões periféricas das feridas.

Entre os dias 8 e 12, foi possível observar progressão do processo cicatricial em todos os grupos experimentais, evidenciada pela redução da área lesional e pela maior organização do tecido em reparação. Durante esse período, as crostas tornaram-se mais evidentes, especialmente nos grupos tratados com hidroxiapatita de cálcio e ácido poli-D-lático, refletindo a dinâmica do processo inflamatório e de remodelação tecidual.

Nos períodos finais do experimento, correspondentes aos dias 16 e 20, evidenciou-se continuidade da contração das feridas e redução da exposição do leito lesionado. O grupo tratado com ozonioterapia isoladamente, e o grupo tratado com PDLA isoladamente, apresentaram visualmente menor área residual da lesão e aspecto mais organizado do tecido cicatricial quando comparados ao grupo controle. Além disso, verificou-se diminuição progressiva das crostas e maior evidência de reepitelização nas bordas das feridas.

De maneira geral, todos os tratamentos promoveram evolução favorável do processo de cicatrização ao longo do período experimental. Porém, diferenças visuais foram observadas entre os grupos quanto à velocidade de fechamento das lesões, organização do tecido cicatricial e persistência de crostas, sugerindo influência dos tratamentos empregados sobre o reparo tecidual. A confirmação dessas observações foi posteriormente complementada pela análise quantitativa da contração da ferida.

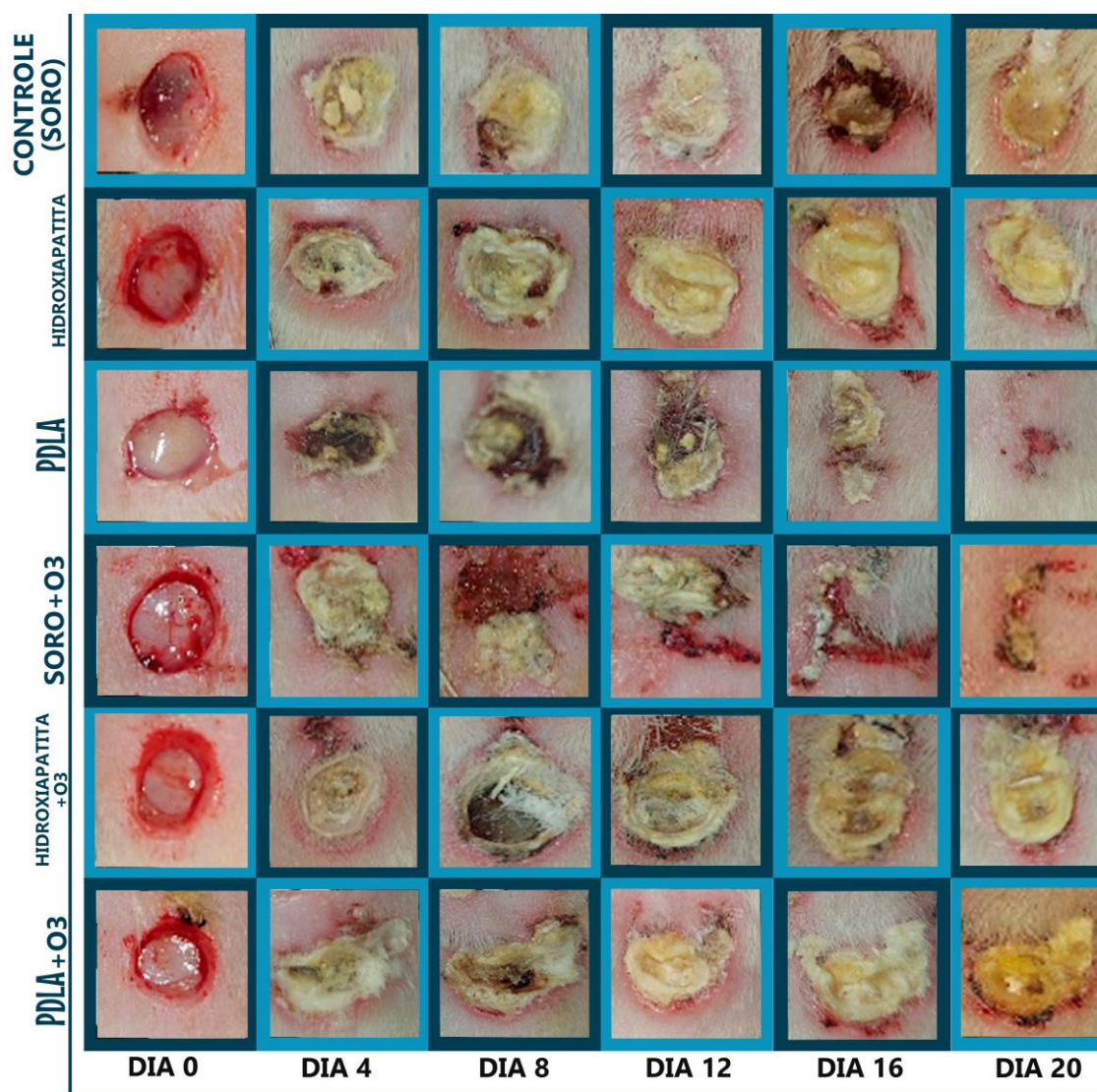


Figura 2: Evolução macroscópica representativa das feridas crônicas nos diferentes grupos experimentais durante o período de tratamento. Fonte: Próprio autor

Além da redução progressiva da área das lesões, constatou-se a formação de crostas superficiais em todos os grupos experimentais durante os primeiros dias de acompanhamento. Nos grupos tratados com bioestimuladores, as crostas apresentaram-se mais espessas e persistentes ao longo do período experimental, enquanto os grupos

submetidos à ozonioterapia demonstraram visualmente menor acúmulo de tecido crostoso nos períodos finais.

Também foi possível observar alterações no aspecto das bordas das lesões ao longo do experimento. Inicialmente irregulares e hiperêmicas, as bordas tornaram-se progressivamente mais definidas e aproximadas do centro da ferida, indicando evolução do processo de contração tecidual.

Não foram observados sinais macroscópicos sugestivos de infecção secundária, como presença de exsudato purulento ou necrose extensa, durante o período experimental. Embora duas lesões tenham sido produzidas em cada animal, apenas as feridas circulares de 6 mm foram utilizadas para análise macroscópica e quantitativa da contração devido à maior padronização morfológica.

4.2 Avaliação de contração de ferida

A evolução da contração das feridas foi determinada por meio da mensuração seriada da área lesional nos dias experimentais 12, 14, 16, 18 e 20. O percentual de contração foi calculado em relação à área inicial da lesão no início do tratamento, permitindo a comparação da dinâmica de cicatrização entre os grupos experimentais.

Conforme apresentado na Figura 3, foram observados diferentes padrões de evolução da contração. O grupo tratado com ácido poli-D-láctico (PDLA) apresentou aumento progressivo e acentuado da contração ao longo do período avaliado, alcançando os maiores valores no dia 20. O grupo submetido à ozonioterapia também apresentou aumento expressivo da contração, com progressão ao longo dos períodos analisados.

Os grupos tratados com hidroxiapatita de cálcio associada à ozonioterapia (H+O) e PDLA associado à ozonioterapia (PDLA+O) apresentaram comportamento intermediário. A hidroxiapatita de cálcio isolada demonstrou aumento mais tardio da contração, principalmente entre os dias experimentais 18 e 20. Em contraste, o grupo controle permaneceu com valores próximos ou inferiores a zero durante grande parte do acompanhamento, indicando ausência de contração expressiva e, em determinados períodos, aumento da área lesional em relação à medida inicial.

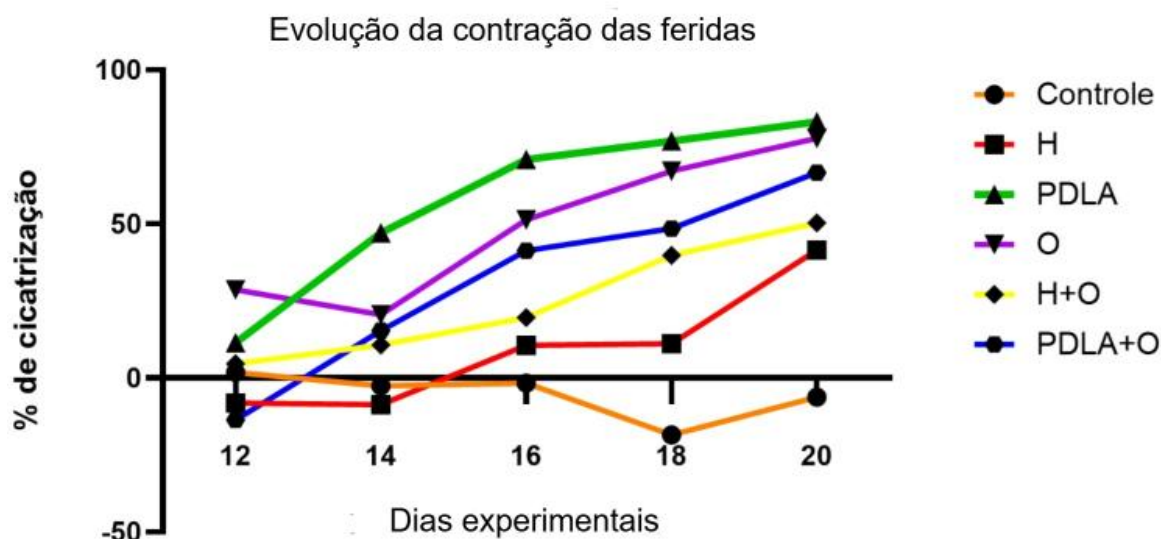


Figura 3 – Evolução temporal da contração das feridas nos diferentes grupos experimentais. O percentual de contração foi avaliado nos dias experimentais 12, 14, 16, 18 e 20. Controle: solução de cloreto de sódio a 0,9%; H: hidroxiapatita de cálcio; PDLA: ácido poli-D-láctico; O: ozonioterapia; H+O: hidroxiapatita de cálcio associada à ozonioterapia; PDLA+O: ácido poli-D-láctico associado à ozonioterapia. **Fonte:** Próprio autor (2026).

Para comparar quantitativamente os tratamentos, foi calculado o percentual médio de contração de cada animal durante o período avaliado. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, não sendo observados desvios significativos da distribuição normal em nenhum dos grupos experimentais ($p > 0,05$). Dessa forma, foi utilizada a análise de variância de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, para comparação de cada tratamento com o grupo controle.

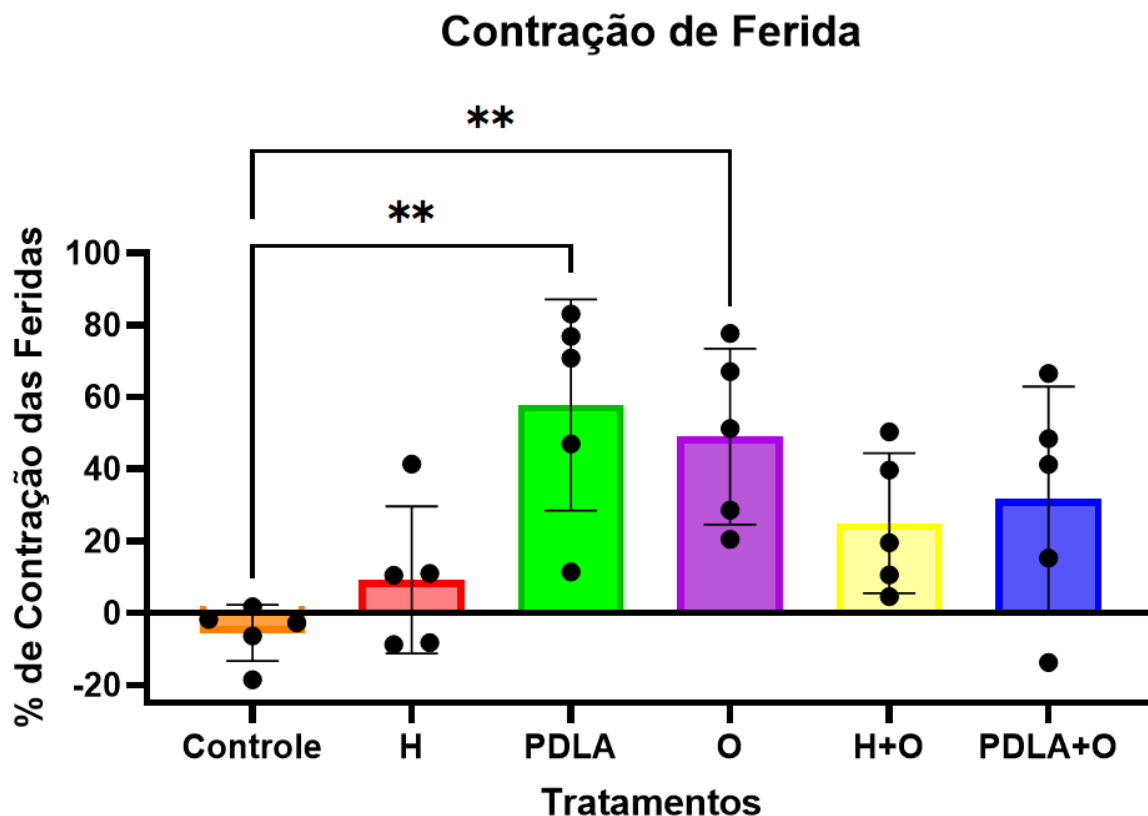


Figura 4 – Comparação do percentual de contração das feridas entre os grupos experimentais. Cada ponto representa o valor individual de um animal, enquanto as barras representam a média $\pm$ desvio-padrão, com cinco animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett para comparação de cada tratamento com o grupo controle. Controle: solução de cloreto de sódio a 0,9%; H: hidroxiapatita de cálcio; PDLA: ácido poli-D-láctico; O: ozonioterapia; H+O: hidroxiapatita de cálcio associada à ozonioterapia; PDLA+O: ácido poli-D-láctico associado à ozonioterapia. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle. **Fonte:** Próprio autor (2026).

O grupo controle apresentou percentual médio de contração de $-5,49\%$, enquanto o grupo tratado com hidroxiapatita de cálcio apresentou média de $9,20\%$. O grupo PDLA apresentou o maior percentual médio de contração entre os tratamentos avaliados, com valor de $57,83\%$, seguido pelo grupo submetido à ozonioterapia, que apresentou média de $49,03\%$. Os grupos H+O e PDLA+O apresentaram médias de contração de $24,98\%$ e $31,59\%$, respectivamente.

O pós-teste de Dunnett demonstrou que o grupo tratado com PDLA apresentou contração significativamente superior à do grupo controle ($p = 0,0012$). De maneira

semelhante, a ozonioterapia isolada promoveu aumento significativo da contração em comparação ao controle ($p = 0,0052$). Como ambos os valores foram inferiores a 0,01, essas comparações foram indicadas por dois asteriscos no gráfico.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com hidroxiapatita de cálcio isolada ($p = 0,7797$), hidroxiapatita de cálcio associada à ozonioterapia ($p = 0,1789$) ou PDLA associado à ozonioterapia ($p = 0,0750$). Embora o grupo PDLA+O tenha apresentado valor médio de contração superior ao controle, a diferença não atingiu o nível de significância estatística estabelecido.

Em conjunto, os resultados demonstraram que o PDLA e a ozonioterapia, quando administrados isoladamente, promoveram maior contração das feridas em comparação ao grupo controle. Apesar disso, as associações dos bioestimuladores com a ozonioterapia não produziram aumento estatisticamente significativo da contração no período analisado.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da hidroxiapatita de cálcio, do ácido poli-L-láctico e da ozonioterapia, administrados isoladamente ou em associação, sobre a contração de feridas crônicas induzidas em ratos Wistar. Os principais resultados demonstraram que os grupos tratados com PDLA e ozonioterapia isolada apresentaram percentuais de contração significativamente superiores aos observados no grupo controle. Em contrapartida, a hidroxiapatita de cálcio isolada e as associações CaHA+O₃ e PDLA+O₃ não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

A avaliação macroscópica demonstrou formação de crostas e redução progressiva da área lesional em todos os grupos. Ademais, os grupos PDLA e ozonioterapia apresentaram visualmente menor área residual nos períodos finais, em concordância com os resultados quantitativos. O grupo controle apresentou valores médios de contração próximos ou inferiores a zero, indicando que algumas lesões permaneceram estáveis ou apresentaram aumento de área em relação à medida de referência. Uma possível explicação para esse comportamento reside ou na manutenção do processo inflamatório, ao edema das bordas, à formação de crostas irregulares ou na própria variabilidade morfológica das feridas durante o acompanhamento.

O grupo tratado com PDLA apresentou o maior percentual médio de contração, com 57,83%, diferindo significativamente do controle. O PDLA é um material biodegradável particulado capaz de desencadear uma resposta tecidual localizada, inicialmente marcada pelo recrutamento de células inflamatórias e, posteriormente, pela ativação de fibroblastos e deposição de componentes da matriz extracelular. Em diferentes modelos animais, a aplicação de PDLA produziu resposta inflamatória e regeneração de colágeno, embora a intensidade desses efeitos tenha variado conforme a espécie e o período avaliado (HE et al., 2025).

Por outro lado, o período de avaliação deste estudo foi relativamente curto. Os tratamentos foram iniciados no décimo dia experimental, e a contração foi analisada até o vigésimo dia, correspondendo a apenas dez dias após a primeira aplicação. Assim, não é possível atribuir o efeito observado exclusivamente à neocolagênese madura, que geralmente se desenvolve de maneira gradual. A resposta inicial ao PDLA pode ter favorecido o recrutamento celular, a atividade fibroblástica e a contração mediada por miofibroblastos, mas a confirmação desses mecanismos exigiria análises histológicas e moleculares. Estudos experimentais com PDLA avaliaram alterações inflamatórias e deposição de colágeno em períodos de uma a doze semanas, indicando que a resposta ao material continua evoluindo após o intervalo analisado neste trabalho.

A ozonioterapia isolada também promoveu aumento significativo da contração das feridas, com média de 49,03%. Os achados observados neste estudo corroboram resultados previamente descritos na literatura cujos estudos experimentais demonstraram efeitos favoráveis de formulações ozonizadas sobre o reparo cutâneo. Huang et al. (2010) observaram melhora da cicatrização de feridas infectadas em ratos tratadas com água ozonizada, principalmente nas concentrações de 10 e 20 mg/L. Em outro modelo animal, a aplicação tópica de óleo ozonizado em úlceras infectadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina promoveu redução da carga bacteriana e melhor regeneração epidérmica em comparação ao tratamento não ozonizado (SILVA et al., 2021).

O efeito observado no grupo submetido à ozonioterapia pode estar associado à modulação do microambiente da ferida e à redução da carga microbiana superficial. Contudo, como não foram realizadas culturas microbiológicas, análises de estresse oxidativo ou quantificação de mediadores inflamatórios, esses mecanismos não podem ser confirmados diretamente. Dessa forma, os resultados demonstram efeito sobre a contração, mas não permitem determinar qual via biológica foi responsável pelo benefício observado.

A hidroxiapatita de cálcio isolada não apresentou diferença significativa em relação ao controle. A ausência de diferença estatística não deve ser interpretada como ausência de atividade biológica. Estudos histomorfológicos demonstraram que a CaHA pode estimular remodelação gradual da matriz extracelular, com aumento de colágeno tipo III após aproximadamente quatro meses e de colágeno tipo I em períodos mais avançados. Portanto, o intervalo de dez dias após a primeira aplicação pode ter sido insuficiente para que seus principais efeitos bioestimuladores se refletissem em uma alteração macroscópica significativa da área da ferida (YUTSKOVSKAYA; KOGAN; LESHUNOV, 2014).

Além do período reduzido, a resposta da CaHA pode ter sido influenciada pela diluição, pela concentração final efetivamente administrada, pela distribuição das partículas no leito da ferida e pelo estado inflamatório previamente induzido. A maior parte dos estudos sobre CaHA foi realizada em pele íntegra, especialmente em aplicações estéticas, enquanto o presente trabalho utilizou um tecido lesionado e submetido à aplicação repetida de peróxido de hidrogênio. Dessa forma, a resposta biológica no leito de uma ferida crônica pode diferir daquela observada em tecidos dérmicos íntegros.

As associações CaHA+O₃ e PDLA+O₃ não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Embora o grupo PDLA+O₃ tenha alcançado média numericamente superior à do controle, o valor de $p = 0,0750$ não atingiu o nível de significância adotado. Dessa forma, não se pode afirmar a existência de benefício ou de tendência estatística, apenas que houve diferença numérica entre as médias. Da mesma maneira, a ausência de significância não permite concluir que o ozônio tenha antagonizado os bioestimuladores.

A falta de efeito adicional das associações pode estar relacionada à variabilidade entre os animais, ao tamanho amostral de cinco indivíduos por grupo, ao curto período de observação ou a possíveis interações entre o meio ozonizado e os materiais. A documentação do Sculptra® informa que as interações do PDLA com outros medicamentos, substâncias ou dispositivos não foram sistematicamente avaliadas. Portanto, qualquer hipótese sobre interação química entre o ozônio e o polímero deve ser considerada especulativa até que sejam realizados estudos específicos de estabilidade, tamanho das partículas, pH e comportamento do material após contato com a solução ozonizada.

Outro aspecto importante é que a segunda aplicação intralesional dos bioestimuladores foi realizada no vigésimo dia experimental. Como esse também correspondeu ao último período utilizado na análise da contração, os resultados

quantitativos apresentados refletem essencialmente a resposta à primeira administração. A segunda aplicação provavelmente não teve tempo para produzir efeito mensurável sobre o desfecho analisado. Esse ponto deve ser considerado na interpretação dos resultados e na elaboração de estudos posteriores.

Entre as limitações deste estudo estão o número reduzido de animais por grupo, a utilização exclusiva de machos, a avaliação de uma única concentração de cada tratamento e o curto período de acompanhamento. Além disso, a contração macroscópica, embora seja um parâmetro objetivo do fechamento da ferida, não permite avaliar isoladamente a qualidade do tecido formado, a organização do colágeno, a reepitelização, a vascularização ou a intensidade da resposta inflamatória.

Também deve ser considerada a diferença entre a cicatrização cutânea de roedores e a humana. Em ratos, o fechamento de feridas ocorre de forma expressiva por contração, enquanto em humanos há maior contribuição da formação de tecido de granulação e da reepitelização. Estudos que reduzem mecanicamente a contração em ratos produzem cicatrização mais lenta e mais próxima daquela observada em feridas humanas de difícil reparo, evidenciando essa limitação translacional (SAMI; ABDELLATIF, 2021).

Apesar dessas limitações, os resultados indicam que o PDLA e a ozonioterapia isolada favoreceram a contração das feridas no modelo experimental utilizado. A ausência de benefício estatisticamente significativo nas associações demonstra que a combinação de tratamentos não resultou, nas condições avaliadas, em efeito adicional sobre esse desfecho. Estudos futuros devem incluir períodos mais prolongados, diferentes concentrações, maior número de animais e análises histológicas, imunohistoquímicas e moleculares, permitindo esclarecer os mecanismos envolvidos e avaliar a qualidade do tecido reparado.

6. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais deste estudo, o PDLA e a ozonioterapia, quando utilizados isoladamente, promoveram maior contração das feridas crônicas induzidas em ratos Wistar em comparação ao grupo controle. O PDLA apresentou o maior percentual médio de contração entre os tratamentos avaliados, seguido pela ozonioterapia, sendo ambos estatisticamente superiores ao controle.

A hidroxiapatita de cálcio, isolada ou associada à ozonioterapia, e a associação entre PDLA e ozonioterapia não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Dessa forma, nas condições e no período avaliados, as

associações terapêuticas não proporcionaram benefício adicional sobre a contração das feridas, não sendo possível demonstrar efeito sinérgico entre os bioestimuladores e a ozonioterapia.

Os resultados indicam potencial do PDLA e da ozonioterapia como estratégias capazes de favorecer a contração de feridas crônicas. Entretanto, como o estudo avaliou predominantemente um desfecho macroscópico e utilizou um período relativamente curto de acompanhamento, são necessários estudos adicionais com maior tempo experimental e análises histológicas, moleculares e imunohistoquímicas para esclarecer os mecanismos envolvidos e avaliar a qualidade do tecido reparado.

Como perspectiva para estudos futuros, outros métodos de indução da cronicidade poderão ser utilizados para avaliar se os efeitos observados se mantêm em diferentes condições fisiopatológicas. Entre as alternativas estão os modelos de diabetes experimental, associados ou não à inoculação bacteriana, que reproduzem alterações metabólicas, inflamatórias e infecciosas presentes em úlceras diabéticas; os modelos de isquemia, nos quais a redução da perfusão sanguínea compromete a oxigenação e retarda o reparo; e os modelos de infecção por biofilme, capazes de manter uma resposta inflamatória persistente e dificultar o fechamento da lesão. Estudos também podem combinar diabetes, isquemia e infecção, proporcionando um modelo mais complexo e próximo das condições encontradas em feridas crônicas humanas.

Adicionalmente, pode-se empregar um anel de silicone ao redor da ferida para limitar a contração da pele dos roedores. Embora essa técnica não constitua, isoladamente, um método de cronificação, ela reduz a participação da contração no fechamento da lesão e favorece a cicatrização por formação de tecido de granulação e reepitelização, aproximando o modelo experimental do processo observado em seres humanos. A utilização desses protocolos, isolados ou combinados, poderá ampliar a validade translacional dos resultados e permitir uma avaliação mais abrangente dos efeitos dos bioestimuladores e da ozonioterapia.

Embora os resultados sejam promissores, estudos futuros incorporando análises histológicas, imunohistoquímicas e moleculares serão importantes para elucidar os mecanismos biológicos envolvidos na resposta aos tratamentos avaliados e ampliar o potencial translacional dessas abordagens para o manejo de feridas crônicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, J. M. et al. The applied anatomy of human skin: a model for regeneration. *Wound Medicine*, v. 28, p. 100179, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>. Acesso em: 08 jul. 2026.

ARIFIN, W. N.; ZAHIRUDDIN, W. M. Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, v. 24, n. 5, p. 101–105, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.5.11>. Acesso em: 08 jul. 2026.

BLAIR, M. J.; JONES, J. D.; WOESSNER, A. E.; QUINN, K. P. Skin structure-function relationships and the wound healing response to intrinsic aging. *Advances in Wound Care*, v. 9, n. 3, p. 127–143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1021>. Acesso em: 08 jul. 2026.

BORALDI, F. et al. The role of fibroblasts in skin homeostasis and repair. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 12, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25126610>. Acesso em: 08 jul. 2026.

BOWERS, S.; FRANCO, E. Chronic wounds: evaluation and management. *American Family Physician*, Leawood, v. 101, n. 3, p. 159–166, 2020. Disponível em: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2020/0201/p159.html>. Acesso em: 08 jul. 2026.
BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 9 out. 2008.

BREITHAUPT, A.; FITZGERALD, R. Collagen stimulators: Poly-L-lactic acid and calcium hydroxylapatite. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 459–469, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2015.07.007>. Acesso em: 08 jul. 2026.

CAÑEDO-DORANTES, L.; CAÑEDO-AYALA, M. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International Journal of Inflammation*, v. 2019, p. 3706315, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/3706315>. Acesso em: 08 jul. 2026.

CARVALHO, L. N. et al. Recent advances in the 3D skin bioprinting for regenerative medicine: cells, biomaterials and methods. *Materials*, v. 17, n. 18, p. 4388, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma17184388>. Acesso em: 08 jul. 2026.

CISTERNA, B. et al. Low ozone concentrations differentially affect the structural and functional features of non-activated and activated fibroblasts in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 18, p. 10133, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms221810133>. Acesso em: 08 jul. 2026.

ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: a clinical review. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, v. 2, n. 1, p. 66–70, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22470237/>. Acesso em: 08 jul. 2026.

HE, T. et al. Effects of poly-L-lactic acid fillers on inflammatory response and collagen synthesis in different animal models. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 24, n. 2, e70000, 2025. DOI: 10.1111/jocd.70000.

HUANG, H. J. et al. Effect of ozone water on the inflammation and repair in infected wounds. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, v. 30, n. 3, p. 515–518, 2010.

MÄHLER, M. et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals*, v. 48, n. 3, p. 178–192, 2014. DOI: 10.1177/0023677213516312.

GUSHIKEN, L. F. S. et al. Cutaneous wound healing: an update from physiopathology to current therapies. *Life*, v. 11, n. 7, p. 665, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/life11070665>. Acesso em: 08 jul. 2026.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Healing chronic wounds. *BMJ*, v. 324, n. 7330, p. 160–163, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11799036/>. Acesso em: 08 jul. 2026.

LOSS, F. R. Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/79474>. Acesso em: 08 jul. 2026.

MATHEW-STEINER, S. S.; ROY, S.; SEN, C. K. Collagen in wound healing. *Bioengineering*, v. 8, n. 5, p. 63, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>. Acesso em: 08 jul. 2026.

SAMI, D. G.; ABDELLATIF, A. Histological and clinical evaluation of wound healing in pressure ulcers: a novel animal model. *Journal of Wound Care*, v. 30, supl. 6, p. S12–S21, 2021. DOI: 10.12968/jowc.2021.30.Sup6.S12.

SILVA FILHO, M. L. E.; PAGGIARO, A. O.; CARVALHO, V. F.; GEMPERLI, R. Ozone therapy as a treatment for diabetic foot ulcers: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Wound Care*, v. 33, n. 12, p. 958–967, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.12968/jowc.2022.0189>. Acesso em: 08 jul. 2026.

SILVA, V. et al. Topical application of ozonated oils for the treatment of MRSA skin infection in an animal model of infected ulcer. *Biology*, v. 10, n. 5, p. 372, 2021. DOI: 10.3390/biology10050372.

YUTSKOVSKAYA, Y.; KOGAN, E.; LESHUNOV, E. A randomized, split-face, histomorphologic study comparing a volumetric calcium hydroxylapatite and a hyaluronic acid-based dermal filler. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 13, n. 9, p. 1047–1052, 2014.

ZHAO, R.; LIANG, H.; CLARKE, E.; JACKSON, C.; XUE, M. Inflammation in chronic wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 12, p. 2085, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>. Acesso em: 08 jul. 2026.