

CAROLINA COUTO BARQUETE

COPAÍBA (*Copaifera langsdorfii* DESF.; CAESALPINIACEAE) EM
ASSOCIAÇÃO AO LASER TERAPÊUTICO NO TRATAMENTO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

RIO BRANCO
ACRE – BRASIL
MARÇO – 2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

B267c Barquete, Carolina
Couto, 1988 -

Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.; Caesalpiniaceae) em associação ao laser terapêutico no tratamento de feridas cutâneas em ratos Wistar / Carolina Couto Barquete. – Rio Branco, 2017.
50 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, 2017.

Incluem referências bibliográficas.

Orientador: Prof. Dr. Soraia Figueiredo de Souza.

1. Laserterapia. 2. Cicatrização de feridas. 3. Fitoterapia. I. Título.

CDD: 615.83

Bibliotecária: Alanna Santos Figueiredo CRB-11/1003

CAROLINA COUTO BARQUETE

COPAÍBA (*Copaifera langsdorfii* DESF.; CAESALPINIACEAE) EM
ASSOCIAÇÃO AO LASER TERAPÊUTICO NO TRATAMENTO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA: 30 de março de 2017.

Prof. Dr. Yuri Karaccas de Carvalho
UFAC

Prof. Dra. Sara Lucena de Amorim

Profa. Dra. Soraia Figueiredo de Souza
UFAC
(Orientadora)

À minha mãe, Marineide Mendes Couto.
Ao meu pai, Francisco Augusto Fontes Barquete.
E aos meus animais de estimação, Lola, Jay
e Maduh.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Acre (UFAC) e ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental (PPGESPA) pelas oportunidades oferecidas.

À Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina, em especial aos residentes e pós-graduandos do setor de patologia pelo apoio nas análises.

À Cooperativa Agroextrativista dos Produtores Rurais do Vale do Rio Iaco, pelo fornecimento do óleo-resina de Copaíba.

À Profa. Dra. Soraia Figueiredo de Souza por todas as oportunidades, conselhos, orientações concedidas e por sua compreensão nos momentos em que não pude dar o meu melhor.

À Profa. Dra. Aline de Marco Viott pelo auxílio inestimável na execução das análises.

Aos meus pais, que me incentivam diariamente a ser um ser humano melhor, estimulando minha aquisição de conhecimentos, e transmitindo seus valores morais.

Aos meus colegas de turma, que encheram de alegria grande parte dos momentos dessa jornada.

À equipe de alunos bolsistas de iniciação científica, de extensão e colaboradores orientados pela Profa. Dra. Soraia Figueiredo de Souza, por sua parceria e auxílio em todo o experimento.

*“Só sei que nada sei, e o fato de saber
isso, me coloca em vantagem sobre aqueles
que acham que sabem alguma coisa.”*

Sócrates (-470 – -399)

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFAC

Título do projeto: Copaíba em associação ao laser terapêutico no tratamento de feridas cutâneas em ratos wistar.

Processo número: 23107.016568/2015-44.

Protocolo número: 82/2015.

Responsável: Prof. Dr. Henrique Jorge de Freitas.

Data da aprovação: 18/11/2015.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RED	Coloração Picrosirius Red
HE	Coloração Hematoxilina-Eosina
IA	Inflamação Aguda
NC	Necrose
TG	Tecido de Granulação
FP	Fibroplasia
LTBP	Laserterapia de Baixa Potência

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema representativo das etapas do processo cicatricial..... 3
- Figura 2. Confeção de cinco feridas cutâneas com *punch* de biópsia de 8mm na região cérvico-tóraco-abdominal dorsal de ratos Wistar (A e B). Em C. Esquema representativo das feridas cirúrgicas e seus respectivos tratamentos. Azul: controle negativo (T1); verde: controle positivo (T2); amarelo: laserterapia de baixa potência (T3); vermelho: óleo-resina de Copaíba (T4); roxo: associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5)..... 15
- Figura 3. Mensuração da área de feridas cutâneas realizadas com *punch* de 8mm em ratos da linhagem Wistar, com auxílio de paquímetro, nos eixos horizontal (A) e vertical (B)..... 17
- Figura 4. Aspectos macroscópicos das feridas cutâneas produzidas com *punch* de biópsia de 8mm, em rato da linhagem Wistar, tratadas com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), nos dias 1 (A), 5 (B), 10 (C) e 14 (D) de pós-operatório (setas indicam o local das feridas no último dia de tratamento) 19
- Figura 5. Comparação da expressão de colágeno tipo I (vermelho-vivo) e III (verde) entre feridas cutâneas induzidas cirurgicamente com auxílio de *punch* de 8mm em ratos Wistar e tratadas com solução fisiológica 0,9% (A) e associação de LTBP com óleo-resina de Copaíba (B), no dia 14 de pós-operatório 26

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Área das feridas cutâneas (mm) induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), nos dias um, sete e 14 de pós-operatório.20
- Tabela 2 – Análise histopatológica do infiltrado inflamatório das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de animais pertencentes ao grupo 1, ou seja, coletadas no dia um do tratamento. 21
- Tabela 3 – Análise histopatológica do infiltrado inflamatório das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de animais pertencentes ao grupo 2, ou seja, coletadas no sétimo dia de tratamento.23
- Tabela 4 – Análise histopatológica do infiltrado inflamatório das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de animais pertencentes ao grupo 3, ou seja, coletadas no dia 14 do tratamento.24
- Tabela 5 – Quantificação dos colágenos tipo I (I) e tipo III (III) das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de animais pertencentes ao grupo 1, ou seja, coletadas no dia um do tratamento.25

Tabela 6 – Quantificação dos colágenos tipo I (I) e tipo III (III) das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de animais pertencentes ao grupo 2, ou seja, coletadas no sétimo dia de tratamento.
.....26

Tabela 7 – Quantificação dos colágenos tipo I (I) e tipo III (III) das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de animais pertencentes ao grupo 3, ou seja, coletadas no último dia de tratamento.
.....27

RESUMO

BARQUETE, Carolina Couto. Universidade Federal do Acre, março de 2017. **Copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.: Caesalpiniaceae) em associação ao laser terapêutico no tratamento de feridas cutâneas em ratos Wistar.** Orientadora: Soraia Figueiredo de Souza. Protocolos alternativos para o tratamento de feridas cutâneas vêm sendo desenvolvidos, com o uso de técnicas como a laserterapia de baixa potência e a fitoterapia, que objetivam otimizar esse processo. Nesse estudo avaliou-se a eficácia da associação entre óleo-resina de Copaíba (*Copaifera langsdorfii*) e laserterapia de baixa potência, na cicatrização de feridas cutâneas, em comparação ao uso desses métodos separadamente. Foram utilizados 15 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), nos quais confeccionaram-se cinco feridas de 8mm, através de *punch* de biopsia, sendo tratadas individualmente com os seguintes protocolos: grupo controle negativo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); grupo controle positivo, com vaselina sólida (T2); grupo da laserterapia com AsGa (904nm), modo contínuo, focal, durante dez segundos, na dose de 4J/cm² (T3); grupo do óleo-resina de Copaíba, no qual aplicou-se uma gota do fitoterápico nas feridas (T4); e grupo de associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5). A análise da eficácia de cada técnica se deu através da avaliação da taxa de cicatrização, análise histopatológica do infiltrado inflamatório das feridas, com coloração de Hematoxilina-Eosina, e expressão do colágeno, com o uso da coloração Picrosirius Red. Sendo os dados submetidos teste Kruskal-Wallis, dado que os resultados não se apresentaram paramétricos (P>0,05). A copaíba gerou vantagem na expressão de colágeno tipo III no tecido, dado que ambos os tratamentos com esse fitoterápico apresentaram os melhores resultados nesse parâmetro, enquanto a laserterapia demonstrou melhor capacidade de renovação tecidual, pois ambos os tratamentos com o uso da mesma tiveram os melhores resultados para fibroplasia no sétimo dia da cicatrização. Apesar de poucas vantagens da associação dessas duas técnicas, conclui-se que esse protocolo melhora o aspecto macroscópico das feridas, com menor formação de crostas.

Palavras-chaves: Laserterapia, Fitoterápicos, Cicatrização de Feridas, Colágeno, Picrosirius Red.

ABSTRACT

BARQUETE, Carolina Couto. Universidade Federal do Acre, March 2017. **Copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.: Caesalpiniaceae) associated with laser therapy for skin wound treatment in Wistar rats.** Advisor: Soraia Figueiredo de Souza. Alternative protocols for the treatment of skin wounds have been developed, with the use of techniques such as low-level laser therapy and phytotherapy, aiming to optimize this process. This study evaluated the effectiveness of the association between Copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oil-resin and low-power laser therapy, in the healing of cutaneous wounds, in comparison of these methods separately. Fifteen Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used, in which five 8-mm wounds were made through a biopsy punch. They were treated individually with the following protocols: negative control group (T1); positive control group (T2); laser therapy with AsGa (904nm), continuous, focal mode, for ten seconds, dosage of 4J/cm² (T3); Copaiba oil-resin (T4); And group of associations between Copaiba and low-level laser (T5). The efficacy of each technique was evaluated with: wound healing rate, histopathological analysis of the inflammatory infiltrate of the wounds, with Hematoxylin-Eosin staining, and collagen expression, using Picrosirius Red staining. Statistical test used to analyze the data was Kruskal-Wallis ($P > 0.05$). Copaiba generated an advantage in the expression of type III collagen, because both treatments showed the best results in this parameter, whereas the laser therapy demonstrated a better ability of tissue renewal, since both treatments with this technique had the best results for fibroplasia in the middle of healing process. Although there are few advantages from the association of the two techniques, it is concluded that this protocol improves the macroscopic aspect of the wounds, with less crust formation.

Keywords: Laser Therapy, Phytotherapy, Wound Healing, Collagen, Picrosirius Red.

SUMÁRIO

págs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE FIGURA	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Cicatrização de feridas.....	3
2.2 Principais ações farmacológicas no tratamento de feridas	5
2.3 Laserterapia	6
2.4 Laserterapia na cicatrização de feridas	8
2.5 Fitoterápicos no tratamento de feridas.....	10
2.6 Plantas medicinais da Amazônia	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5 CONCLUSÕES	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo bioquímico dinâmico, que envolve a coordenação precisa de diversas vias: fisiológica; imunológica; celular (MASSON-MEYERS et al., 2013). Ocorre nesse período, a inter-relação entre as células, seu microambiente e a matriz extracelular, sendo a partir disso determinado o direcionamento para a diferenciação, proliferação das células ou a permanência dessas em estado quiescente. O processo cicatricial divide-se em três fases distintas, inflamatória, proliferativa e de remodelação (MAVER et al., 2015).

Os eventos são iniciados logo após a injúria e podem se estender por meses, durante os quais o tecido busca, através da produção de colágeno e matriz proteica, retornar ao seu aspecto inicial. Logo, o objetivo do tratamento das feridas é a redução do tempo envolvido no processo, além de buscar evitar consequências como as cicatrizes (ADIELE et al., 2014).

Apesar de muitos avanços na área o tratamento de feridas crônicas ainda possui restrições, pois apesar de opções terapêuticas como limpeza, debridamento, fármacos antibióticos e agente cicatrizantes, a eficácia restrita e o custo proibitivo presente nessas técnicas (MASSON-MEYERS et al., 2013), são fatores que devem ser levados em consideração quando se analisa tratamentos veterinários.

Além dos métodos tradicionalmente utilizados na cicatrização de feridas, novas alternativas vem sendo desenvolvidas visando melhorar os resultados obtidos nesses protocolos, como a laserterapia de baixa potência (PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015) que possui o objetivo de fotoativar os mecanismo celulares, através de sua ação sobre os citocromos presentes nas mitocôndrias (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014), estimulando o retorno de regiões alteradas à normalidade, sendo resultados desse processo a analgesia, redução do edema e diminuição do processo de reparo (SILVA et al., 2010).

Existe uma grande variedade de *lasers* empregados no processo de cicatrização tecidual, como: Hélio-Cádmio, Hélio-Neônio, Argon, Krypton, Arsenieto de Gálio e Alumínio e CO₂ (ANDRADE; CLARK; FERREIRA, 2014). Os diversos modelos ainda podem variar de acordo com potência (W), comprimento de onda (nm), frequência (Hz), intensidade (W/cm²) e dose (J/cm²) (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014). Portanto, a combinação desses fatores tem o potencial de gerar protocolos que se moldam de acordo com o objetivo do tratamento.

Outra forma de terapêutica alternativa no tratamento de feridas é o emprego de fitoterápicos, que apresentam grande significância pelo fato serem usados por cerca de quatro bilhões de pessoas, em seus cuidados básicos de saúde, como forma de tratamento mais acessível a essa parcela da população mundial (PAZYAR et al., 2014).

De acordo com Ghosh e Gaba (2013), os principais efeitos realizados por fitoterápicos na cicatrização de feridas são ação antimicrobiana, antioxidante, e promoção da mitose, angiogênese, aumento da produção colágena e maior síntese de DNA, qualidades desejáveis em qualquer substância cicatrizante.

Dado que a Amazônia ocupa 40% do território nacional e cerca de 20% de sua área ainda se encontra preservada, estima-se haver nessa biodiversidade, apenas para plantas de valor econômico e social, cerca de 800 espécies, sendo centenas dessas utilizadas como plantas medicinais (SANTOS et al., 2014).

Dentre as plantas medicinais amazônicas, a Copaíba (*Copaifera* spp.) ganha destaque como fitoterápico cicatrizante. Sua constituição com presença predominante de sesquiterpenos e diterpenos garante essa ação, devido as propriedades adstringentes, antimicrobianas e principalmente anti-inflamatórias desses componentes (LEANDRO et al., 2012).

Portanto, busca-se estudar os efeitos da copaíba e da laserterapia em feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em ratos da linhagem Wistar, bem como se a associação dessas duas técnicas emergentes possui vantagens, em relação ao uso isolado das mesmas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cicatrização de feridas

A pele é uma barreira natural contra o meio externo e exerce diversas funções protetoras no organismo. Quando essa proteção é quebrada por lesões agudas ou crônicas, um processo de diversas etapas, dinâmico inicia-se levando à cicatrização parcial do tecido e retorno da função protetora da pele (AKBIK et al., 2014). O objetivo desse processo é obter homeostase e integridade do tecido, o que se torna possível através de quatro etapas simultâneas: hemostasia; inflamação; fase proliferativa; fase de remodelamento (Figura 1) (MAVER et al., 2015).

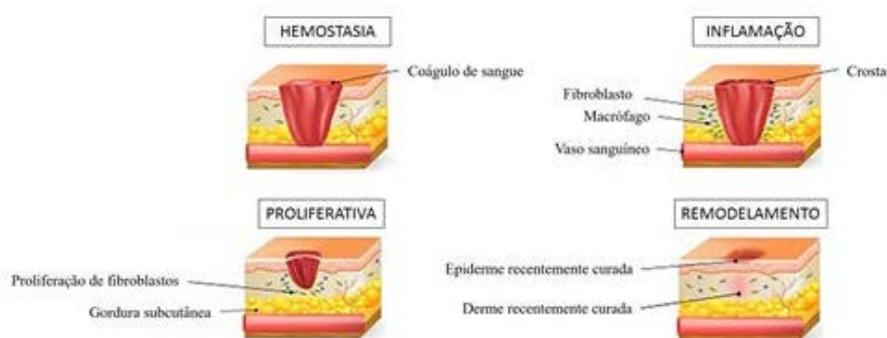


Figura 1. Esquema representativo das etapas do processo cicatricial.

A hemostasia ocorre logo após a lesão e constitui-se de agregação de plaquetas e formação do coágulo sanguíneo, que servirá de matriz extracelular provisória para a migração de células (AKBIK et al., 2014). Inicialmente, os vasos sanguíneos contraem em resposta a lesão, porém eventualmente retornam ao estado inicial. As plaquetas bloqueiam o sangramento em seguida, como também liberam substâncias

vasoconstritoras que favorecem o processo. Além disso, ativa-se a cascata de coagulação, que por fim irá estimular a formação de trombina, processo que auxilia na transformação do fibrinogênio em fibrina. A rede de fibrina é responsável por enrijecer o tampão plaquetário e tornar o coágulo estável (HOSGOOD, 2007). Esse recrutamento de plaquetas é dito como consequência da liberação de prostaglandinas pela lesão. Após essa agregação e adesão as mesmas liberam fatores quimiotáticos, que possuem funções distintas no processo cicatricial. Os mastócitos presentes nos vasos sanguíneos da região lesada liberam histamina, fator de necrose tumoral, leucotrienos e citocinas (GHOSH; GABA, 2013), que funcionam como sinalizadores para a migração de leucócitos, dando início à fase de inflamação.

A segunda fase é a fase inflamatória, que se inicia imediatamente após a lesão, geralmente dura entre 24 e 48 horas e pode persistir por até duas semanas, em alguns casos. Nesta fase ocorrem eritema, edema e calor associados com a dor. Bactérias e detritos são fagocitados por macrófagos, que liberam fator derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos beta (β -FGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) para auxílio na fase seguinte, a proliferativa. Os linfócitos são as últimas células envolvidas nesse processo, e são essenciais na produção de IL-2, que realiza o recrutamento de fibroblastos (PAZYAR et al., 2014). Os fagócitos realizam a limpeza de partículas estranhas ao corpo, bem como liberam citocinas responsáveis pela migração e proliferação de fibroblastos, envolvidos no processo final da cicatrização.

A fase proliferativa tem duração média de dois dias até três semanas, caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) com função de nutrir o novo tecido, a síntese de matriz extracelular com deposição de colágeno, formação de tecido de granulação, e contração da ferida. Estipula-se que esta tem início logo após a limpeza dos debris (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BENSCHAT, 2015). Os fibroblastos, principais responsáveis por essas ações, migram para o local da ferida e secretam a matriz inicial de colágeno, onde a regeneração dérmica irá ocorrer. Inicialmente o colágeno secretado é do tipo III, que posteriormente será degradado e substituído pelo colágeno tipo I, uma forma mais rígida da substância, na fase de maturação, na qual o colágeno é entrelaçado e organizado, promovendo máxima rigidez ao tecido. Na fase final da epitelização, os ceratinócitos se diferenciam formando uma camada externa protetora (PAZYAR et al., 2014).

O final desse processo cicatricial ocorre na fase de remodelamento, esta possui duração de três semanas a dois anos, envolvendo a reestruturação do colágeno e a formação do tecido cicatricial (EPSTEIN et al., 1999). A resistência à tração do tecido é aumentada devido ao entrelaçamento intermolecular do colágeno através da hidroxilação dependente de vitamina C. A cicatriz diminui e o tecido recupera cerca de 80% de sua tensão original (MITTAL; SATISH; ANIMA, 2013).

Diversos fatores influenciam esse processo de cicatrização, como, por exemplo, a dieta, dado que a recuperação da lesão é um processo anabólico e necessita de energia e substratos provenientes de nutrientes, como a albumina. A infecção do local lesionado também atrapalha o processo cicatricial (HOSGOOD, 2007), sendo os microorganismos mais comumente encontrados nesses casos aqueles pertencentes à microbiota cutânea como: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pyogenes*; *Corynebacterium sp.*; *Escherichia coli*; e *Pseudomonas aeruginosa*. O que demonstra o papel crucial de antimicrobianos no tratamento de feridas (MITTAL; SATISH; ANIMA, 2013).

Outros fatores que também podem influenciar negativamente na reconstrução da barreira cutânea são: má perfusão tecidual, impedindo a chegada de substâncias essenciais para a resolução do quadro; drogas, como anti-inflamatórios esteroidais, que reduzem a síntese de colágeno e proliferação fibroblástica; e quimioterápicos, conhecidamente inibidores de mitose. Fatores relacionados ao indivíduo também possuem influência como idade avançada e doenças sistêmicas, citando-se como principal exemplo a Diabetes (MAVER et al., 2015).

2.2 Principais ações farmacológicas no tratamento de feridas

Os principais efeitos farmacológicos almejados no uso de fármacos ou outras substâncias cicatrizantes são o efeito anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano e analgésico (VIEIRA et al., 2008; MAVER et al., 2015). Apesar da inflamação aguda ser essencial para o desencadeamento de ações a favor da reconstituição do tecido, seu prolongamento pode retardar o processo cicatricial e a dor na região lesada, portanto o uso de substância se justifica para a tentativa do controle de tais alterações (HOSGOOD, 2007).

Substâncias fundamentais para resolução da ferida como lipídios, proteínas, colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos, podem ser destruídas pela ação de

radicais livres, portanto o uso de antioxidantes é significativo no protocolo terapêutico do tratamento dessas lesões, como o objetivo de preservar a viabilidade dos tecidos e favorecer sua cura (YEOH, 2000).

Além de promover ferramentas intrínsecas do organismo para a reconstrução tecidual, faz-se necessário, no tratamento de feridas, controlar outros fatores que interfiram nesse processo. Portanto, a redução da carga bacteriana do ferimento pode ser necessária para facilitar a cicatrização de feridas, bem como para reduzir a inflamação local e a destruição do tecido. Um agente ideal para a prevenção e controle de infecção da ferida deve destruir os patógenos diretamente e, ao mesmo tempo, estimular a atividade imune (MITTAL; SATISH; ANIMA, 2013).

No entanto, quando se busca instituir um protocolo terapêutico que leve em consideração o bem-estar animal, evitando diversas consequências da dor, como automutilações e perda de produtividade, o uso de analgésicos também se torna indispensável para o tratamento eficaz de feridas.

2.3 Laserterapia

O termo *laser* significa amplificação da luz por meio da estimulação da emissão da radiação, e trata-se de um acrônimo de *light amplification by the stimulated emission of radiation* (SILVA et al., 2010). Seu uso terapêutico baseia-se no conceito da fototerapia no qual a luz em suas diferentes formas possui efeitos terapêuticos (PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015).

Esses instrumentos são fontes de luz artificial, emitida por um processo que começa com a ativação de elétrons na unidade do *laser*, que quando retornam do estado excitado, emitem fótons. Os aparelhos de *laser* terapêutico podem ser produzidos por diferentes materiais, como: Hélio-Neônio (HeNe); Arsenieto de Gálio (GaAs); ou Arsenieto de gálio e alumínio (GaAlAs) (MILLIS; SAUNDERS, 2013). Esses se diferenciam da luz gerada naturalmente por serem: monocromáticos; coerentes; e colimados. A monocromaticidade refere-se ao comprimento de onda único que gera uma cor pura. Como os fótons ocorrem ao mesmo tempo e correm na mesma direção caracteriza-se essa radiação como coerente. Já a colimação é obtida pela ausência de divergência dos raios, o que permite a propagação de longa distância ao raio luminoso (LOW; REED, 2001).

Essa radiação interage com os tecidos de diversas formas, sendo refletida, divergida, sofrer refração ou ser absorvida. Quando ocorre a absorção dos fótons, esses afetam os tecidos através dos cromóforos, moléculas que absorvem certos comprimentos de onda ou luz, sendo os mais comuns: água; hemoglobina; melanina; e o citocromo C (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014). Essas moléculas reagem de modo distinto aos diferentes comprimentos de onda, o que torna essa medida um importante parâmetro terapêutico. Estipula-se que a janela óptica ideal para maior absorção tecidual e divergência mínima, encontra-se entre 600-1200nm (MILLIS; SAUNDERS, 2013).

Outra característica de importância é a potência do *laser*, representada por Watt que significa 1 joule por segundo. A partir dessa, calcula-se a intensidade do *laser*, ou seja, o quanto de potência está sendo aplicada em uma área (Watt/cm^2) e a energia emitida pelo aparelho, frequentemente usada como dosagem do *laser* (1 joule = 1 Watt por 1 segundo), que representa a potência transmitida ao longo do tempo, o que permite algumas inferências como: *lasers* de maior potência demoram menos tempo para transmitir certa quantidade de energia e vice-versa (LOW; REED, 2001). Porém, a medida mais comumente utilizada para expressar dose na laserterapia é a densidade de energia, que demonstra o quanto de energia aplica-se em uma superfície, expressa por joules por centímetro quadrado (J/cm^2), quanto maior a dose administrada maior será a profundidade penetrada pelo *laser* (PEPLOW et al., 2010).

Assim como na relação entre potência e tempo, as doses totais estipuladas podem ser administradas em tempo menor com *lasers* de maior potência, ainda sobre suas diferenças, *lasers* mais potentes geralmente são aplicados através de movimentos circulares, enquanto os menos potentes geralmente são mantidos em um mesmo lugar durante a administração completa da dose de um determinado ponto tecidual (MILLIS; SAUNDERS, 2013). Essas aplicações diferenciam-se em focal e varredura. No primeiro modo, a energia concentrada no mesmo ponto, durante toda a aplicação, permite uma absorção mais profunda, enquanto que a aplicação por varredura tem a energia distribuída em uma maior área, porém com menor profundidade, sendo ideal para aplicação em lesões extensas (PEPLOW et al., 2010).

Outra característica que deve ser mencionada é a possibilidade de administração contínua ou em pulsos, na primeira observa-se sempre a mesma quantidade de energia sendo transmitida durante toda a aplicação, já na segunda forma a radiação será aplicada em intervalos de tempo, gerando uma frequência medida em Herzt (Hz), e o

total do tempo de exposição do tecido à radiação é expresso através da fórmula: $DC = F \times PD$. Nessa equação DC significa o ciclo de funcionamento do aparelho, F sua frequência de emissão dos pulsos de radiação e PD a duração do pulso. No entanto, mais pesquisas são necessárias para definir as vantagens de uma técnica sobre a outra (MILLIS; SAUNDERS, 2013).

Existem diversos tipos de *lasers*, de diferentes comprimentos de onda, expressos através de nanômetro (nm), como o *laser* rubi, um dos mais comumente utilizados, que possui como material um pequeno rubi sintético feito de óxido de alumínio, cujo comprimento de onda é de 694,3nm, emitindo luz vermelha (LOW; REED, 2001). No entanto, dentre os *lasers* que se destinam a função terapêutica destacam-se, os de hélio-neônio (HeNe), cujo o material são esses gases naturais a baixa pressão, que emitem radiação com comprimento de onda de 632,8nm, e os de diodo, constituídos de diversos materiais, em forma de uma liga metálica, como Arsenieto de gálio (AsGa), de comprimento de onda de 904nm, Arsenieto de alumínio e gálio (AsAlGa), com comprimento de onda entre 650 e 805nm, dentre outros (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014), que de acordo com as proporções desses elementos emitem diferentes comprimentos de ondas (SILVA et al., 2010)

2.4 Laserterapia na cicatrização de feridas

Existem diversos tipos de *lasers* com finalidade curativa, aqueles conhecidos como instrumentos de *laser* de baixa potência tiveram seus primeiros usos há mais de 30 anos. Dentre aqueles destinados a ações terapêuticas os *lasers* de baixa potência, ou *laser* frio, são os utilizados em reabilitação, e os de finalidade cirúrgica são os de alta potência e capacidade de destruição térmica das células (PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015). De acordo com Millis e Saunders (2013) uma nova forma de *laser* de potência intermediária foi recentemente introduzida nos protocolos de reabilitação, e todas essas formas tem aumentado sua popularidade na prática médico-veterinária nos últimos anos.

Esses instrumentos auxiliam na reabilitação através do mecanismo de fotobioestimulação, definido como a interação não-térmica de radiação monocromática com um alvo (GONÇALVES et al., 2013). Apesar de ainda não completamente elucidada essa ação ocorre pela absorção dos fótons nos tecidos-alvo através dos cromóforos e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, a partir disso,

uma cascata de eventos celulares tem início, resultando em maior produção de oxigênio e ATP, dentre outros (PERCIVAL; FRANCOLINI; DONELLI, 2015). Essa função foi observada nos estudos de Silveira, Streck e Pinho (2007) que através da exposição de feridas cutâneas ao laser AsGa (904nm), na dose de 3J/cm², em cinco pontos diferentes da lesão, durante dez dias, obtiveram como resultado o aumento da atividade mitocondrial, e a redução mais rápida do tamanho das úlceras, quando comparadas ao grupo controle.

Além da função energética, o aumento de ATP funciona como sinalizador molecular, alterando as interações intracelulares, também atua como neurotransmissor e em alguns casos possui o efeito de produção óssea e proliferação celular (MILLIS; SAUNDERS, 2013). Os efeitos benéficos da radiação a *laser* sobre o tecido ósseo foram analisados na pesquisa de Oliveira et al. (2010) que através da aplicação de laser de AsGa (904nm), com dose de 50mJ/cm², por dois segundos, de maneira pontual sobre as fraturas ósseas de ratos Wistar, e em quatro pontos distintos das margens das lesões, observaram ganho na neoformação óssea e melhor estruturação desse tecido, em sete e 21 dias após a fratura, quando comparados aos animais que não receberam tratamento.

Devido esses resultados, o uso de *lasers* terapêuticos tem o potencial de acelerar a reparação tecidual e o crescimento celular, e ainda possuem efeito anti-inflamatório similar às drogas utilizadas com essa função, observado em alguns estudos *in vitro* através da redução de prostaglandina E2 e ciclooxigenase-2 (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014).

Essas características fazem do uso da laserterapia de baixa potência (LTBP) uma ferramenta importante no tratamento de feridas. Relata-se que a radiação *laser* estimula o desenvolvimento de fibroblastos, aumenta a produção de colágeno e promove a angiogênese, ou seja, permite maior taxa de cicatrização (PEPLOW et al., 2010). Além disso, a laserterapia pode promover a vasodilatação e melhorar a drenagem linfática, diminuindo o edema e o inchaço da região lesionada (GONÇALVES et al., 2013). Essas características foram observadas por Demir et al. (2004) quando trataram feridas cutâneas de ratos suíços albinos, com *laser* de AsGa (904nm), na dose de 1J/cm², durante dez minutos, por dez dias, resultando em maior expressão e melhor organização de colágeno, aumento de fibroblastos no tecido, e ganho na tensão da ferida, quando comparadas as feridas dos grupos controle.

Esses achados coincidem com os encontrados por Reddy (2003), que ao tratar feridas cutâneas de ratos diabéticos com *laser* de AsGa (904nm), com dosagem de 1J/cm², de maneira pontual, observou aumento de colágeno e tensão do tecido, em relação ao grupo controle. No entanto, foi percebido um desempenho inferior desse tipo de LTBP para a cicatrização de feridas cutâneas, quando comparada a de HeNe, dado que os resultados obtidos em um estudo similar realizado pelo mesmo autor, revelaram maior ganho nesses parâmetros. Essa desvantagem em relação ao HeNe, não foi percebida por Sanati et al. (2011), que contrariamente ao autor anterior, obtiveram melhores resultados no fechamento das feridas, e no retorno do potencial elétrico da pele com o uso de *laser* de AsGa (904nm), na dose de 2J/cm², por 97s, de forma pulsada, do que naquelas feridas tratadas com HeNe (632,8nm), na mesma dose, por 63s, de forma contínua.

2.5 Princípios ativos da copaíba no tratamento de feridas

Os principais efeitos dos princípios ativos dos extratos vegetais na cicatrização de feridas são: constituintes fitoquímicos que possuem atividade antimicrobiótica; atividade antioxidante removedora de radicais livres; componentes ativos que promovem atividade mitótica, que contribuem para a proliferação celular, angiogênese e aumento da produção de colágeno e síntese de DNA (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BEN-SHABAT, 2015).

A natureza química desses fitoterápicos varia conforme a espécie. Os estudos realizados nesse campo buscam pesquisar carboidratos, glicosídeos, terpenóides, diterpenos, sesquiterpenos, fitosterol, compostos fenólicos, e vários tipos de taninos, proteínas, flavonoides, saponinas, ligninas, alcaloides e óleos essenciais (GHOSH; GABA, 2013). Tomando-se como exemplo a Copaíba, observa-se em sua composição a presença de sesquiterpenos (80% do total) e diterpenos. Já a Andiroba (*Carapa guianensis*), possui os ácidos graxos como componentes, dentre eles: oleico; palmítico; esteárico; linoleico, além de flavonoides, triterpenos, esteroides, cumarinos e diglicerídeos (SANTOS et al., 2012).

Cada um desses componentes presentes em plantas medicinais possui ações distintas. A função antimicrobiana é mais estudada em terpenos e terpenóides, que, além disso, também são considerados adstringentes, promovendo a contração da ferida e aumento da taxa de epitelização (MASSON-MEYERS et al., 2013). As propriedades

antioxidantes são comumente citadas como a ação proporcionada pelos flavonoides, que inicialmente regulam a produção de ânions superóxidos e posteriormente aumentam o fluxo sanguíneo da região lesada, promovendo a angiogênese, fatos que combinados reduzem os radicais livres na ferida (MITTAL; SATISH; ANIMA, 2013).

Os flavonóides também promovem o processo de cicatrização, principalmente devido às suas propriedades adstringentes e antimicrobianas, que parecem ser responsáveis pela contração da ferida e aumento da taxa de epitelização. As saponinas são eficazes como antioxidantes e antimicrobianos, auxiliando na contração da ferida e na elevada taxa de epitelização. Esteróis e polifenóis são responsáveis pela cicatrização de feridas devido à sua eliminação de radicais livres e atividade antioxidante, que são responsáveis por reduzir a oxidação lipídica, reduzindo a necrose celular e melhorando a vascularização (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BEN-SHABAT, 2015).

No entanto, os princípios ativos envolvidos na ação mitogênica dos fitoterápicos ainda não foram elucidados. Os taninos são conhecidos por promover a cicatrização de feridas, devido às suas propriedades adstringentes, essa função refere-se à capacidade desses metabólitos secundários dos vegetais em precipitar as proteínas da saliva, o que ocorre também com proteínas sanguíneas, bacterianas, parasitárias e enzimas. Possuem ação antimicrobiana, além de atuarem como sequestradores de radicais livres, através da formação de complexos com íons metálicos como o ferro, manganês, cobre, alumínio, que auxiliam nessa função antioxidante (KOBAYASHI et al., 2015).

2.6 Copaíba como agente cicatrizante

De acordo com a Lista de Espécies da Flora Brasileira a Floresta Amazônica possui 40.989 espécies de plantas e fungos, sendo 18.932 desses endêmicos (FORZZA et al., 2010). Uma grande parcela dessa biodiversidade pode ser utilizada como fitoterápicos, e já possui uso medicinal tradicional, logo, essas vêm sendo estudadas como alternativas terapêuticas de baixo custo.

No estudo realizado por Santos et al. (2014) constatou-se, através de entrevistas com a população tradicional da Amazônia Ocidental, que 53 espécies de plantas são utilizadas como medicinais, tais como *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Piperaceae* e *Amaranthaceae*. No entanto, de todos os vegetais citados, apenas sete

pertenciam à Amazônia, sendo esse fato explicado pela imigração de populações de outras regiões do país.

Seus principais usos são o tratamento de nefropatias, infecções, em especial a Malária, inflamações e hipertensão arterial, sendo esses remédios na maioria das vezes preparados através infusão e decocção. Dentre essas são citadas como aquelas que possuem propriedades cicatrizantes: *Solidago chilensi* (erva-lanceta), pertencente à região sul do Brasil, e *Copaifera langsdorfii* (Copaíba) (SANTOS et al., 2014).

A Copaíba (*Copaifera* spp.) ganha destaque, dentre as plantas medicinais amazônicas, como fitoterápico cicatrizante, dado suas propriedades adstringentes e anti-inflamatórias. Apesar de ter uso principalmente no tratamento de feridas e como antisséptico urinário (MASSON-MEYERS et al., 2013), diversas funções são associadas ao vegetal, por exemplo, o tratamento de doenças de trato respiratório superior e inferior, úlceras (STUPP et al., 2008), endometriose (SILVA et al., 2015), afecções de sistema reprodutor através de creme vaginal (LIMA et al., 2011), como substituto à Clorexidina em profilaxia dentária em cães (PIERI et al., 2014), além de ser utilizada como anti-tétano, anti-tumor (SANTOS et al., 2012), anti-*leishmania* e larvicida (LEANDRO et al., 2012).

Essas propriedades relacionadas com a Copaíba têm correlação com os seus principais componentes, sesquiterpenos e diterpenos, sendo o primeiro quase 90% da constituição vegetal, dentre esses se destaca o β -cariofileno como o seu principal representante. As propriedades cicatrizantes relacionadas a essa planta, como o poder anti-inflamatório são provenientes de seu componente principal, os sesquiterpenos, enquanto que as características antimicrobianas, que auxiliam a reparação de lesões, são originadas pelos diterpenos (LEANDRO et al., 2012).

Os resultados obtidos por Estevão et al. (2013), no tratamento de flaps cutâneos, provaram que o uso de óleo de copaíba a 10%, diretamente aplicado sobre a lesão, foi benéfico para a cicatrização, diminuindo a necrose e acelerando o processo de reparação. A mesma vantagem foi encontrada por Masson-Meyers et al. (2013), que diferente da maioria dos trabalhos com o uso de *Copaifera* spp. no tratamento de feridas cutâneas, desenvolveram um creme à base de óleo de Copaíba à 10%, tendo sido demonstrado em estudos prévios ser a concentração ótima para esse fim (MASSON-MEYERS et al., 2013). Nesse estudo, também foi obtida uma vantagem em relação à reparação da pele, com aumento na velocidade do processo e a quantidade de colágeno envolvida na resolução da lesão.

No entanto, de acordo com Brito et al. (1998) o uso de óleo-resina in natura, influenciou negativamente a cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos Wistar, assim como Vieira et al. (2008), que observaram piora na cicatrização de feridas, com presença de corpo estranho, quando utilizado o óleo de Copaíba no protocolo terapêutico, o que traz à tona a questão de que a forma farmacêutica utilizada nesses experimentos influenciou o resultado final obtido.

Além de seus efeitos cutâneos, Silva et al. (2015) buscaram avaliar a ação sobre a reparação óssea desse produto, observando que o uso de óleo de copaíba, em seu estado puro não apresentava diferença em relação ao protocolo tradicional, com meloxicam. Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2013) testando o uso de óleo de copaíba em alvéolo dentário, após a extração de dentes, no qual encontraram efeito benéfico, em administração tópica e sistêmica, na reparação do osso, entretanto, efeitos deletérios em tecido conjuntivo. Ainda sobre o uso de copaíba em odontologia veterinária, Dias et al. (2015) constataram que o uso de pasta de hidróxido de cálcio associada ao óleo de copaíba não apresentou diferenças, quando comparada ao padrão (associação da pasta com solução salina estéril), tendo ambas os mesmos resultados sobre a formação de ponte dentária, além de apresentarem efeito antimicrobiano semelhantes.

Apesar do gênero possuir diversas espécies, os principais resultados positivos no uso como cicatrizante são aqueles que utilizam a espécie *Copaifera langsdorffii* em sua metodologia. Dentre as partes utilizadas desse vegetal, o óleo extraído de seu tronco é a fração mais significativa, sendo utilizado na maioria dos estudos encontrados, porém pesquisadores buscam ampliar o seu uso, através de pesquisas com o extrato das folhas, que apresentou propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras em ratos submetidos artificialmente a acidente vascular cerebral (BOTELHO et al., 2015), enquanto Stupp et al. (2008) avaliaram possíveis usos para as sementes de *Copaifera langsdorffii*, encontrando em sua composição cumarina e xiloglicanos, que podem ter possível emprego na indústria cosmética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal do Acre, processo de número 23107.016568/2015-44 e protocolo 82/2015, Utilizaram-se 15 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando ± 350 g, com cerca de 100 dias de idade, machos, divididos em três grupos de cinco de animais cada, separados entre si por caixas de polipropileno, aclimatados por sete dias, e mantidos em condições de temperatura média de 22°C, 50% de umidade, e ciclo de 12h de luz/escuro, alimentados com ração peletizada para roedores e água *ad libitum*, durante todo o estudo.

O óleo-resina de Copaíba na forma pura foi obtido através da coleta dos troncos de árvores de *Copaifera langsdorffii* doada ao estudo pela Cooperativa Agroextrativista dos Produtores Rurais do Vale do Rio Iaco (COOPERIACO). Sendo utilizada no estudo em sua forma *in natura*.

O aparelho de laser utilizado no estudo tinha como características: ponteira de AsGA, modelo Laserpulse®, do fabricante Ibramed, com comprimento de onda de 904nm. Com o protocolo de modo contínuo, focal, durante 10s, na dose de 4J/cm², calculada através da seguinte fórmula:

$$De = \frac{Pm \times t}{A}$$

em que *De* significa densidade de energia (J/cm²) ou Dose,

Pm a potência média do aparelho de *laser*,

t o tempo de aplicação e *A* a área de aplicação.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados através da combinação entre cetamina (25mg/kg), xilazina (1,5mg/kg) e tramadol (12mg/kg) administrados intramuscularmente como indução, e mantidos através da

inalação de isoflurano. A analgesia pós-operatória foi continuada por três dias, com o uso de tramadol (12mg/kg), administrado no subcutâneo de cada indivíduo. Quando em plano anestésico, passaram por tricotomia na região dorsal toraco-lombar, seguida de antissepsia realizada com álcool isopropílico a 70% e clorexidina a 2%. Para a confecção das feridas, fragmentos de pele de oito mm foram excisados com o auxílio de *punch* de biopsia cutânea (Figura 2A). No total, cinco feridas foram criadas na região tricotomizada de cada animal, como pode ser observado na Figura 2B.

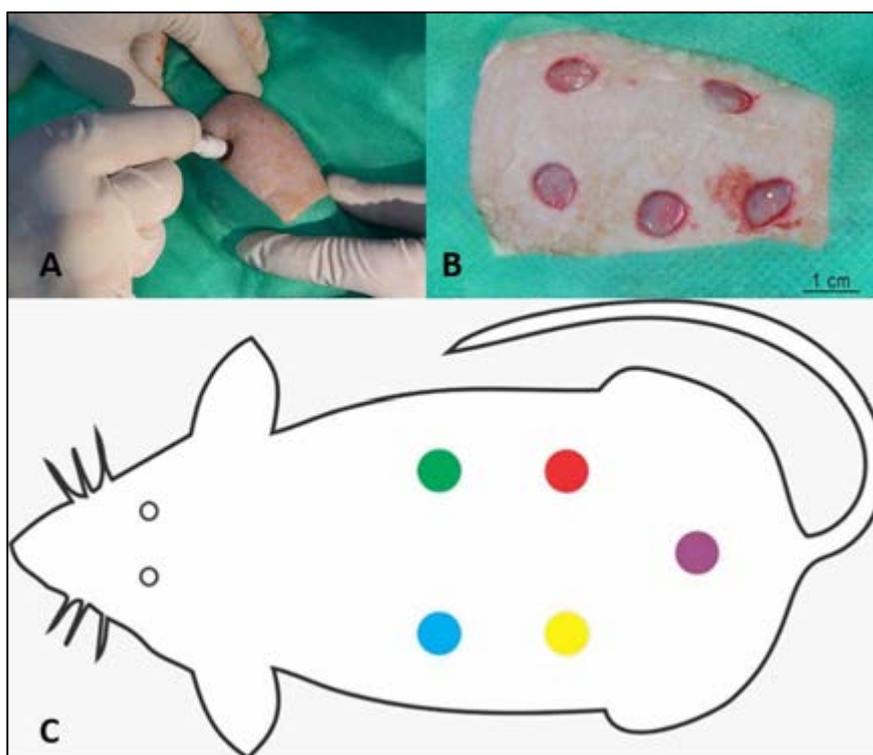


Figura 2. Confecção de cinco feridas cutâneas com *punch* de biopsia de 8mm na região cérvico-tóraco-abdominal dorsal de ratos Wistar (A e B). Em C. Esquema representativo das feridas cirúrgicas e seus respectivos tratamentos. Azul: controle negativo (T1); verde: controle positivo (T2); amarelo: laserterapia de baixa potência (T3); vermelho: óleo-resina de Copaíba (T4); roxo: associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5).

Logo após o procedimento cirúrgico, iniciaram-se os protocolos terapêuticos que seriam mantidos durante 14 dias. Em todos os animais, procedeu-se, previamente ao tratamento, a limpeza de todas as feridas, com clorexidina a 2%, seguida de solução fisiológica a 0,9%. Os seguintes tratamentos eram então aplicados, em intervalos de 24h: grupo controle negativo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); grupo controle positivo, com vaselina sólida (T2) (MASSON-MEYERS et al., 2013); grupo da

laserterapia de baixa potência (T3); grupo do óleo-resina de Copaíba estrito (T4); e grupo de associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5) (Figura 2C). O modelo do estudo possuía como grupo experimental, cada ferida individualmente, e seus 15 animais como repetições.

A aplicação de cada tratamento, foi homogênea em todos os animais, desde o dia do procedimento cirúrgico (D0), até o final do estudo (D14). Iniciando-se pela aplicação da laserterapia, nas feridas de tratamento T3 e T5. Não houve contato entre o aplicador e a pele, com distância média de 1cm. Em seguida, aplicou-se topicamente uma gota do óleo-resina de copaíba, nas feridas de tratamento T4 e T5. Finalizando com a administração externa de vaselina sólida nos ferimentos de T2, e uma gota de solução fisiológica 0,9% nas de T1. Todos os tratamentos foram aplicados pelo mesmo pesquisador, em todas as sessões.

Macroscopicamente avaliou-se as feridas por sua umidade, presença de crostas, presença de tecido de granulação e características de inflamação perceptíveis a olho nu. As análises da taxa de cicatrização ocorriam previamente à limpeza dos ferimentos, e foram obtidas através da mensuração diária da área do ferimento com o uso de paquímetro (SANTOS et al., 2006), por um único pesquisador, medindo cada eixo da úlcera (vertical e horizontal), que seriam considerados diâmetros da elipse (Figura 3), e calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$A = R \times r \times \pi$$

em que R é o raio maior,
 r o raio menor e
 π o valor de pi (3,14...).

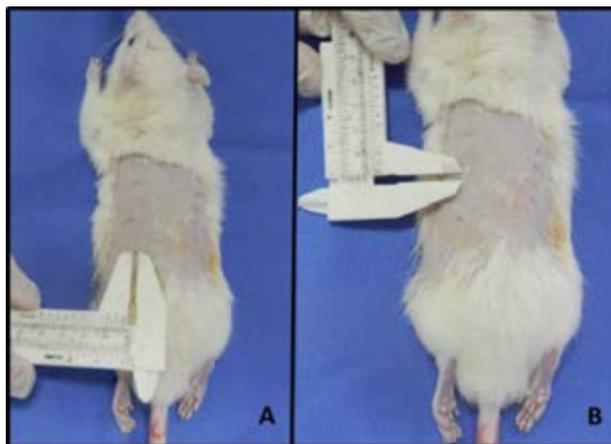


Figura 3. Mensuração da área de feridas cutâneas realizadas com punch de 8mm em ratos da linhagem Wistar, com auxílio de paquímetro, nos eixos horizontal (A) e vertical (B).

Para as avaliações histopatológicas, os animais foram eutanasiados, com sobredosagem de isoflurano, nos dias um, sete e 14 do estudo, em grupos de cinco animais, proporcionando análise representativa de cada estágio da cicatrização. Os fragmentos cutâneos de cada ferida, foram coletados, separados e identificados individualmente. Essas amostras foram então conservadas em formol a 10%, até o momento da coloração. Foram realizados dois cortes de cada amostra com a espessura de 4 a 5 μ cada.

De cada ferida coletada, uma parte do material foi analisada através da coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), para a avaliação do infiltrado inflamatório, e a metade restante foi processada para a coloração de Picosirius Red, para a quantificação e caracterização do colágeno.

Os resultados obtidos após a observação microscópica de cada amostra foram tabulados, e naquelas com HE como método de coloração, os seguintes parâmetros foram analisados: inflamação aguda (IA), necrose tecidual (NC), tecido de granulação (TG) e fibroplasia (FP). Descritos através de graus, de 0 (ausência) à 3 (expressão máxima). Para as análises de Picosirius Red, a expressão de cada tipo de colágeno foi descrita a partir de sua porcentagem no tecido, sendo o colágeno tipo I visto como vermelho, e o colágeno tipo III como verde, ambos sob luz polarizada. Todas as análises histopatológicas foram realizadas em microscópio de modelo DM1000, Leica, com câmera de captura acoplada modelo DFC295, Leica, com auxílio de programa de captura de imagem Image Proplus 4.1, com aumento ótico de 4x.

A análise estatística utilizada foi realizada de maneira não paramétrica, com os efeitos dos tratamentos comparados através do teste de Kruskal-Wallis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As observações macroscópicas indicaram que as feridas pertencentes ao grupo controle negativo (solução fisiológica 0,9%) e aquelas tratadas com LTBP foram as que apresentaram maior redução de sua área em menor tempo. Nas úlceras pertencentes a T2 observou-se maior umidade, porém com menor taxa de cicatrização, observada por seu tamanho em relação as demais. Nas feridas tratadas com óleo-resina de copaíba (T4), observou-se a formação demasiada de crostas, que impediram a contração das feridas, sendo, portanto, as de maior tamanho, durante mais tempo. O grupo de feridas em que se aplicou LTBP com óleo-resina de copaíba encontrava-se com boa contração e menor quantidade de crostas, quando comparado ao tratamento T4. Todas as feridas encontravam-se completamente fechadas e sem a presença de inflamação ou crostas ao final do experimento (Figura 4).

Esses resultados demonstram que a associação das técnicas de LTBP e administração tópica de óleo-resina de copaíba possui uma vantagem em relação ao protocolo T4, dado que o aspecto crostoso das feridas foi reduzido. Esse achado pode indicar que a laserterapia minimiza os efeitos deletérios à cicatrização provocados pelas características físicas do fitoterápico, permitindo que ambos os potenciais anti-inflamatórios dessas alternativas terapêuticas sejam exacerbados.

As taxas de cicatrização, obtidas através das áreas das feridas, revelaram que no dia um do estudo, os 15 animais submetidos ao experimento apresentavam como menores feridas, aquelas pertencentes ao tratamento com solução fisiológica 0,9%, (T1) no entanto essas não apresentaram diferença em relação à T2 e T3, tratadas com vaselina sólida e LTBP respectivamente. Este fato pode ser explicado pois no período de 24h as feridas ainda se encontram na fase inflamatória da cicatrização, sem redução significativa de sua área (MITTAL; SATISH; ANIMA, 2013). Ainda nesse grupo, as feridas pertencentes aos tratamentos que incluíam óleo-resina de copaíba (T4 e T5)

foram as de maior tamanho, estatisticamente iguais a T2 (Tabela 1), resultados esses que condizem com as observações visuais.



Figura 4. Aspectos macroscópicos das feridas cutâneas produzidas com *punch* de biópsia de 8mm, em rato da linhagem Wistar, tratadas com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), nos dias 1 (A), 5 (B), 10 (C) e 14 (D) de pós-operatório.

Os resultados obtidos no sétimo dia de tratamento, como pode ser observado na Tabela 1, revelaram que o controle negativo (T1) ainda permanecia como aquele com maior potencial de contração do tecido, no qual encontravam-se as menores áreas de ferida, enquanto que os tratamentos de LTBP associada à óleo-resina de copaíba e óleo-resina restrita, permaneceram como aqueles que demoraram mais para realizar o

fechamento das soluções de continuidade do tecido, sendo iguais a T2 (teste de Kruskal-Wallis; $P > 0,05$).

A mesma tendência observada nos dias um e sete da pesquisa, permaneceu durante o terço final da cicatrização, logo, as áreas dos dias oito a 13 obtiveram como tratamento de maior eficácia, para a redução desse tamanho aquele com solução fisiológica a 0,9%, e os tratamentos com óleo-resina de copaíba (T4 e T5), como os menos eficazes para esse parâmetro. Porém, no último dia de experimento, como pode ser observado na Tabela 1, não existiram diferenças entre os tratamentos, o que evidencia que no fim da pesquisa todos os protocolos empregados foram capazes de fechar as suas respectivas feridas. Apesar dessa semelhança encontrada ao final do estudo, vale ressaltar que a redução mais acelerada dos ferimentos reduz diversas complicações, como a infecção secundária, não encontrada em nenhuma das feridas realizadas nos animais deste estudo.

Tabela 1 - Área das feridas cutâneas (mediana e intervalos interquartis em mm) induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), nos dias um, sete e 14 de pós-operatório.

Tratamentos	D1	D7	D14
T1	0,25 (0,21-0,37) c	0,01 (0,0035-0,02) c	0 (0-0) a
T2	0,28 (0,23 - 0,37) abc	0,04 (0,03-0,07) ab	0,01 (0-0,005) a
T3	0,28 (0,25 - 0,32) bc	0,03 (0,02-0,08) b	0 (0-0) a
T4	0,37 (0,28 - 0,5) a	0,07 (0,03-0,13) ab	0,001 (0-0,0005) a
T5	0,32 (0,31 - 0,38) ab	0,07 (0,04-0,12) a	0,02 (0-0,01) a

Legenda: a partir das áreas mensuradas de cada ferida obteve-se a mediana e intervalos interquartis de cada tratamento, e realizou-se a análise estatística, em que letras iguais não possuem diferença significativa.

De acordo com os resultados obtidos na pesquisa, observou-se que diferindo do que foi encontrado por Masson-Meyers et al. (2013), as feridas tratadas com o fitoterápico testado foram as de menor taxa de cicatrização de feridas, apresentando maior área, por mais tempo, enquanto os autores do estudo citado descreveram resultados superiores para esse parâmetro, com o uso da substância. Tal fato pode derivar das características físicas do óleo-resina, que devido sua viscosidade tende a formar grandes crostas sobre os ferimentos, dificultando a contração dos mesmos.

Apesar do emprego do mesmo fitoterápico, as formas farmacêuticas foram distintas nos dois estudos, sendo utilizado por Masson-Meyers et al. (2013) um creme com copaíba a 10%, o que pode ter diminuído a capacidade de enrijecer-se nos tecidos, enquanto que no presente estudo utilizou-se a forma *in natura*, óleo-resina, propiciando a formação desvantajosa das crostas. O excesso de crostas e atraso na reepitelização, também pode ser observado por Vieira et al. (2008), tendo sido utilizado nesse caso, a mesma forma farmacêutica *in natura*, bem como no presente estudo, confirmando um fator deletério do uso desse fitoterápico.

A laserterapia de baixa potência foi menos eficiente que o controle negativo na redução do tamanho das feridas, divergindo do que foi encontrado por Silveira, Streck e Pinho (2007) em que vantagens nesse parâmetro foram evidenciadas com o uso de LTBP, com *laser* de AsGa (comprimento de onda de 904nm), apesar da ausência de outros tratamentos, mesmo no grupo controle, para comparação.

As análises histopatológicas que objetivaram classificar o infiltrado inflamatório tecidual, revelaram para o dia 1, de acordo com a Tabela 2, que no início do processo cicatricial, dia um, não houve diferença para os parâmetros TG e FP, o que era esperado, devido ao curto tempo em relação à injúria. Enquanto que para o parâmetro inflamação aguda (IA), o tratamento T1 obteve a maior redução do processo inflamatório, e T5 aquele em que a inflamação se encontrava mais exacerbada, apesar disso, de acordo com o teste estatístico, os tratamentos T1 e T5 foram iguais à T2, T3 e T4. Para o parâmetro de necrose tecidual (NC) observou-se menor grau para o tratamento com óleo-resina de copaíba (T4), enquanto aquelas feridas tratadas com LTBP tiveram os maiores graus, porém estatisticamente esses dois não se diferenciaram de T1, T2 e T5. Esse fator revelou uma vantagem do uso de copaíba em protocolos cicatriciais, pois, assim como Estevão et al. (2013), que tiveram as menores taxas de necrose em *flaps* cutâneos tratados com óleo-resina de copaíba, o uso do fitoterápico no presente estudo provou diminuir o grau desse parâmetro na fase inicial da cicatrização, ou seja, no dia um do experimento.

Tabela 2 – Análise histopatológica do infiltrado inflamatório das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de amostras coletadas no dia um do tratamento.

Tratamentos	IA	NC	TG	FP
T1	2 (2-3) a	2 (1-2) ab	1 (0-1) a	0 (0-1) a
T2	2 (2-3) ab	2 (1,5-3) ab	1 (0,5-1) a	0 (0-0,5) a
T3	3 (3-3) ab	2 (1,5-3) a	1 (0,5-1) a	0 (0-0,5) a
T4	2 (1-3) ab	1 (0,5-2) b	1 (0-1) a	0 (0-2) a
T5	3 (2-3) b	2 (2-2) ab	1 (0-1,5) a	1 (0-1) a

Legenda: analisou-se os parâmetros: inflamação aguda (IA); necrose tecidual (NC); tecido de granulação (TG); e fibroplasia (FP). Sendo 0 a ausência, e 1 a 3 diferentes graus de intensidade dos parâmetros. A partir dos valores obtidos calculou-se a mediana e intervalos interquartis (entre parênteses) de cada tratamento, e realizou-se a análise estatística, em que letras iguais não possuem diferença significativa.

Já no dia sete do estudo (Tabela 3), o processo cicatricial em evolução revelou resultados iguais entre os tratamentos para TG, o que pode ser observado macroscopicamente com a expressão de tecido de granulação em todas as feridas de todos os animais. No quesito IA, os tratamentos com solução fisiológica (T1) e LTBP (T3) demonstraram menor grau de inflamação, no entanto não se apresentaram estatisticamente diferentes entre eles, e iguais a T2. Os graus de necrose observados no parâmetro NC mostram os tratamentos T1 e T3 como melhores para a aceleração do processo cicatricial, sendo significativamente menores que os demais. A fase proliferativa da cicatrização (FP) foi observada em maior quantidade em feridas do grupo T3 e T5, ambos sujeitos a LTBP, porém esses resultados foram considerados iguais ao grupo T1 (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise histopatológica do infiltrado inflamatório das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de punch de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de laser de baixa potência (T5), de amostras coletadas no sétimo dia de tratamento.

Tratamentos	IA	NC	TG	FP
T1	0 (0-0) c	0 (0-0) c	2 (1,5-3) a	2 (2-2,5) abc
T2	1 (0-1) abc	1 (0-1) ab	3 (3-3) a	2 (1-2) c
T3	0 (0-0,5) bc	0 (0-0,5) bc	2 (1,5-3) a	3 (2-3) a
T4	1 (0-2) a	1 (1-2) a	3 (2-3) a	2 (1-2) bc
T5	1 (0-1) ab	1 (0-2) a	2,5 (0-3) a	2,5 (2-3) ab

Legenda: analisou-se os parâmetros: inflamação aguda (IA); necrose tecidual (NC); tecido de granulação (TG); e fibroplasia (FP). Sendo 0 a ausência, e 1 a 3 diferentes graus de intensidade dos parâmetros. A partir dos valores obtidos calculou-se a mediana e intervalos interquartis (entre parênteses) de cada tratamento, e realizou-se a análise estatística, em que letras iguais não possuem diferença significativa.

Para o grupo de animais eutanasiados ao final do experimento os resultados histopatológicos referentes ao infiltrado inflamatório exibiram ausência de inflamação aguda e necrose em todos os tratamentos, o que condiz com a observação macroscópica de fechamento de todas as feridas. Os resultados referentes ao parâmetro TG, mostraram a desvantagem do uso da vaselina sólida em relação aos demais tratamentos, dado que em T2 ainda ocorria a presença de tecido de granulação, já ausente em todos os demais. Porém, os níveis de renovação tecidual (FP), apesar de presentes e maiores que no dia um, diferiram entres os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise histopatológica do infiltrado inflamatório das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de punch de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de laser de baixa potência (T5), de amostras coletadas no dia 14 do tratamento.

Tratamentos	IA	NC	TG	FP
T1	0 (0-0) a	0 (0-0) a	0 (0-1) b	2,5 (1-3) a
T2	0 (0-0) a	0 (0-0) a	1 (1-2,5) a	3 (1,5-3) a
T3	0 (0-0) a	0 (0-0) a	0 (0-1) b	2 (2-3) a
T4	0 (0-0) a	0 (0-0) a	0 (0-1) b	3 (3-3) a
T5	0 (0-0) a	0 (0-0) a	0 (0-1) b	2 (2-2) a

Legenda: analisou-se os parâmetros: inflamação aguda (IA); necrose tecidual (NC); tecido de granulação (TG); e fibroplasia (FP). Sendo 0 a ausência, e 1 a 3 diferentes graus de intensidade dos parâmetros. A partir dos valores obtidos calculou-se a mediana e intervalos interquartis (entre parênteses) de cada tratamento, e realizou-se a análise estatística, em que letras iguais não possuem diferença significativa.

Os benefícios observados com o uso da LTBP foram semelhantes às de outros autores, que testaram o *laser* de AsGa, como Demir et al. (2004) que observaram ganho na síntese do colágeno e na força do tecido de cicatrização, além de redução da fase inflamatória, resultados esses semelhantes aos encontrados nesse experimento, em que o tratamento com LTBP estrita obteve o menor grau de necrose, e maior expressão de fibroplasia em ambos os tratamentos que utilizaram esse método (T3 e T5) no dia sete do ensaio, apesar de estatisticamente igual à T1.

A quantificação do colágeno presente nos cortes histológicos revelou, para as feridas coletadas no dia um do experimento, diferença entre o tratamento controle negativo (T1) e os demais, para o parâmetro Colágeno Tipo III (III), sendo o primeiro aquele com menor expressão de colágeno, enquanto todas as outras feridas foram iguais, o que comprova que apesar de maior capacidade de contração de feridas, a superioridade macroscópica do tratamento com solução fisiológica pode não condizer com a melhor cicatrização em longo prazo, devido ao atraso na expressão do colágeno referente à fase inicial da cicatrização (Tabela 5).

Tabela 5 – Quantificação dos colágenos tipo I (I) e tipo III (III) das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de amostras coletadas no dia um do tratamento.

Tratamentos	I (%)	III (%)
T1	37,5 (20-70) a	10 (5-15) a
T2	20 (12,5-42,5) ab	30 (25-30) b
T3	20 (5-45) ab	30 (15-32,5) b
T4	15 (10-20) b	25 (27,5-32,5) b
T5	10 (7,5-20) b	20 (17,5-27,5) b

Legenda: a partir das porcentagens de colágeno tipo I (I) e tipo III (III) calculou-se a mediana e intervalos interquartis (entre parênteses) de cada tratamento, e realizou-se a análise estatística, em que letras iguais não possuem diferença significativa.

Essa mesma análise, nas feridas respectivas ao grupo eutanasiado no dia sete do experimento, revelou que num processo cicatricial de maior evolução não houve diferenças entre os protocolos terapêuticos, tanto para o parâmetro de Colágeno Tipo III (III), quanto para Colágeno Tipo I (I), como pode ser observado na Tabela 6.

No entanto, para amostras coletadas no dia 14, pode ser observada maior expressão de Colágeno Tipo III nas amostras dos protocolos terapêuticos T4 e T5 (Figura 5), ambos com a presença de óleo-resina de copaíba, o que pode indicar um estímulo do fitoterápico à síntese desse agente da cicatrização, porém, estatisticamente essa superioridade foi considerada igual aos tratamentos T2 e T3, como pode ser observado na tabela 7. Já o controle negativo (T1) teve o menor valor para o parâmetro anterior, o que condiz com o observado nas feridas desse mesmo protocolo terapêutico no dia 1 do estudo, contudo, esse foi considerado à T2 e T3, de acordo com os valores encontrados na análise estatística.

Tabela 6 – Quantificação dos colágenos tipo I (I) e tipo III (III) das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de *punch* de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de *laser* de baixa potência (T5), de amostras coletadas no sétimo dia de tratamento.

Tratamentos	I (%)	III (%)
T1	25 (20-32,5) a	25 (15-35) a
T2	15 (7,5-55) a	25 (7,5-35) a
T3	20 (10-35) a	25 (17,5-32,5) a
T4	10 (5-40) a	20 (10-42,5) a
T5	30 (15-37,5) a	10 (7,5-20) a

Legenda: a partir das porcentagens de colágeno tipo I (I) e tipo III (III) calculou-se a mediana e intervalos interquartis de cada tratamento, e realizou-se a análise estatística, em que letras iguais não possuem diferença significativa.

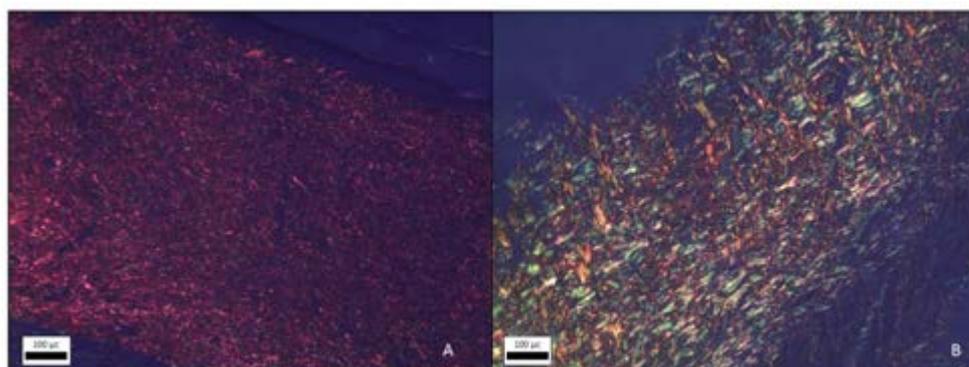


Figura 5. Comparação da expressão de colágeno tipo I (vermelho-vivo) e III (verde) entre feridas cutâneas induzidas cirurgicamente com auxílio de *punch* de 8mm em ratos Wistar e tratadas com solução fisiológica 0,9% (A) e associação de LTBP com óleo-resina de Copaíba (B), no dia 14 de pós-operatório.

Tabela 7 – Quantificação dos colágenos tipo I (I) e tipo III (III) das feridas cutâneas induzidas cirurgicamente, através de punch de biópsia de 8mm, em ratos Wistar e tratadas com grupo, com solução fisiológica a 0,9% (T1); vaselina sólida (T2); laserterapia de baixa potência (T3); óleo-resina de Copaíba (T4); associação de óleo-resina de Copaíba com a aplicação de laser de baixa potência (T5), de amostras coletadas no último dia de tratamento.

Tratamentos	I (%)	III (%)
T1	25 (15-57,5) a	10 (7,5-15) a
T2	20 (10-52,5) a	25 (15-32,5) ab
T3	20 (12,5-47,5) a	25 (17,5-37,5) ab
T4	20 (12,5-22,5) a	35 (17,5-42,5) b
T5	10 (5-25) a	35 (27,5-42,5) b

Legenda: a partir das porcentagens de colágeno tipo I (I) e tipo III (III) calculou-se a mediana e intervalos interquartis (entre parênteses) de cada tratamento, e realizou-se a análise estatística, em que letras iguais não possuem diferença significativa.

Esses resultados condizem com o experimento de Silva et al. (2013), no qual o protocolo terapêutico com o uso de copaíba possuiu fibras colágenas de maior espessura, e melhor organizadas, sendo nesse estudo encontrados os melhores resultados na expressão de colágeno tipo III nos grupos de feridas tratadas com o uso de copaíba, estrita ou associada à LTBP. E embora não tão evidentes quanto os resultados de Masson-Meyers et al. (2013), nos quais observou-se diferença na síntese de colágeno, através do ensaio de hidroxiprolina, com melhores resultados para as feridas tratadas com copaíba, também pode ser observada uma tendência para maior expressão dessas moléculas, nos tratamentos que incluíam fitoterapia.

Vale ressaltar, que o colágeno tipo III apresentava-se em maior quantidade nas amostras, e foi determinante de diferenças estatísticas entre os tratamentos, dado esse que comprova que apesar de passados 14 dias da injúria, o colágeno ainda não havia sido substituído, por colágeno tipo I, como o esperado para a fase de remodelamento da cicatrização. Essa informação alerta para a necessidade de realização de novos estudos com coletas de informações mais prolongadas.

A busca de novos protocolos terapêuticos é um campo de estudo pertinente para o avanço no tratamento de feridas em animais domésticos, com base nesse objetivo empregou-se nas feridas cutâneas, duas alternativas terapêuticas cuja a eficácia ainda vem sendo comprovada, a laserterapia de baixa potência e o óleo-resina de copaíba. De modo geral, todos os tratamentos obtiveram resultados finais positivos, com a cicatrização completa de todas as feridas, com exceção do controle positivo, vaselina sólida, que demonstrou macroscopicamente e histopatologicamente sua desvantagem

em relação aos demais. No entanto, do ponto de vista da área das feridas, o controle positivo, solução fisiológica a 0,9%, teve maior capacidade de contração de feridas, seguido pelo tratamento com LTBP. Essa vantagem do controle positivo, não foi evidenciada na análise microscópica do tecido, dado que os resultados referentes ao infiltrado inflamatório confirma a superioridade da LTBP e fitoterapia, além da associação de ambos, em relação a solução fisiológica a 0,9%, com menor grau de necrose e inflamação aguda, e maiores níveis de fibroplasia.

Outra evidência da eficácia dos protocolos de tratamento em relação aos controles reside na quantificação do colágeno presente nas amostras cutâneas, em que observou-se no momento inicial da cicatrização, dia um, maior quantidade de colágeno tipo III nas feridas dos tratamentos T2, T3, T4 e T5, tendência essa que pode ser confirmada nas análises do final do experimento, quando os tratamentos com a presença do fitoterápico (T4 e T5) foram superiores nas expressão do colágeno tipo III, apesar de estatisticamente iguais a T2 e T3.

Apesar das vantagens encontradas nesses estudos, o uso do *laser* de AsGa (comprimento de onda de 904nm) pareceu ser inferior na capacidade de cicatrização de feridas cutâneas, quando comparado aos trabalhos realizados com *laser* de HeNe (comprimento de onda de 632,8nm) (REDDY, 2007), o que pode explicar a ausência de grandes vantagens desse protocolo empregado, em relação às demais técnicas.

5 CONCLUSÕES

O protocolo de associação entre fitoterapia e laserterapia trouxe vantagens como redução de crostas em comparação ao uso exclusivo de Copaíba, maior desenvolvimento de fibroplasia no dia sete do estudo, além de um incremento na expressão de colágeno tipo III ao final do estudo;

A óleo-resina de Copaíba apresentou desvantagem na taxa de cicatrização das feridas, dado que ambos os tratamentos com essa substância obtiveram as maiores áreas, e aspecto macroscópico crostoso;

A resolução da necrose tecidual através do uso da óleo-resina de Copaíba foi vantajosa em relação aos demais protocolos, o que corrobora com o conhecido potencial anti-inflamatório do fármaco;

A laserterapia de baixa potência mostrou capacidade superior de redução da inflamação aguda e necrose tecidual, além de maior fibroplasia, provando seu potencial cicatricial;

A expressão do colágeno do tipo III foi favorecida por ambos os tratamentos que incluíram óleo-resina de Copaíba;

Os dados exibiram ganhos obtidos com uso da copaíba como fitoterápico cicatrizante, valorizando a biodiversidade amazônica. No entanto, as restrições causadas por sua forma *in natura* indicam a necessidade mais estudos com formulação de novas formas farmacêuticas a partir do óleo-resina.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIELE, L.C. et al. Wound healing effect of methanolic leaf extract of *Napoleona vogelii* (Family: Lecythidaceae) in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.7, n.8, p.620-624, 2014.
- AKBIK, D. et al. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v.116, p.1–7, 2014.
- ANDRADE, F.S.S.D.; CLARK, R.M.O.; FERREIRA, M.L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.41, n.2, p.129-133, 2014.
- BOTELHO, J.R.S. et al. Copaíba (*Copaifera* sp.) leaf extracts obtained by CO₂ supercriticalfluid extraction: Isotherms of global yield, kinetics data, antioxidant activity and neuroprotective effects. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.98, p.167–171, 2015.
- BRITO, N.M.B et al. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. **Revista Paraense de Medicina**, v.12, n.1, p.28-32, 1998.
- BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.23, n.2, p.171–183, 2015.
- DEMIR, H.; BALAY, H.; KIRNAP, M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehabilitation Research & Development**, v.41, n.2, p.147–154, 2004.
- DEMIR, H., et al. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehabilitation Research & Development**, v.41, n.5, p.721–728, 2004.
- DIAS, F.G.G. et al. Endodontics pastes formulated with copaiba oil: action on oral microbiota and dentin bridge formation in dogs. **Ciência Rural**, v.45, n.6, p.1073-1078, 2015.
- EPSTEIN, F.; SINGER, A.; CLARK, R. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v.341, p.738–46, 1999.
- ESTEVÃO, L.G.R. et al. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.28, n.12, p.863, 2013.
- FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v.5, n.2, p. 58-62, 2014.
- FORZZA, R.C. et al. Introdução - síntese da diversidade brasileira. In: _____. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p.21-42.
- GHOSH, P.K.; GABA, A. Phyto-Extracts in Wound Healing. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.16, n.5, p.760 - 820, 2013.

- GONÇALVES, R.V. et al. Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 350-355, 2010.
- GONÇALVES, R.V. et al. Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of *Brassica oleracea* on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. **Pathology – Research and Practice**, v.209, p. 648-653, 2013.
- HOSGOOD, G. Reparo de Feridas e Resposta Tecidual Específica à Lesão. In: SLATTER, D.H. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2007.
- KOBAYASHI, Y.T.S. et al. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.52, n.1, p.34-40, 2015.
- LEANDRO, L.M. et al. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v.17, p.3866-3889, 2012.
- LIMA, C.S. et al. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**, v.18, p.1013– 1023, 2011.
- LEANDRO, L.M. et al. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v.17, p.3866-3889, 2012.
- LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada – Princípios e Prática**. 3 ed. Manole. 472 p.
- MASSON, D. S. **Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas**. 2011. 215f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2011.
- MASSON-MEYERS, D. et al. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin. **International Journal of Natural Product Science**, v.3, p.10-20, 2013.
- MASSON-MEYERS, D. et al. Topical Treatment with *Copaifera langsdorffii* oleoresin improves wound healing in rats. **International Journal of Phytomedicine**, v.5, n.3, p.378-386, 2013.
- MAVER, T. et al. A review of herbal medicines in wound healing. **International Journal of Dermatology**, 2015.
- MILLIS, D.L.; SAUNDERS, D.G. Laser Therapy in Canine Rehabilitation. In: MILLIS, D.L.; LEVINE, D. **Canine Rehabilitation and Physical Therapy**. 2 ed. Saunders Elsevier, 2013. 784 p.
- MITTAL, A.; SATISH, S.; ANIMA, P. Herbal boon for wounds. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.2, 2013.
- OLIVEIRA, D.A.A.P. et al. Laser 904nm action on bone repair in rats with osteoporosis. **Osteoporosis International**, v.21, p.2109-2114, 2010.
- PAZYAR, N. et al. Skin Wound Healing and Phytomedicine: A Review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.27, p.303–310, 2014.
- PEPLOW, P.V. et al. Laser Photobiomodulation of Wound Healing: A Review of Experimental Studies in Mouse and Rat Animal Models. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.3, p. 291-325, 2010.
- PERCIVAL, S.L.; FRANCOLINI, I.; DONELLI, G. Low-level laser therapy as an antimicrobial and antibiofilm technology and its relevance to wound healing. **Future Microbiology**, v.10, n.2, p.255-272, 2015.
- PIERI, F.A. et al. Antimicrobial activity of *Copaifera langsdorffii* oil and evaluation of its most bioactive fraction against bacteria of dog's dental plaque. **Pakistan Veterinary Journal**, v.34, n.2, p.165-169, 2014.

- REDDY, G.K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.33, p.344–351, 2003.
- SANATI, M.H. et al. Effect of Ga–As (904nm) and He–Ne (632.8nm) laser on injury potential of skin full-thickness wound. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.103, p.180-185, 2011.
- SANTOS, M.F.S. et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, p.2-7, 2006.
- SANTOS, R.C.V. et al. Antimicrobial activity of Amazonian oils against *Paenibacillus* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.109, p.265–268, 2012.
- SANTOS M.R.A.; LIMA M.R.; OLIVEIRA C.L.L.G. Medicinal plants used in Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.3, p.707-720, 2014.
- SILVA, J.P. et al. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.1, p.17-21, 2010.
- SILVA, M.A. The influence of topic and systemic administration of copaiba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v.5, n.4, p.169, 2013.
- SILVA, J.K.R. et al. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. **Industrial Crops and Products**, v.58, p.55–60, 2014.
- SILVA, P.F. et al. Copaiba oil effect on experimental jaw defect in Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.30, n.2, 2015.
- SILVEIRA, P.C.; STRECK, E.L.; PINHO, R.A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.86, p.279-282, 2007.
- STUPP, T. et al. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorffii* seeds and seed oil. **Bioresource Technology**, v.99, p.2659–2663, 2008.
- VIEIRA, R.C. et al. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.8, p.358-366, 2008.
- YEOH, S. The influence of iron and free radicals on chronic leg ulceration. **Primary Intention: The Australian Journal of Wound Management**, v.8, p.47-55, 2000.