



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ – UFOPA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA – PROPPIT  
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTA - IBEF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS – PPGBio**

**KAMILA LIMA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO (660NM)  
E ÓLEO DE COPAÍBA (*COPAIFERA RETICULATA* DUCKE) EM POMADA NA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*)**

**SANTARÉM – PA**

**2020**

**KAMILA LIMA DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO (660NM)  
E ÓLEO DE COPAÍBA (*COPAIFERA RETICULATA* DUCKE) EM POMADA NA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS (*RATTUS NORVEGICUS ALBINUS*)**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação Mestrado Acadêmico em Biociências, para obtenção do título de mestre em Biociências pela Universidade Federal do Oeste do Pará. Orientadora: Prof. Dra. Adriana Caroprezio Morini. Co-orientadora: Prof. Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira

**SANTARÉM – PA**

**2020**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

- S729a Souza, Kamila Lima de  
Avaliação do efeito da associação da fotobiomodulação (660NM) e óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Duckle) em pomada na cicatrização de feridas em ratos (*Rattus norvegicus Albinus*). / Kamila Lima de Souza. – Santarém, 2020.  
86 p. : il.  
Inclui bibliografias.
- Orientadora: Adriana Caroprezo Morini  
Coorientadora: Elaine Cristina Pacheco de Oliveira  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências
1. Terapia a laser. 2. *Copaifera*. 3. Cicatrização. I. Morini, Adriana Caroprezo, orient. II. Oliveira, Elaine Cristina Pacheco de, coorient. III. Título.

---

CDD: 23 ed. 615.327

Bibliotecária - Documentalista: Renata Ferreira – CRB/2 1440

KAMILA LIMA DE SOUZA

**Avaliação do efeito da associação da fotobiomodulação (660nm) e óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) em pomada na cicatrização de feridas em ratos (*Rattus norvegicus albinus*)**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação Mestrado Acadêmico em Biociências, para obtenção do título de mestre em Biociências pela Universidade Federal do Oeste do Pará. Orientadora: Prof. Dra. Adriana Caroprezo Morini.

Co-orientadora: Prof. Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira

Data da aprovação: 30/12/2020

**BANCA EXAMINADORA:**



---

Dra. Adriana Caroprezo Morini - Orientadora  
Universidade Federal do Oeste do Pará

*Daliane Ferreira Marinho*

---

Dra. Daliane Ferreira Marinho  
Universidade do Estado do Pará



---

Dra. Alanna do Socorro Lima da Silva  
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dedico mais essa vitória à Deus, sem Ele, eu nada seria. À minha família, meus pais, Joás e Kézia, que sempre me apoiaram e incentivaram, e minha irmã Kássia, que viu e ouviu de perto todas as minhas lutas e se dispôs a me ajudar sempre. À minha avó, Dona Ana, e especialmente ao meu avô, Seu Chico (*in memoriam*), que se orgulhava de ter netas estudiosas. À eles, todo o meu amor!

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deus, só Ele é digno de toda honra, glória e louvor, agradeço por todas as bênçãos derramadas sobre a minha vida, por me sustentar e guiar nos momentos que precisei, principalmente nas tribulações, que não foram poucas (rs), e mesmo sem merecer, com sua infinita graça e misericórdia me proporcionou chegar até aqui, obrigada Pai.

Agradeço à minha família, meus pais Joás de Souza e Kézia Lima, meu alicerce, que por mais uma vez me mantinham com ânimo e forças para prosseguir. Obrigada por sempre me amar, apoiar e orar pela minha vida e projetos. Obrigada por me possibilitarem sempre o melhor, pelos ensinamentos e orientações. A minha felicidade é proporcionar orgulho e honra à vocês!

À minha irmã Kássia Souza, meu querubim, minha irmã mais velha, agora uma senhora casada (rsrs), com sobrenome Santiago (obrigada também cunhado), te amo muito minha mana, obrigada por todo o incentivo, paciência, muuitas caronas e artes de graça concedidas para os eventos, haha, @ksqueroarte arrasa sempre! Você é minha inspiração e meu orgulho, por isso, também quero te dar muito orgulho, essa vitória também é sua!!

Aos meus amigos, que me apoiaram e torcem por mim, em especial à Kárita Juliana, amiga das antigas que entrou nessa empreitada junto comigo e sofreu junto, nós conseguimos amigaaa!! À minha amiga Lana Bruna, que estava ao meu lado durante no processo seletivo, e torce por mim, agora serei eu ao lado dela, em breve uma nova mestre no grupo.

Agradeço à Deus também por ter me colocado nesse caminho, quando eu não sabia o que fazer e por ter conhecido pessoas tão divertidas e maravilhosas, obrigada turma Biociências 2018. Não poderia ter estudado em turma melhor, pessoas com carinho imenso uns pelos outros, dispostas a ajudar uns aos outros. Meu colega de turma e profissão e agora amigo chegado (rsrs) Paulo Tavares, agradeço demais pela sua ajuda, disposição, paciência e parceria e por também deixar que o Paulinho me ajudasse, obrigada Paulinho (rs).

À minha orientadora, prof Adriana Morini, que muitas vezes perturbei, e mandei mensagem até aos sábados, mas não se incomodou, e me ajudou sempre que podia, e ao seu escudeiro fiel Ângelo, que estava sempre disposto ao que fosse necessário.

À minha coorientadora, prof Elaine Pacheco, que me direcionou para os melhores caminhos, proporcionou vivências que não imaginei, sofridas, mas muito legais, me socorreu quando estava perdida, e disponibilizou todo o material preciso para a pesquisa que havia no laboratório, obrigada pela paciência e carinho. À ela também agradeço por ter me colocado como parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, em que pude conhecer pessoas que me ajudaram em todo o processo, agradeço à todos, Taiara, Maurício, Iasmim, Josi, maravilhosa, você foi essencial, suas dicas e ajuda foram essenciais e Antonia, uma enviada de Deus, com suas habilidades (especialmente a de manusear seringa, kkk) me ajudou extremamente em uma parte crucial da minha pesquisa, sempre calma e centrada, estarei sempre na torcida por você. Agradeço também à Alessandra Camargo, que mesmo com a agenda cheia, tirava um tempo, até feriado para me ensinar e auxiliar no projeto.

À Universidade Federal do Oeste do Pará, todos os professores e funcionários do programa, ao prof Bernhard Peregovich pela liberação do laboratório de Mineralogia. Ao prof Juarez de Souza, e aos colaboradores do biotério da UEPA, que me ensinaram e deram todo o apoio necessário para a realização da pesquisa.

Que o Senhor abençoe a vida de cada um de vocês!

## EPÍGRAFE

*“(...)Deus conhece tua estrutura  
Sabe o que está fazendo  
Mesmo que seja difícil  
Não pares, Ele está vendo  
Colheu todas tuas lágrimas  
E mandou a ti falar  
Pegue o que Ele te entregou  
E volte para o mar, que é o teu  
lugar(...)”*  
Midian Oliveira



## Resumo

A fotobiomodulação por laser de baixa intensidade é um dos recursos terapêuticos mais utilizados na Fisioterapia pois promove a aceleração do processo de cicatrização tecidual. Outro recurso terapêutico alternativo para emprego no tratamento de feridas é a oleorresina de copaíba, um recurso natural, descrito como anti-inflamatório, antifúngico, antibacteriano, analgésico e cicatrizante. Desse modo, este estudo buscou avaliar os efeitos gerados pela associação da fotobiomodulação (660nm) e óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) em pomada a 10%, na cicatrização de feridas em ratos (*Rattus norvegicus albinus*). Nesta pesquisa foi realizado inicialmente a caracterização química da oleorresina, que apresentou em sua amostra como metabólitos majoritários  $\beta$ -cariofileno (24,48%),  $\beta$ -bisaboleno (23,49%) e éster metílico do ácido cauranóico (9,93%). Em seguida, realizado o teste de irritação/corrosão dérmica, em ratas fêmeas, com a oleorresina *in natura* e em pomada a 10%, que demonstrou na sua forma *in natura* ser classificada como irritante moderada, mas não corrosiva, já a pomada não apresentou sinais de irritação/corrosão dérmica. Para avaliação da cicatrização de feridas, foram utilizados 42 ratos da linhagem Wistar, cada animal com duas feridas em seu dorso, uma superior e uma inferior, divididos igualmente em dois grupos (G1 e G2). No G1, a ferida superior sendo grupo controle (GC), tratado com soro fisiológico 0,9%, e a inferior, grupo fotobiomodulação (GF), tratado com laser 4J/cm<sup>2</sup>, 660nm; no G2, a superior, grupo pomada (GP) tratado com copaíba em pomada a 10% e a inferior, grupo fotobiomodulação e pomada (GFP). Todos os animais foram submetidos a tratamento diário, após um período de 3 dias, sete animais de cada grupo, escolhidos de forma aleatória, foram submetidos à eutanásia, assim como, após 7 e 14 dias de tratamento. À avaliação macroscópica foi possível observar de forma significativa ( $p < 0,01$ ) menor área de lesão no GC e GP em comparação com o GFP. À avaliação microscópica todos os grupos apresentaram resultados significativos em relação à contagem de neutrófilos, vasos sanguíneos, fibroblastos e colágeno total, porém, com melhores resultados no GP. Concluindo dessa maneira, que o grupo pomada obteve melhor resposta ao ser utilizado de forma isolada, e o grupo de associação das terapias não foi capaz de modular de forma mais eficiente o processo de cicatrização, e possivelmente o uso alternado das terapias.

**Palavras-Chave:** Terapia a Laser. *Copaifera*. Cicatrização. Pele.

## Abstract

Photobiomodulation by low intensity laser is one of the most used therapeutic resources in Physiotherapy because it promotes the acceleration of the tissue healing process. Another alternative therapeutic resource for use in the treatment of wounds is oleoresin from copaiba, a natural resource, described as anti-inflammatory, antifungal, antibacterial, analgesic and healing. Thus, this study sought to evaluate the effects generated by the association of photobiomodulation (660nm) and copaiba oil (*Copaifera reticulata* Ducke) in 10% ointment, in wound healing in rats (*Rattus norvegicus albinus*). In this research, the chemical characterization of oleoresin was initially carried out, which presented in its sample as major metabolites  $\beta$ -karyophyllene (24.48%),  $\beta$ -bisabolene (23.49%) and methyl ester of kuranoic acid (9.93%). Then, the skin irritation/corrosion test was carried out on female rats, with oleoresin *in natura* and in 10% ointment, which demonstrated in its natural form to be classified as a moderate irritant, but not corrosive, since the ointment did not present signs of skin irritation/corrosion. To assess wound healing, 42 Wistar rats were used, each animal with two wounds on its back, one upper and one lower, divided equally into two groups (G1 and G2). In G1, the upper wound being a control group (CG), treated with 0.9% saline, and the lower, a photobiomodulation group (GF), treated with a 4J/cm<sup>2</sup> laser, 660nm; in G2, the upper one, ointment group (GP) treated with copaiba in 10% ointment and the lower one, photobiomodulation and ointment group (GFP). All animals were submitted to daily treatment, after a period of 3 days, seven animals from each group, chosen at random, were euthanized, as well as, after 7 and 14 days of treatment. The macroscopic evaluation showed a significantly smaller ( $p < 0.01$ ) lesion area in the CG and GP compared to the GFP. Upon microscopic evaluation, all groups showed significant results in relation to the count of neutrophils, blood vessels, fibroblasts and total collagen, however, with better results in GP. Concluding in this way, that the ointment group obtained a better response when used in isolation, and the group of association of therapies was not able to more efficiently modulate the healing process.

**Keywords:** Laser Therapy. *Copaifera*. Wound Healing. Skin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore de copaíba <i>s.p.</i> .....	21
Figura 2 – Extração da oleorresina de copaíba.....	22
Figura 3 – Local da coleta na FLONA.....	33
Figura 4 – Amostra da oleorresina coletada.....	35
Figura 5 – Formulação da pomada.....	36
Figura 6 – Pomada a 10% homogeneizada.....	36
Figura 7 – Protocolo de classificação do teste. A- Sistema de graduação sobre formação de eritema e escaras; B- Sistema de graduação sobre formação de edema. C- índice geral de classificação do produto.....	38
Figura 8 – Localização das lesões.....	40
Figura 9 - Esquema da divisão dos grupos.....	41
Figura 10 – Aparelho Laserterapia Portátil Recover.....	42
Figura 11 – Evolução da área da lesão por dias de avaliação em cada grupo.....	52
Figura 12 – Resultado comparativo intergrupos da área da lesão (cm <sup>2</sup> ) de acordo com dias de avaliação.....	55
Figura 13 – Resultado comparativo intragrupo da evolução da área da lesão (cm <sup>2</sup> ) durante os dias de avaliação.....	56
Figura 14 – Resultado comparativo intergrupo da taxa de redução da área da lesão (%) entre o D0 e D3, D0 e D7 e D0 e D14.....	57
Figura 15 – Fotomicrografias com aumento de 500x corados em HE demonstrando a proliferação de neutrófilos (seta preta), vasos sanguíneos (seta vermelha) e fibroblastos (seta branca).....	59
Figura 16 – Resultado comparativo intergrupos do número de neutrófilos de acordo com dias de avaliação.....	61
Figura 17 – Resultado comparativo intragrupo da evolução do número de neutrófilos durante os dias de avaliação.....	63
Figura 18 – Resultado comparativo intergrupos do número de vasos sanguíneos de acordo com dias de avaliação.....	64
Figura 19 – Resultado comparativo intragrupo da evolução do número de vasos sanguíneos durante os dias de avaliação.....	66

Figura 20 – Resultado comparativo intergrupos do número de fibroblastos de acordo com dias de avaliação.....	67
Figura 21 – Resultado comparativo intragrupo da evolução do número de fibroblasto durante os dias de avaliação.....	69
Figura 22 – Fotomicrografias com aumento de 500x corados em PSR demonstrando as fibras colágenas sob luz polarizada.....	70
Figura 23 – Resultado comparativo intergrupos da porcentagem de colágeno total de acordo com dias de avaliação.....	72
Figura 24 – Resultado comparativo intragrupo da evolução da porcentagem de colágeno total durante os dias de avaliação.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da oleorresina da <i>C. reticulata</i> Ducke.....	46
Tabela 2 – Resultado da toxicidade dérmica com teste de uma única aplicação.....	49
Tabela 3 – Resultado da toxicidade dérmica com teste adaptado para doses repetidas.....	50
Tabela 4 – Resultado da média da toxicidade dérmica com doses repetidas.....	51
Tabela 5 – Resultados da estatística descritiva e normalidade das áreas da lesão (cm <sup>2</sup> ).....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FLONA	Floresta Nacional do Tapajós
GC	Grupo Controle
GF	Grupo Fotobiomodulação
GFP	Grupo Fotobiomodulação e Pomada
GP	Grupo Pomada
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IR	Índice de retenção
LTBI	Laserterapia de Baixa Intensidade
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PSR	Picrosirius Red
PDFG	Fator de crescimento derivado de plaquetas
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- $\alpha$	Fator de crescimento transformador $\alpha$
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
UEPA	Universidade do Estado do Pará
UFOPA	Universidade Federal do Oeste do Pará
VEFG	Fator de crescimento de endotélio vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>18</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Fotobiomodulação Laser</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Copaíba – <i>Copaifera Reticulata</i> Ducke</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Uso de Plantas Medicinais</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Toxicidade das Plantas Medicinais</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Úlceras</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Pele</b>	<b>26</b>
3.6.1 Epiderme	26
3.6.2 Derme	27
<b>3.7 Fases da Cicatrização</b>	<b>28</b>
3.7.1 Fase Inflamatória	28
3.7.2 Fase Proliferativa	29
3.7.3 Fase de Remodelação	31
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Local e Período</b>	<b>32</b>
<b>4.2 Coleta do Material Botânico</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Caracterização Química</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Formulação em Pomada de <i>C. Reticulata</i> Ducke</b>	<b>35</b>
<b>4.5 Princípios Éticos da Pesquisa</b>	<b>36</b>
<b>4.6 Toxicidade – Teste de Irritação/Corrosão Dérmica</b>	<b>37</b>
<b>4.7 Animais e Manejo</b>	<b>38</b>
<b>4.8 Anestesia e preparo da pele</b>	<b>39</b>
<b>4.9 Delineamento</b>	<b>40</b>
<b>4.10 Tratamentos</b>	<b>41</b>
<b>4.11 Eutanásia dos animais</b>	<b>42</b>
<b>4.12 Métodos de Análise</b>	<b>42</b>

4.12.1 Avaliação Macroscópica	42
<b>4.13 Análise Histopatológica</b>	<b>43</b>
4.13.1 Avaliação Microscópica	43
4.13.2 Análise por Hematoxilina-Eosina	43
4.13.3 Análise por Picrosirius Red	44
<b>4.14 Análise dos Resultados</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>5.1 Composição Química da oleorresina <i>Copaifera Reticulata</i></b>	<b>46</b>
<b>5.2 Análise do Teste de Irritação/Corrosão Dérmica</b>	<b>48</b>
<b>5.3 Análise Macroscópica</b>	<b>51</b>
<b>5.4 Análise Microscópica</b>	<b>58</b>
5.4.1 Análise da contagem de neutrófilos em HE	58
5.4.2 Análise da contagem de vasos sanguíneos em HE	63
5.4.3 Análise da contagem de fibroblastos em HE	66
5.4.4 Análise do colágeno total em PSR	69
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>76</b>



## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as feridas são consideradas um problema sério de saúde pública, em consequência do elevado quantitativo de pessoas que apresentam essas alterações na integridade do tecido epitelial. A taxa elevada de indivíduos com úlceras, colabora para sobrecarregar o gasto público e afeta a qualidade de vida da população, provocando impactos sociais, psíquicos e econômicos (BRASIL, 2008; SILVA; CROSSETTI, 2012). Quando elas são acompanhadas de infecção do sítio cirúrgico, considerada pela Agência Nacional de Vigilância em Saúde (2013), a terceira maior ocorrência entre as infecções nos serviços de saúde (14% a 16% dos casos), ou ainda, de doenças metabólicas e disfunções endoteliais, apresentam dificuldade no processo de cicatrização (KOLLURU; BIR; KEVIL, 2012).

De acordo com Carvalho e Borges (2011), a cicatrização é um processo complexo que abrange atividade celular e quimiotóxica, compondo uma sucessão de eventos que resultam na oclusão total da lesão na derme. Porém, alterações durante o processo de cicatrização são causadoras de uma síntese de colágeno reduzida, e ainda, colaboram com a elevação dos riscos de infecção e o tempo de reparo do tecido.

Apesar de grandes avanços na área, ainda é limitado o tratamento de feridas crônicas, já que embora haja formas terapêuticas como a limpeza, debridamento, antibióticos e agentes cicatrizantes – extrato de camomila, mel, babosa e outros –, o custo proibitivo e a eficácia limitada dessas técnicas continuam a impulsionar buscas por diferentes opções de tratamento que sejam capazes de melhorar os resultados obtidos nesses protocolos (HARDING; MORRIS; PATEL, 2002).

Dentro da fisioterapia diversos recursos estão sendo usados para promover melhora da qualidade e aceleração do processo de reparo, agindo sobre a série de acontecimentos fisiológicos e bioquímicos provocados por esse processo. Entre os recursos utilizados para estimulação de tais fatores, encontra-se o laser (BRASILEIRO FILHO, 2013).

Considerado um fotobiomodulador, o uso do laser de baixa intensidade tem sido destaque por promover a redução do tempo de remodelação e melhorar a qualidade da formação do novo tecido. Este recurso, que tem por objetivo fotoativar

os mecanismos celulares através da absorção de energia, estimula uma sequência de eventos bioquímicos, gerando como resultado uma atividade enzimática elevada, formação de adenosina trifosfato (ATP), síntese de proteínas, proliferação celular, depósito e organização do colágeno, gerando analgesia, diminuição de edema e tempo do processo de reparo (AYYILDIZ; EMIR; SAHIN, 2015; GARCEZ; RIBEIRO; NUNEZ, 2012; ROCHA, 2004).

Outra forma de tratamento alternativo são as plantas medicinais, utilizadas desde a antiguidade como tratamento para distúrbios e afecções de pele, que envolvem feridas crônicas e queimaduras. Cada vez mais valorizado o uso de plantas medicinais, a região Amazônica têm sido foco de interesse nessa área por sua diversidade de recursos naturais e potenciais fármacos. Dentre essas plantas, destaca-se a copaíba, utilizada pelos nativos da região há séculos, que produz uma oleorresina, considerada como anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, analgésica e cicatrizante. Composta por sesquiterpenos e diterpenos, promovem a ação cicatrizante devido às propriedades antimicrobianas, adstringentes e principalmente anti-inflamatória desses elementos (KOKANE et al., 2009; LEANDRO et al., 2012; MASSON-MEYERS et al., 2013b, NOGUEIRA NETO et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

No entanto, quando falada sobre a utilização associada da fotobiomodulação e da oleorresina de copaíba ainda são incipientes as pesquisas realizadas nessa vertente, não havendo ainda em relação a espécie *Copaifera reticulata* Ducke. Para tanto, tendo em vista os fatores acima citados sobre o óleo de copaíba e a laserterapia na cicatrização de feridas, este estudo pretende demonstrar se os efeitos gerados pela associação de tais terapias são mais vantajosos quando comparadas isoladamente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral:

- Avaliar o efeito da associação da fotobiomodulação (660nm) e óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) em pomada na cicatrização de feridas em ratos.

### 2.2 Objetivos Específicos:

- Realizar caracterização química da oleorresina de copaíba;
- Avaliar a toxicidade dérmica do óleo de copaíba *in natura* e em pomada;
- Realizar avaliação macroscópica das lesões, dos ratos tratados com fotobiomodulação (660nm) e óleo de copaíba (*C. reticulata* Ducke) em pomada;
- Avaliar os efeitos da utilização da fotobiomodulação e do óleo de copaíba em pomada nos aspectos histológicos de reparação tecidual;
- Comparar os efeitos apresentados no processo de cicatrização de feridas com ambas as terapias.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Fotobiomodulação Laser

Em inglês, a palavra laser significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que traduzida para o português significa amplificação de luz por uma emissão estimulada de radiação. Estudado desde 1917, quando Albert Einstein propôs a teoria da emissão estimulada, as propriedades terapêuticas do laser foram sugeridas por dois cientistas americanos em 1957, pela primeira vez, Charles Townes e Arthur Achawlow, concretizando-se em 1960, com a criação por Theodore Maiman, do primeiro emissor de laser à Rubi (HENRIQUE; CAZAL; CASTRO, 2010).

Os aparelhos de laser usados em terapia produzem radiação diferente daquelas produzidas por outras fontes em três fatores: monocromaticidade, definida como a capacidade de cada meio produzir apenas um comprimento de onda; coerência, que diz respeito à organização perfeita em relação à movimentação ordenada de suas ondas que oscilam de forma uniforme, isto é, a coerência espacial das ondas, estando todas na mesma fase promove a permanência da potência luminosa do feixe graças a ausência de interferência entre os raios; e colimação, tal fato proporciona o direcionamento para um ponto específico quase sem dispersão, viabilizando o foco em diâmetros bem pequenos (AGNE, 2005; BAGNATO; PAOLILLO, 2014).

O laser pode ser classificado de duas formas: *power laser* (alta intensidade) – possui efeitos térmicos e extremamente abrasivo, por isso, usado em procedimentos cirúrgicos –, e *soft laser* (baixa intensidade) – possui efeitos terapêuticos e anti-inflamatórios, seus efeitos são produzidos a partir da conversão de energia luminosa, formada no aparelho, em química, sendo depositada nos tecidos biológicos (CAVALCANTI et al., 2011; PIERI, 2009).

O laser apresenta efeitos primários e secundários quando são absorvidos pelos tecidos. Dentre os efeitos primários produzidos pela fotobiomodulação está o bioquímico, com o aumento da produção de ATP, que ocorre quando a luz vermelha é absorvida pelos cromóforos mitocondriais, especialmente o Citocromo C Oxidase (CCO) agindo como um fotorreceptor; o bioelétrico, no qual compreende a melhora no

funcionamento de proteínas de membranas da ação da bomba de sódio e potássio (mantém o potencial de membrana celular) ocasionada pela elevação da formação de ATP; e o bioenergético, no qual ocorre a normalização bioenergética do bioplasma (BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005; FREITAS et al., 2013; LEAL; BEZERRA; LEMOS, 2012; MASSAHUD JUNIOR; SALOMÉ; FERREIRA, 2017; KARU; PYATIBRAT; KALENDU, 2004)

Os efeitos primários geram ainda ação à nível celular possibilitando os seguintes resultados secundários: elevação da taxa de metabolismo, podendo também aumentar o processo proliferativo, maturativo e de locomoção de fibroblastos e linfócitos, potencializar a reabsorção de fibrina, elevar a quantidade de tecido de granulação e reduzir a quantidade de mediadores inflamatórios que são liberados, otimizando o processo de cicatrização, apresentando então, ação anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante (BOURGUIGNON-FILHO et al., 2005; GUIRRO; GUIRRO, 2004; SILVA; HAIDAR; MUSSKOPF, 1998).

### **3.2 Copaíba – *Copaifera reticulata* Ducke**

Consideradas árvores nativas da América Latina e da África Ocidental, as copaiberas também podem ser encontradas no Brasil, nas regiões do Centro-Oeste e Amazônica. Essas árvores têm crescimento lento, atingem uma altura entre 25 e 40 metros, chegando a viver cerca de 400 anos. Esta planta possui a seguinte classificação botânica: pertencente à família *Fabaceae*, subfamília *Detarioideae*, gênero *Copaifera*. Possui 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas no Brasil (AZANI et al., 2017; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

**Figura 1** – Árvore de copaíba *s.p.*



**Fonte:** Autora (2019).

O nome copaíba é originário do tupi *cupa-yba*, que quer dizer árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão ao óleo que possui em seu interior. Chamada de copaíba ou *copahu* pelos indígenas, o óleo da copaíba era bastante utilizado entre os índios quando os portugueses chegaram ao Brasil. Tudo indica que o uso desse óleo veio da observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, esfregavam-se nos troncos das copaibeiras. Os indígenas o utilizavam principalmente como cicatrizante e no umbigo de recém-nascidos para evitar o mal-dos-sete-dias. Os guerreiros quando voltavam de suas lutas untavam o corpo com o óleo da copaíba e se deitavam sobre esteiras suspensas e aquecidas para curar eventuais ferimentos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Da árvore da copaíba é extraído o seu óleo, que pode variar sua cor do amarelo ouro a marrom, dependendo da espécie. Seu óleo é chamado de maneira popular como bálsamo de copaíba, mas a designação correta é oleorresina, já que o mesmo é um exsudato formado por ácidos resinosos e compostos voláteis (RIGAMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A oleorresina é obtido através da perfuração no tronco da copaibeira, proveniente de canais secretores encontrados principalmente no tronco da árvore. Esses canais são formados pela dilatação de espaços intercelulares, chamados meatos, que se comunicam entre si no meristema, denominados canais

esquizógenos. Para a extração desse óleo é necessária a utilização de uma prática não agressiva e sustentável, em que consiste na perfuração da árvore em dois locais em direção ao centro do tronco, com alturas aproximadas de 1 m a 1,50m, realizadas com a ajuda de um trado tradicional com 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento. Serão então colocados nos dois locais de furo um cano de PVC com  $\frac{3}{4}$  de diâmetro e 10 cm de comprimento, para impedir possíveis resquícios de madeira e auxiliar em próximas coletas (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOHGBI, 2006).

**Figura 2** – Extração da oleoresina de copaíba.



**Fonte:** Autora (2019).

Em relação à sua composição, o óleo de copaíba é formado por duas partes, uma resina líquida dita de diterpenos, sendo os mais encontrados o: ácido copaífero ou copaiférico, ácido hardwickico, colavenol, ácido calavênico, ácido copálico, entre outros, e uma fração volátil, em que é composta por sesquiterpenos, entre os mais principais estão o  $\beta$ -bisaboleno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$  e  $\beta$ -selineno e  $\alpha$ -humuleno, que possuem propriedades comprovadas de anti-inflamatório, antibactericida, antiedêmico e antifúngico (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009).

Segundo Rigamonte-Azevedo et al. (2006), o óleo extraído pode apresentar variação em relação à natureza e concentração dos sesquiterpenos e diterpenos

presentes de acordo com variações de espécies, fatores biológicos como fungos e insetos, ou fatores abióticos. Porém, apesar de apresentarem diferenças nesses elementos, na composição da oleorresina, somente essas duas classes de substâncias podem estar presentes (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Indicada para diversas finalidades, a oleorresina da copaíba, tem sido há muitos anos objeto de estudo, com o objetivo de comprovar suas indicações ou adaptá-las a terapêuticas novas, entre elas, sua ação cicatrizante vem ganhando destaque (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Em estudo realizado por Paiva et al. (2002), que buscaram verificar a atividade cicatrizante da oleorresina de *Copaifera langsdorffi*, através da observação da contração das feridas excisadas e em feridas por incisão em ratos, em que mediram a resistência à tração, o uso tópico da mesma promoveu uma aceleração na contração do ferimento, apontando seu efeito benéfico na cicatrização de feridas.

### **3.3 Uso de Plantas Medicinais**

O Brasil possui um terço da flora mundial, comportando a maior reserva de produtos naturais do planeta. A crença popular brasileira, muito forte em benzedeadas e curandeiras, transmitida de geração em geração, preservou a utilização de plantas medicinais no país, especialmente nas áreas mais afastadas do centro urbano, e na região amazônica (FRANÇA et al., 2008; SANTOS; DIAS; MARTINS, 1995; YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS (1998), a planta medicinal é considerada como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. O uso desse produto, considerado não convencional na saúde, está crescendo de forma a complementar aos medicamentos alopáticos (ALMEIDA, 2011; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

Em decorrência do consumo crescente desses recursos, em sua grande parte, sem regulamentação, a OMS aconselha que exista uma ligação entre a medicina científica e a medicina tradicional empírica, uma vez que as observações populares acerca do uso e eficácia das plantas medicinais colaboram de forma significativa para



a divulgação e pesquisas a respeito de suas propriedades medicinais (ALMEIDA, 2011; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

A OMS tem mostrado interesse para com a valorização do uso de plantas medicinais. No Brasil, a sua utilização foi institucionalizada no Sistema Único de Saúde (SUS), por meio da Portaria Nº 971/2006, pela Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (BRASIL, 2006). E no campo da Fisioterapia, a utilização pelos fisioterapeutas das práticas integrativas e complementares de saúde foi regulamentada pelo Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional, segundo a portaria do Ministério da Saúde por meio da Resolução COFFITO nº380/2010 (COFFITO, 2010).

### **3.4 Toxicidade das Plantas Medicinais**

Existe a crença que a utilização de produtos naturais é totalmente segura e eficaz, porém, sabe-se que diversas plantas usadas com finalidade medicinal demonstram um potencial risco tóxico decorrente da presença de substâncias agressivas (LIMA, 2014; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Inúmeros produtos, no Brasil, são comercializados em mercados e feira de forma livre, comumente sem regulamentação ou fiscalização, e pesquisas voltadas para a utilização segura de plantas medicinais ainda são escassos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005).

A utilização das plantas medicinais sem cautela e acompanhamento podem provocar reações por meio de causas intrínsecas e extrínsecas, sendo as primeiras: overdose, toxicidade, interação medicamentosa e alergias; e as outras: contaminação, adulteração, preparo e estocagem de maneira errada (FERREIRA et al., 2013; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

A toxicidade é considerada como um potencial que uma substância possui de produzir um estado patológico depois de ser inserida e interagir com o organismo, sendo formada de maneira aguda ou crônica. Frequentemente interligada à utilização de substâncias terapêuticas por meio da administração através da via oral, o potencial de toxicidade, pode provocar como efeitos colaterais a diarreia, sialorréia, irritação gastrointestinal e depressão do sistema nervoso. Quando verificado por via tópica, que tem como objetivo uma ação local, também pode provocar efeitos indesejáveis,

entre eles, o dano celular e irritação da pele, fazendo-se necessário a verificação do potencial irritante também, dos produtos antecipadamente ao seu uso (LIMA, 2014; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

Portanto, para que seja realizada a venda e o uso de forma adequada de produtos naturais, é essencial testes que identifiquem os princípios ativos que produzem os efeitos biológicos e testes para analisar a toxicidade aguda, com o objetivo de especificar as substâncias segundo o seu potencial tóxico ou letal (LIMA et al., 2011).

### **3.5 Úlceras**

As úlceras são caracterizadas por interrupção de continuidade do tecido cutâneo, de forma aguda ou crônica, afetando tecidos superficiais, como a epiderme, podendo chegar até os mais profundos, como os músculos e ossos (BRASIL, 2008).

A gravidade de uma úlcera é classificada de acordo com a sua profundidade, em relação à extensão da parede de tecido atingida. Sua presença pode favorecer o surgimento de complicações como osteomielite, septicemia e pode ainda levar à morte do paciente. A etiologia das úlceras é diversa, podendo ser provocadas por pressão tecidual prolongada, distúrbios vasculares, traumas e outros (NOGUEIRA; CALIRI; SANTOS, 2002).

Alguns fatores podem interferir na cicatrização das úlceras, entre eles: a pressão contínua em locais de proeminências ósseas, que provocam a redução do suprimento sanguíneo, impossibilitando o mesmo chegue aos tecidos, e a infecção, que prolonga a cicatrização, as atividades dos fibroblastos são inibidas na formação de colágeno e ainda estimula liberação de enzimas pelos leucócitos que degradam o colágeno. Além disso, os microrganismos invasores retêm o oxigênio e os nutrientes essenciais para o processo cicatricial (BRASIL, 2008; HESS; SANTOS; SOUZA, 2002).

Consideradas uma importante intercorrência à saúde humana, elas carregam consigo consequências sociais, psíquicas e financeira para o portador e sua família, afetando a sua qualidade de vida e impedindo sua recuperação (NOGUEIRA; CALIRI; SANTOS, 2002).

### 3.6 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo considerada uma estrutura tegumentar e sua extensão atinge cerca de 16 % do peso corporal. Ela possui função de revestimento, agindo entre o ambiente interno e externo como barreira mecânica. Ou seja, a pele exerce inúmeras funções essenciais para a permanência da fisiologia, realizando a proteção do organismo contra perda de água e ainda, a defesa contra a entrada de fatores externos, lesões microbiológicas, físicas ou químicas (BORGES, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Em geral, a pele possui em sua estrutura elementos similares em todos os mamíferos, como: epitélio queratinizado, podendo haver ainda, a presença de pelos, glândulas sudoríparas, sebáceas e mamárias e unhas. Histologicamente, a pele é composta basicamente por duas camadas, a epiderme – camada mais superficial, constituída por tecido epitelial – e a derme – mais internalizada, constituída por tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

#### 3.6.1 Epiderme

Constituída por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, a epiderme é uma estrutura avascular que forma a camada mais superficial da pele. Seu tecido é considerado estratificado por possuir muitas camadas de células, e ainda, pavimentoso, pela camada mais externa ser constituída de células achatadas. As células mais prevalentes nesse epitélio são os queratinócitos, outras células também podem ser encontradas, como os melanócitos, as células de Langerhans e de Merkel (LUCAS, 2004; SCANLON; SANDERS, 2007).

Em regiões mais espessas, a epiderme pode apresentar cinco camadas, denominadas da derme para fora: estrato basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo. Também chamado de estrato germinativo, a camada basal é o mais internalizado e responsável pela renovação constante da epiderme, possui um único cordão celular que se reproduz de forma contínua. As células novas reproduzidas

guiam as anteriormente sintetizadas à superfície corpórea, formando os estratos epidérmicos subsequentes (SAMUELSON, 2007).

Os queratinócitos, à medida que seguem em direção à superfície, passam por um processo chamado de queratinização ou corneificação para formar o estrato córneo. No interior dessas células, é realizada a síntese de uma proteína fibrosa resistente, de elevado peso molecular e impermeável chamada de queratina, que possui ação impermeabilizante, gerando uma barreira mecânica para que não ocorra dessecação do organismo. O processo de renovação constante das células da epiderme promove a retirada e substituição de células mortas carregadas de queratina, do estrato córneo, por outras células que passarão pelo mesmo processo (LUCAS, 2004).

### 3.6.2 Derme

Constituída por tecido conjuntivo, não especializado, encontrada na região mais interna do órgão. Essa camada é a porção vascular da pele que promove sustentação à epiderme e ainda, vitalidade tecidual. A derme é composta basicamente por células, matriz extracelular e fibras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O elemento celular mais prevalente é a célula responsável pela síntese de fibras e proteica que compõem a matriz extracelular. Tal célula é denominada fibroblasto quando está realizando atividade sintetizadora e de fibrócito em estado de repouso. Fusiforme, de tamanho menor, com poucos prolongamentos citoplasmáticos, o fibroblasto possui um núcleo de tamanho menor e mais escuro. Quando ocorre a lesão, o fibrócito se transforma em fibroblasto e realiza a síntese de fibras e elementos da matriz extracelular mais uma vez no decorrer do processo de reparação do tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; LUCAS, 2004).

Outra célula também encontrada durante o processo de reparação tecidual é o miofibroblasto. Ela possui a morfologia de um fibroblasto, porém com maior número de actina e miosina, com características funcionais intermediárias entre uma célula muscular lisa e um fibroblasto, ajudando no processo de contração das lesões (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SAMUELSON, 2007).

### 3.7 Fases da Cicatrização

#### 3.7.1 Fase Inflamatória

A lesão tecidual ocasiona a descontinuidade dos vasos sanguíneos e o extravasamento de componentes sanguíneos. Logo depois da lesão tecidual acontece como resposta primária a vasoconstrição periférica, que é provocado por influência nervosa, através de descarga adrenérgica, e por ação de mediadores provenientes da degranulação de mastócitos, objetivando a redução da perda de sangue no espaço extravascular (DAI et al., 2009; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; SHEN et al., 2008).

A agregação de plaquetas e a coagulação sanguínea produzem um tampão, abundante de fibrina, que possui o papel de restabelecer a hemostasia, criar uma barreira para combater microrganismos e, além disso, promover a organização de uma matriz extracelular provisória, fundamental para a migração celular, em essencial o recrutamento de neutrófilos. Essa matriz é um reservatório de citocinas e fatores de crescimento que depois serão lançados nas fases subsequentes do processo de cicatrização (LIU et al., 2010; SUNG et al., 2010).

Importantes na produção do tampão hemostático, as plaquetas também são responsáveis por secretar múltiplos mediadores, entre eles os fatores de crescimento, que são liberados na região da lesão. Instigadas pela trombina, as plaquetas passam ainda por degranulação e muitos fatores de crescimento são liberados, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDFG), o de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o de crescimento epidérmico (EGF), o de crescimento transformador  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) e o de crescimento de endotélio vascular (VEFG). Além deles, glicoproteínas adesivas – fibronectina e trombospondina –, também são liberadas e considerados integrantes essenciais da matriz extracelular provisória. E ainda, o início da cascata de coagulação e do complemento, acompanhado da liberação dos fatores de crescimento e também da ativação de células parenquimatosas devido à lesão, formam muitos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que ajudam a recrutar células inflamatórias para o local da lesão (CAETANO, 2012; LIU et al., 2010).

Quando as plaquetas saem do interior do leito vascular, neutrófilos e monócitos deslocam-se em direção ao leito da ferida, por influência dos agentes quimiotáticos. As células inflamatórias têm como função a fagocitose de corpos estranhos, de bactérias e fragmentos celulares, e ainda, a formação de fatores de crescimento, que realizam a preparação do ferimento para a fase seguinte, a proliferativa, na qual ocorrerá o recrutamento dos fibroblastos e células endoteliais (DAI et al., 2009; FONG; WOOD, 2006; LIU et al., 2010; PARK; BARBUL, 2004; SINGER; CLARK, 1999).

No início e no decorrer do processo de cicatrização, os monócitos do sangue periférico continuam a entrar no local da ferida de forma incessante devido à estímulos de agentes quimiotáticos, como o PDGF. Os monócitos são ativados e se transformam em macrófagos por contribuição de alguns fatores, como a liberação de fatores plaquetários e a fagocitose dos componentes celulares – colágeno ou fibronectina (CAETANO, 2012; SINGER; CLARK, 1999).

O macrófago ativado atua na degradação e retirada de elementos lesados do tecido conjuntivo, como o colágeno, a elastina e proteoglicanas. Os macrófagos atuam ainda na secreção de fatores quimiotáticos que causam atração de outras células inflamatórias para a região da ferida e formam prostaglandinas, que atuam como poderosos vasodilatadores atingindo a permeabilidade dos microvasos. Além disso, os macrófagos são produtores de alguns fatores de crescimento, entre eles o PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que são evidenciados como citocinas primordiais para incentivar a produção do tecido de granulação (DAI et al., 2009; SINGER; CLARK, 1999).

### 3.7.2 Fase Proliferativa

A atividade metabólica durante essa fase é intensa, e é nela em que ocorre o processo de fechamento da lesão. A reepitelização é iniciada horas depois da lesão, sendo que a presença de fibroblastos e células epiteliais é muito maior nesse período. Ademais, os macrófagos e os fibroblastos interagem entre si, colaborando com a formação de colágeno (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; SCHREML et al., 2010; SURVANA; MURINA, 2013).

A fase de proliferação epitelial é iniciada por ação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos, através de estimulação do TGF- $\alpha$  e do EGF, em que ocorre a migração das células epiteliais vindas da margem e de apêndices epidérmicos situados no meio da lesão. As citocinas inflamatórias que participam desse processo são interleucina (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que são formadas através da ativação plaquetária e dos macrófagos (FRADE, 2003; JANIS; KWON; LALONDE, 2010).

A fibroplasia e angiogênese, formam o tecido de granulação que tem como função ocupar o local em que ocorreu a lesão aproximadamente quatro dias depois do dano no tecido. Este tecido é assim chamado principalmente pela característica granular graças à presença de capilares neoformados fundamentais no processo de reparação. Os fibroblastos formam a nova matriz extracelular fundamental para o crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos provêm tanto o oxigênio quanto os nutrientes precisos para o metabolismo celular local (BATES; HARPER, 2002; DVORAK, 2002).

O VEGF sensibiliza as células endoteliais encontradas nas veias intactas para começar a produção de capilares novos. A vasculogênese é denominado como a etapa inicial para o desenvolvimento dos vasos. As células anteriores às do endotélio vascular passam por diferenciação, expansão e coalescência, para então produzirem no organismo uma rede de túbulos primitivos (DVORAK, 2002; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Como consequência da lesão no tecido, são liberados sinais químicos advindos da matriz e do plasma que levam à ação do FGF e do VEGF na angiogênese, na qual os macrófagos e células endoteliais são considerados indutores diretos dos fatores de crescimento. Ainda estão presentes nesse processo mais algumas moléculas angiogênicas, como TGF- $\alpha$ , angiotropina, angiogenina e angiopoietina 1. Pressões baixas de oxigênio e elevada concentração de lactato levam à formação de fatores angiogênicos resultando na criação de novos capilares (DETMAR et al., 1998; JANIS; KWON; LALONDE, 2010).

A matriz extracelular é formada no tecido de granulação e na membrana endotelial basal por substâncias como o colágeno, fibronectina, vibronectina, entre outros, e ainda, por proteínas formadas por fibroblastos. A matriz realiza assistência

para o migramento celular e possui como função ser um reservatório e modular a liberação de fatores de crescimento. Para a realização da angiogênese também são precisas a expressão e a ativação de proteases, sobretudo na fase de remodelação (JANIS; KWON; LALONDE, 2010).

A matriz extracelular lesada é retirada pelas metaloproteinases da mesma, expressas através de fibroblastos, queratinócitos, monócitos e macrófagos, como resultado de estímulo do TNF- $\alpha$ , levando à entrada de vasos novos. Como efeito, ocorre uma elevação da pressão de oxigênio, diminuindo os elementos responsáveis pela angiogênese, os vasos desnecessários sofrem apoptose (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

No interior da matriz extracelular provisória são secretados pelos fibroblastos o colágeno tipo III, compostos por fibras imaturas e desorganizadas. Ao mesmo tempo, os fibroblastos se transformam em miofibroblastos e atuam na contração da ferida, que prossegue na fase de remodelação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; JANIS; KWON; LALONDE, 2010).

### 3.7.3 Fase de Remodelação

Na fase de remodelação acontece a busca da recuperação da estrutura normal do tecido através da colocação de colágeno em redes organizadas. A maturação de elementos e modificações na matriz extracelular facilitam o depósito de colágeno e proteoglicanos. Entre as citocinas participantes nessa fase, as principais são TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PDGF e TGF- $\beta$  (DAI et al., 2009; KARUKONDA et al., 2000).

O colágeno produzido pelos fibroblastos passa a apresentar fibras organizadas e fortes, sendo este o colágeno tipo I. Este, está presente em 80 a 90% da pele íntegra, já o colágeno do tipo III, com 10 a 20% presente. No tecido de granulação, o tipo III encontra-se presente em 30% do mesmo (JANIS; KWON; LALONDE, 2010).

Durante o processo de maturação e remodelagem, grande parte dos vasos, células inflamatórias e fibroblastos somem do local da lesão, por meio do processo de emigração, apoptose ou diferentes mecanismos de morte celular (MENDONÇA; COUTINHO NETO, 2009).



Os queratinócitos se deslocam da margem da ferida e são regulados por três principais agentes: fatores de crescimento, integrinas e metaloproteinases. Na fase inflamatória ainda, os queratinócitos de periferia são ativados por meio do funcionamento de fatores de crescimento, fibroblastos, macrófagos e neutrófilos. Entre os fatores de crescimento, os principais são o PDGF, que provoca a proliferação de fibroblastos resultando na formação da matriz extracelular no momento do processo de reorganização da matriz e contração da ferida, o fator de crescimento para queratinócitos (KGF<sub>7</sub>), o principal responsável pela regulação da proliferação dos queratinócitos, e o TGF- $\beta$ , fator que dará um estímulo inicial para o processo migracionário das células epiteliais. Os queratinócitos ativam os receptores de integrina promovendo uma interação com diversas proteínas encontradas na matriz extracelular, tanto no leito, quanto na margem da ferida. A expressão e ativação de metaloproteinases, por outro lado, propiciam a degradação e mudança das proteínas da matriz no local da lesão, favorecendo a migração celular. Fatores de crescimento associados à matriz extracelular podem ser liberados pela ação proteolítica dessas enzimas, de maneira a preservar a estimulação constante para a proliferação e processo migracionário dos queratinócitos, agilizando a reepitelização (SANTORO; GAUDINO, 2005; SUNG et al., 2010).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Local e Período**

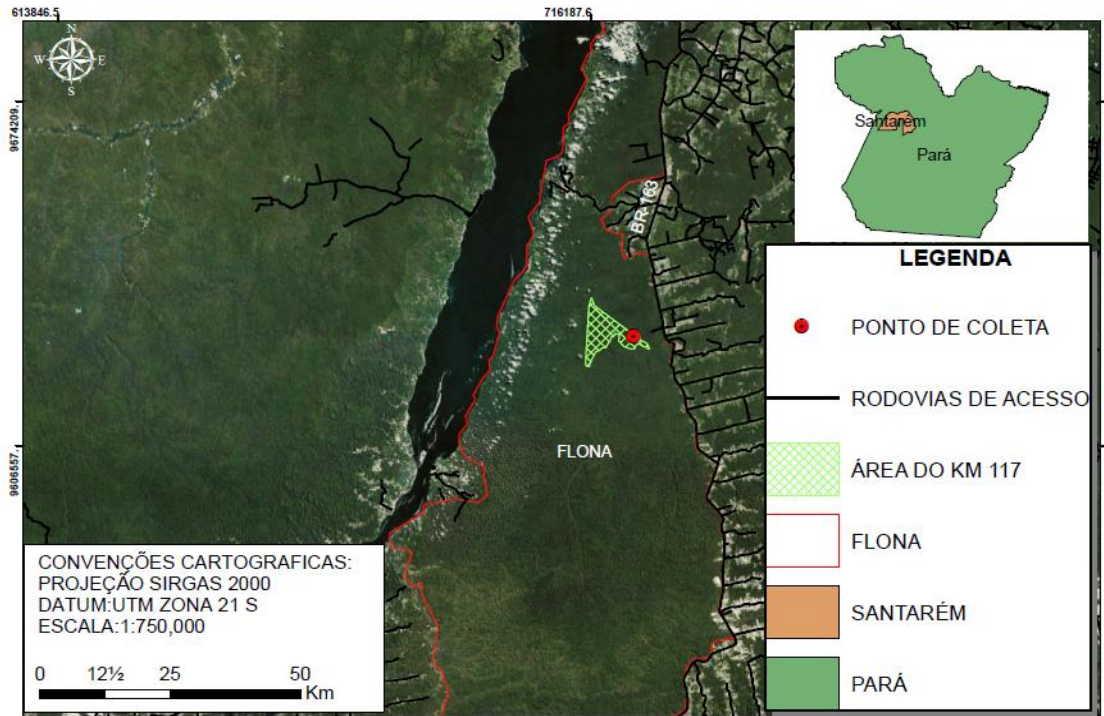
A pesquisa foi realizada no Biotério da Universidade do Estado do Pará (UEPA) em Santarém/PA, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Laboratório de Morfofisiologia Animal e no Laboratório de Mineralogia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), entre maio de 2019 e outubro de 2020.

### **4.2 Coleta do Material Botânico**

A oleorresina da *Copaifera reticulata* foi coletada na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no município de Belterra-PA, no km 117 da rodovia BR-

163, (S 03° 20' 49,2'' e W 55° 01' 13,5''), no mês de setembro de 2016, durante o período seco (MORAES et al., 2005).

**Figura 3** – Local da coleta na FLONA.



**Fonte:** Almeida (2019).

Para a coleta da oleorresina da copaíba, a árvore foi perfurada em dois locais em direção ao centro do tronco, com alturas aproximadas de 1 m a 1,50m, realizadas com a ajuda de um trado tradicional com 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento. Foram então colocados nos dois locais de furo um cano de PVC com  $\frac{3}{4}$  de diâmetro e 10 cm de comprimento, para impedir possíveis resquícios de madeira e auxiliar em próximas coletas.

Utilizando-se uma calha metálica, o óleo foi coletado e acondicionado em recipientes plásticos com lâminas de alumínio para proteção à luz, e depois, transferidos para frascos de vidro âmbar. Finalizado o procedimento para obtenção do mesmo, os canos foram ocluídos com uma tampa de PVC, para proteção da árvore em combate à possibilidade de infestações provocadas por insetos e fitopatógenos, e ainda, facilitar outras coletas na mesma árvore.

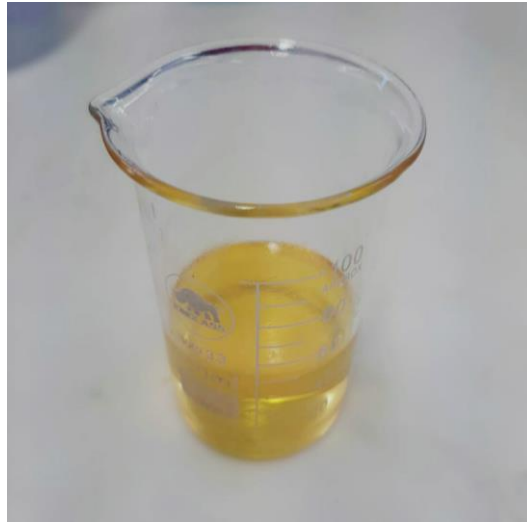
O material então, foi enviado para a Embrapa Amazônia Oriental, para identificação botânica das folhas e frutos.

### 4.3 Caracterização Química

A caracterização química da OR *C. reticulata* Ducke foi realizada pelo Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia, da Universidade Federal do Amazonas, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), operando no sistema Agilent Technologies AutoSystem XL CG-MS funcionando no modo EI a 70 eV, munido de um injetor split/ splitless (250°C). Na linha de transferência a temperatura era de 280°C. Foi utilizado como transportador o gás hélio (1,5 mL/min) e utilizadas as colunas capilares HP 5MS (30m x 0,25mm, espessura de película 0,25 mm) e HP Innowax (30m x 0,32mm i.d., espessura de película 0,50 mm). O volume injetado foi de 1 µL da oleorresina.

Os componentes da oleorresina de *Copaifera reticulata* foram identificados embasados no índice de retenção (IR), verificado com referência das séries homólogas de *n*-alcanos, C7-C30, com condições de experimento iguais com a literatura, através da comparação dos espectros de massa (Adams, 1995) e ainda por meio da correspondência dos espectros de massas com a biblioteca NIST/EPA/NHI. As quantidades relativas dos constituintes individuais foram calculadas de acordo com a área do pico CG.

**Figura 4** – Amostra da oleorresina coletada.



**Fonte:** Autora (2019).

#### **4.4 Formulação em Pomada de *C. Reticulata* Ducke**

A oleorresina foi manipulada para uma formulação em pomada *C. reticulata* a 10%. Esta concentração foi escolhida baseado com o protocolo preconizado no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (2011) demonstrado na figura 5, e ainda, de acordo com os estudos de Estevão et al. (2009) e Masson-Meyeres et al. (2013a), a aplicação em forma de pomada possui vantagens devido à concentração do fármaco ser reduzida e a facilidade em sua administração sem provocar oleosidade excessiva. Tal fator poder ser em decorrência das características físicas da oleorresina, em que a viscosidade do mesmo dificulta o fechamento das feridas, por haver tendência na formação de crostas acentuadas sobre as lesões.

Figura 5 – Formulação da pomada.

---

**POMADA DE *Copaifera langsdorffii* Desf., POMADA DE *C. multijuga* (Hayne) Kuntze, POMADA DE *C. reticulata* Ducke E POMADA DE *C. paupera* (Herzog) Dwyer.**

---

**SINONÍMIA**

*C. nitida* Marr. ex Hayne, *C. sellowii* Hayne (*C. langsdorffii*), *C. langsdorffii* var. *peruviana*, *C. reticulata* var. *peruviana* (*C. paupera*).

**NOMENCLATURA POPULAR**

Copaíba.

**FÓRMULA**

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
óleo-resina de copaíba	10 g
pomada de lanolina e vaselina	100 g

Fonte: Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira, 2011.

Os elementos foram pesados em balança semi analítica, colocados em um gral e com o auxílio de um pistilo misturados até sua homogeneização (Figura 6).

**Figura 6** – Pomada a 10% homogeneizada.



Fonte: Autora (2020).

#### 4.5 Princípios Éticos da Pesquisa

O estudo acatou aos princípios éticos da pesquisa em experimentação animal indicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e legislação nacional para vivisseção animal em vigor na Lei Federal 6.638 de 08 de maio de 1979 e ainda na Lei nº 9.605/98, que fala sobre crimes ambientais. O projeto foi aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará com o protocolo N° 0220200089.

#### **4.6 Toxicidade – Teste de Irritação/Corrosão Dérmica**

Para verificar a toxicidade dérmica da pomada de *C. reticulata* Ducke foram utilizadas as recomendações do protocolo *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) 404/2015, que busca avaliar a irritação e corrosão da pele após a aplicação única de uma substância.

Para este experimento foram utilizados 16 ratas *wistar*, fêmeas, com idade entre 8 e 12 semanas, peso variando entre 200 e 250g. Todos os animais foram submetidos à anestesia com injeção de intraperitoneal de quetamina (0,10ml/100g) e xilazina (0,25ml/100mg). Depois de anestesiados, eles foram colocados em decúbito ventral, e então realizada a tricotomia de 6 cm<sup>2</sup> na região dorsal dos ratos em dois locais, 24 horas antes de aplicar a oleorresina da copaíba, em duas formas, pura e pomada de *C. reticulata* Ducke a 10%, na dose de 0,5ml por animal. A região superior tricotomizada foi utilizada como controle, não havendo aplicação de nenhuma substância, e na região inferior houve aplicação da substância a ser testada.

De acordo com o protocolo do teste, foram formados com apenas um animal grupos experimentais, para a realização da única aplicação da substância e ainda, uma adaptação com grupos experimentais de aplicação com doses repetidas durante 14 dias. Após a aplicação o local foi recoberto por gaze e fita não irritativa. Depois de 4 horas a área foi limpa e toda substância retirada. Se, durante esse período, fosse identificado alguma reação sofrimento ou dor excessiva ao animal, o teste seria imediatamente finalizado. Caso não fosse verificado nenhum sinal de corrosão da pele, se realizaria com mais 3 ratos, o teste de confirmação. A primeira avaliação do aspecto da pele ocorreu logo após a limpeza da área, e então, depois de 1, 24, 48 e 72 horas.

A avaliação dos resultados ocorreu de acordo com a classificação pré-determinada pelo protocolo. Segundo quadros apresentados nas imagens abaixo (Figura 7).

**Figura 7** – Protocolo de classificação do teste. A- Sistema de graduação sobre formação de eritema e escaras; B- Sistema de graduação sobre formação de edema. C- índice geral de classificação do produto.

**A** Formação de eritema e escaras

Lesão	Valor
Sem eritema	0
Eritema leve (apenas perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (vermelho violeta) com escaras	4

Formação de edema

**B**

Lesão	Valor
Sem edema	0
Edema leve (apenas perceptível)	1
Edema bem definido (bordas menores que 1 mm)	2
Edema moderado (bordas de 1 mm)	3
Edema grave (bordas com mais de 1 mm e não restrito às regiões de aplicação)	4

**C**

0,0 – 1,0 = não irritante  
 1,1 – 2,0 = irritante moderado  
 2,1 – 3,0 = irritante grave  
 3,1 – 4,0 = corrosivo

**Fonte:** *Federal Hazardous Substances Act of the USA, 2014.*

Ao final, se a aplicação da oleorresina e/ou da pomada provocar lesões na pele do animal que sejam reversíveis, a mesma seria considerada como uma substância que produz irritação dérmica. Já caso provocasse danos na pele como úlceras, hemorragia e necrose visível através da epiderme e na derme, classificados como irreversíveis, ela seria considerada corrosiva.

#### 4.7 Animais e Manejo

Durante a realização desta pesquisa os animais foram alojados em gaiolas adequadas de polipropileno, com dimensões padronizadas e forradas com maravalha.

Seguindo aos princípios éticos de experimentação animal do COBEA (2006), os animais utilizados nesse estudo passaram por um período mínimo de observação de quinze dias, o necessário para o início de qualquer estudo científico, com o objetivo de propiciar uma adaptação melhor ao ambiente do laboratório. Só tiveram acesso ao mesmo os pesquisadores responsáveis por este estudo e os membros do laboratório, que foi mantido com condições ambientais controladas, 12 horas de ciclo claro-escuro e acesso livre para água e ração industrial específica para ratos, realizando o controle de qualquer variável que pudesse gerar estresse nos animais e interferir no processo de reparo.

Foram utilizados 42 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* e da linhagem Wistar, machos, sadios, adultos, com idade superior à 90 (noventa) dias, pesando entre 250 (duzentas e cinquenta) e 300 (trezentas) gramas. Os animais foram divididos de forma aleatória em grupos formados por sete animais cada (n=7).

#### **4.8 Anestesia e Preparo da Pele**

Todos os animais foram submetidos à anestesia com injeção de intraperitoneal de quetamina (0,10ml/100g) e xilazina (0,25ml/100mg). Depois de anestesiados, eles foram colocados em decúbito ventral, imobilizados em prancha operatória e realizada a retirada dos pêlos na região do dorso em dois locais com aproximadamente 6 cm<sup>2</sup> por tração manual.

Após o procedimento anestésico, com a ajuda de um *punch* metálico de 0,8cm de diâmetro, foi realizado, sem atingir os músculos subjacentes, duas feridas no dorso dos animais, uma superior e outra inferior. A região dorsal foi escolhida para evitar a automutilação ou irritação por contato (KASHYAP; BEEZHOLD; WISEMAN, 1995). A coluna vertebral e as escápulas foram utilizadas como referências anatômicas buscando padronizar o local para a realização da lesão em todos os ratos, como forma de evitar variações na irrigação local sanguínea, o que pode levar à alterações no processo de cicatrização (BEHEREGARAY et al., 2010).



**Figura 8** – Localização das lesões.



**Fonte:** Autora (2020).

#### **4.9 Delineamento**

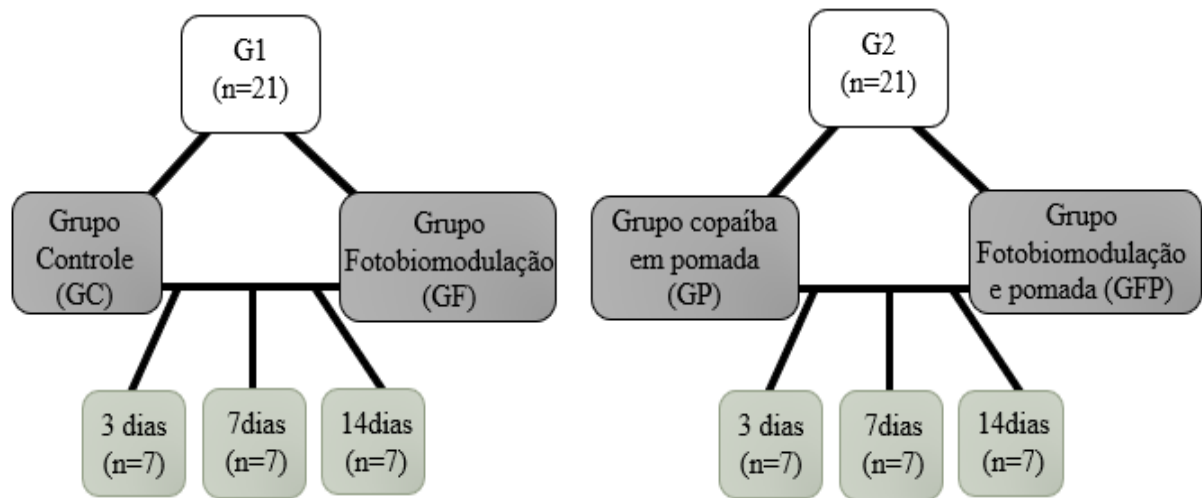
Os animais foram sorteados e distribuídos em dois grupos com 21 animais em cada. Sendo compostos por:

Grupo 1 (G1) - Grupo GC (Grupo Controle, com animais submetidos somente à ferida aberta, utilizando apenas soro fisiológico 0,9% na lesão superior) e grupo GF (Grupo Fotobiomodulação, com animais submetidos à ferida aberta e tratados com caneta laser 660nm, na lesão inferior);

Grupo 2 (G2) - Grupo GP (Grupo Copaíba, com animais submetidos à ferida aberta e tratados com óleo de copaíba, *C. reticulata* Ducke, em pomada, na lesão superior) e grupo GFP (Grupo Fotobiomodulação e Pomada, com animais submetidos à ferida aberta e tratados com laser seguido da pomada, na lesão inferior).

Após um período de 3 dias, sete animais de cada grupo, escolhidos de forma aleatória, foram submetidos à eutanásia, assim como, após 7 e 14 dias de tratamento, de acordo com as fases da cicatrização.

**Figura 9** – Esquema da divisão dos grupos.



Fonte: Autora (2020).

#### 4.10 Tratamentos

Após a realização das feridas, os ratos foram submetidos em intervalos de 24 horas à fotobiomodulação e/ou aplicação da pomada, de acordo com os grupos pré-estabelecidos. A aplicação da laserterapia foi realizada com o aparelho Laserterapia Portátil Recover, da marca MM Opticus (Figura 10), utilizando bico da caneta Laser, com comprimento de onda de 660nm (luz vermelha), potência de 100mW, operando no modo contínuo, com dose de 4J/cm<sup>2</sup> e tempo de aplicação de 40 segundos, definida por Abreu et al. (2011) como a intensidade que promove melhores resultados.

O tratamento iniciou uma hora após a indução da ferida, e se deu de forma pontual, em um único ponto, com a caneta posicionada de forma perpendicular à lesão uma distância de 2mm da pele, com o feixe de luz a superfície da ferida, utilizando-se óculos de segurança.

**Figura 10** – Aparelho Laserterapia Portátil Recover.



Fonte: <mmo.com.br>.

A aplicação da pomada de *C. reticulata* Ducke a 10%, foi realizada de forma tópica, com auxílio de uma seringa de foi colocado 1ml recobrando toda a superfície do ferimento.

#### **4.11 Eutanásia dos Animais**

Todos os animais foram submetidos à eutanásia por meio de injeção intraperitoneal, com a aplicação da combinação de quetamina e xilazina, três vezes a dose necessária para anestesia, nos dias 3, 7 e 14, após o início da pesquisa, para que se pudesse realizar a avaliação do curso da cicatrização.

#### **4.12 Métodos de Análise**

##### **4.12.1 Avaliação Macroscópica**

A avaliação macroscópica da área da lesão consistiu na análise do potencial de contração da ferida, que foi verificado a partir das imagens das feridas obtidas após a lesão, e nos dias 3, 7 e 14, por meio da fotogrametria computadorizada. As imagens foram obtidas por uma câmera fotográfica digital, colocada em uma distância fixa de 20 cm, em plano frontal e com uso de uma régua esterilizável posicionada próxima ao ferimento, para servir como referência na realização da calibração das medidas que foram obtidas para análise pelo software.

As imagens obtidas foram levadas para posterior demarcação da área de retração da lesão e comparação por planimetria digital pelo *software ImageJ*<sup>®</sup>, de domínio público e amplamente empregado em pesquisas para a verificação macroscópica de úlceras (KORELO et al., 2012; MINATEL et al., 2009).

#### **4.13 Análise Histopatológica**

##### **4.13.1 Avaliação Microscópica**

Após eutanásia, foram retirados os fragmentos de tecido da região onde estavam as feridas, com margem de 1 cm de pele íntegra ao redor, para análise histológica. Os fragmentos foram colocados em potes coletores universais cobertos por uma solução de paraformaldeído e enviados para o laboratório para serem submetidas ao processo histológico. Para cada amostra foram feitos cortes semisseriados (5 µm) transversal para realização da avaliação microscópica, corando os fragmentos com Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red. As lâminas foram então avaliadas em microscópio óptico com câmera acoplada marca LEICA DM750P para a realização de fotomicrografias, com objetiva de 50x.

##### **4.13.2 Análise por Hematoxilina-Eosina (HE)**

O fragmento de pele após fixação no paraformaldeído passou por desidratação em banhos crescentes de álcool, em seguida, clarificado em xilol, infiltrado em parafina a 60° e posteriormente os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (5 µm). Depois de realizados os cortes, as lâminas foram desparafinilizadas em xilol,

além de hidratados em banho decrescente de álcool e molhados em Hematoxilina de Mayer e corados em Eosina-Floxina. Em seguida, passaram novamente por desidratação em álcool e foram clarificadas em xilol, para que pudessem ser montadas as lâminas e realizadas a sua análise.

A contagem de neutrófilos, vasos sanguíneos e fibroblastos foi realizada com o auxílio do *software Image J*, marcando os diferentes tipos de célula utilizando-se a ferramenta Multi-point. Os resultados foram expressos pela média do número total de cada tipo de célula marcado nos 5 campos de grande aumento (50x).

#### 4.13.3 Análise por Picrosirius Red (PSR)

Após a realização dos cortes, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em solução decrescente de álcool, lavados em água corrente, e em seguida, colocadas em solução corante (picrosirius) durante 15 minutos, após isso, foram lavados em água corrente e contra-corados com reagente B (Hematoxilina de Harris), deixando agir por 5 minutos, depois lavados em água corrente novamente e após as lâminas secarem passaram por desidratação em série de álcool ascendente até o xilol para montagem das lâminas e análise.

A análise do PSR ocorreu de acordo com a verificação da quantidade total de fibras colágenas, encontradas no tecido, sob avaliação com luz polarizada. Foram contabilizados 5 campos microscópicos de grande aumento, em 50x, e apresentados em forma de porcentagem os resultados da área total ocupada pelas fibras colágenas, com metodologia adaptada de Brizeno et al. (2016), em que as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits e logo após, utilizada a ferramenta *Make Binary* no *software*, para binarizar as mesmas e depois a análise para mensuração de colágeno total da área.

#### 4.14 Análise dos Resultados

Após a coleta das informações, os dados foram duplamente digitados, organizados e processados através da estatística descritiva em planilhas do programa Excel (Microsoft Office® 365). Na análise inferencial, após a determinação da

normalidade dos dados, através do teste Shapiro-Wilk, optou-se pelo teste ANOVA-um critério com post-hoc de Tukey para análise comparativa intragrupos e intergrupos. Em todos os testes utilizou-se  $p \leq 0,05$  para a significância estatística e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os testes foram realizados no programa SPSS® 24.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição Química da Oleorresina *Copaifera reticulata*

Na Tabela 1, observa-se a análise do teor dos componentes identificados na *C. reticulata* Ducke, do período seco. Verifica-se dentre os constituintes da oleorresina uma maior concentração de  $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno e éster metílico do ácido cauranóico.

**Tabela 1** – Composição química da oleorresina da *C. reticulata* Ducke

Constituintes	Período Seco Concentração (%)	Fórmula Molecular
Isoledeno	0,17	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\alpha$ -gurjuneno	0,12	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>	<b>24,48</b>	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub></b>
trans- $\alpha$ -bergamoteno	11,6	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
cis- $\beta$ -farneseno	0,12	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\alpha$ -humuleno	3,44	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
trans- $\beta$ -farneseno	0,75	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Germacreno D	0,08	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
cis- $\alpha$ -bisaboleno	1,06	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b><math>\beta</math>-bisaboleno</b>	<b>23,49</b>	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub></b>
$\beta$ -sesquifelandreno	0,87	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Éster metílico do ácido 3-metil-5 (2,2,6-trimetil-6-hidroxi-1-ciclohexil)-pentanoato de metila	4,71	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
caur-16-eno	0,45	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Éster metílico do ácido eperúico	0,11	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Éster metílico do ácido labdan-15-oico	0,54	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Éster metílico do ácido catívico	2,06	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Éster metílico do ácido caurenóico	4,85	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
<b>Éster metílico do ácido cauranóico</b>	<b>9,93</b>	<b>C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O</b>
Éster metílico do ácido labda-7,13-dien-15-oico (37,01)/Éster metílico do ácido daniélico (37,07)	3,12	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Éster metílico do ácido pinifólico	0,87	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Constituintes identificados	92,82%	

Fonte: Autora (2020).

A oleorresina de copaíba, vista de forma geral, é uma junção de sesquiterpenos e diterpenos em doses distintas. Diversos fatores estão interligados à variação da quantidade de óleo produzida e à composição química do mesmo, entre eles está a

genética, sazonalidade, luminosidade e nutrição, mas especialmente fatores bióticos, já que sua produção é resultante da desintoxicação do organismo vegetal, funcionando como mecanismo de combate à ação de insetos, bactérias, fungos e outros elementos lesivos (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; LUCCA, 2013).

Assim como no encontrado, Ziech et al. (2013), em estudo também com a *C. reticulata*, coletada na FLONA do Tapajós, em maio de 2011, verificaram além do  $\beta$ -cariofileno (37,6%) e  $\beta$ -bisaboleno (13,9%), como componentes majoritários, o  $\alpha$ -bergamoteno (9,3%),  $\alpha$ -humuleno (5,3%) e  $\beta$ -selineno (4,9%). Em outra pesquisa, Zoghbi et al. (2009), realizaram a análise da composição química da mesma espécie, *C. reticulata*, em municípios distintos, para verificar a variação de seus constituintes. Em Belterra – PA, a oleorresina coletada em amostras de duas árvores, possui como componentes de maior frequência o  $\beta$ -bisaboleno (36,9%, 18,4%),  $\alpha$ -bergamoteno (11,8%, 25,9%) e  $\beta$ -cariofileno (5,1%, 11,3%); em Almeirim – PA, o óleo coletado apresentou uma concentração majoritária do  $\beta$ -bisaboleno (28,5%),  $\alpha$ -bergamoteno (29,2%) e  $\beta$ -cariofileno (13%); e em Curionópolis – PA, verificou-se a presença de  $\beta$ -cariofileno (19%),  $\beta$ -bisaboleno (18,2%), óxido de cariofileno (15,2%),  $\beta$ -selineno (8,2%),  $\alpha$ -bergamoteno (8,1%) e  $\alpha$ -selineno (5,4%) como componentes de maior concentração.

Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006), em estudo realizado no município de Mojú – PA, comparando a composição química de três espécies de copaíba, verificaram que os componentes majoritários encontrados na *C. reticulata* também foram o  $\beta$ -Cariofileno (61,8%) e  $\beta$ -Bisaboleno (17,4%). Na espécie *C. duckei* aparecem os mesmos componentes em diferentes concentrações,  $\beta$ -Bisaboleno (17,6%) e  $\beta$ -Cariofileno (15,5%), já na espécie *C. martii*, o componente que apresentou maior frequência foi o  $\alpha$ -Copaeno (51,2%).

Não existem relatos ainda sobre a ação do éster metílico do ácido cauranóico, mas, os outros compostos majoritários deste estudo,  $\beta$ -cariofileno e  $\beta$ -bisaboleno, demonstram ser importantes agentes na atividade anti-inflamatória. É dito que o  $\beta$ -cariofileno age como anti-inflamatório, antiedêmica e bactericida, além de ser considerado, na fração de sesquiterpenos de copaíba, um marcador químico, por estar presente em todas as análises de oleorresinas. Já o  $\beta$ -bisaboleno além de ter propriedades anti-inflamatórias, possui ainda ação analgésica.



As propriedades cicatrizantes ligadas à copaíba, são advindas de sua fração principal, os sesquiterpenos, com sua ação anti-inflamatória e, advindas dos diterpenos, suas propriedades antimicrobianas, considerados adstringentes, auxiliam no processo de reparação de feridas, promovendo a contração e aumento da taxa de epitelização da mesma (BARBOSA et al., 2012; LUCCA, 2013; MASSOM-MEYERS et al., 2013b; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002); Mas, para essa ação ser efetiva, parece ser fundamental o sinergismo entre os componentes, uma vez que uma menor ação é obtida quando utilizadas frações isoladas dos componentes, quando confrontado com o uso da oleorresina bruta (LEANDRO et al., 2012; SANTOS et al., 2008).

Apesar de todos os óleos coletados apresentarem dois dos constituintes de maior frequência na oleorresina deste estudo, é observado uma grande variabilidade na composição do óleo de copaíba, entre os indivíduos da mesma espécie, que estão relacionados à fatores ambientais em que os indivíduos são expostos e ao seu potencial genético. Essa variabilidade pode ter influência na ação biológica desse recurso natural e ainda na toxidez (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006).

## 5.2 Análise do Teste de Irritação/Corrosão Dérmica

Ao se observar a pele, após o período de 24 horas da tricotomia realizada no dorso dos animais, não ocorreu nenhum sinal de irritação na pele das fêmeas, não havendo a necessidade de troca das mesmas.

Na realização do teste de única aplicação, o dorso dos animais foi observado de forma diária até 72 horas, após a aplicação da oleorresina *in natura* e em pomada a 10%. Na tabela 2, pode-se verificar que todos os animais foram classificados em grau 0, já que se observou que não houve a formação de eritema/escaras ou de edema. Em seguida, o teste de confirmação demonstrou o mesmo resultado, quando realizados em mais três animais, além de não apresentarem alterações no comportamento ou alimentação. O que também não ocorreu nos estudos de Lima (2015) ao utilizar a *C. paupera* e Marinho (2015) com *C. duckei*, ambos realizaram o teste com a substância *in natura* e em gel a 10%.

**Tabela 2** – Resultado da toxicidade dérmica com teste de uma única aplicação (n=8).

Animais	<i>C. reticulata</i> Ducke <i>in natura</i>		Pomada de <i>C. reticulata</i> Ducke a 10%	
	Eritema/Escaras	Edema	Eritema/Escaras	Edema
1	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
<b>Teste de Confirmação</b>				
1	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
2	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
3	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0

Fonte: Autora (2020).

Logo após, foi realizada uma adaptação do teste, com aplicação em doses repetidas diariamente, durante 14 dias, e se observou que os animais em que se utilizou a *C. reticulata* em pomada a 10%, incluindo os do teste de confirmação, não apresentaram sinal de eritema/escara ou edema, classificados em grau 0 (Tabela 3). O que também foi descrito por Estevão et al. (2009) que não encontraram qualquer sinal de irritação ou alergia no local de aplicação, ao utilizar a oleorresina de *C. langsdorffii* em pomada na mesma concentração desse estudo, durante 8 dias. Assim como o uso em concentração menor a 2,5% como creme vaginal em ratas gestantes (LIMA et al., 2011). E em outro estudo realizado por Lima (2014), verificou que o uso da oleorresina *C. duckei* (28mg/kg) como creme vaginal não apresentou sinal de irritação na mucosa em sua aplicação por 22 dias.

A tabela 3 mostra ainda, a aplicação continuada da *C. reticulata in natura*, que gerou um grau 3 de eritema/escaras e grau 1 de edema, e ao se realizar o teste de confirmação houve diferentes graus de eritema/escaras, chegando até grau 3, mas mantendo grau 1 de edema em dois animais. Corroborando com Lima (2015), que apesar de não apresentarem qualquer grau de edema, os animais da pesquisa tiveram formação de eritema/escaras, com grau 2, na aplicação diária durante 6 dias da oleorresina de *C. paupera in natura*.

Já Carvalho et al. (2005), ao realizarem por 7 dias a aplicação da *C. duckei* em sua forma pura não obtiveram sinais de irritação ou processo inflamatório na região dorsal dos animais. O que também não ocorreu no estudo de Brito et al. (2006) ao utilizar a oleorresina de *C. officinalis*, sob a pata traseira dos ratos, por 14 dias. Assim como a aplicação do óleo de *C. multijuga* puro, em diferentes dosagens, por

Gonçalves et al. (2014) através da via oral, não demonstrou toxicidade no sistema reprodutor masculino dos animais.

Durante o uso contínuo das substâncias, verificou-se que no quinto dia de aplicação, todos os animais já apresentavam grau 1 de eritema/escaras, igualmente descrito por Lima (2015), que no mesmo dia observou um processo bem delimitado de hiperemia e pequenos locais de descontinuidade da pele, este último, ocorrendo no estudo presente, apenas mais a frente, a partir do oitavo dia, sugerindo ser em consequência de locais onde a substância possa ter se concentrado.

Além disso, foi possível verificar um efeito estressor da aplicação da oleorresina, que fez com que as ratas deixassem de se alimentar corretamente, provocando durante o experimento oscilação de humor, tornando-as mais agitadas e agressivas. Em discordância do encontrado por Gonçalves et al. (2014), que seus animais apresentaram ganho de massa, aumento do consumo de água e não tiveram alteração de comportamento.

**Tabela 3** – Resultado da toxicidade dérmica com teste adaptado para doses repetidas (n=8).

Animais	<i>C. reticulata</i> Ducke <i>in natura</i>		Pomada de <i>C. reticulata</i> Ducke a 10%	
	Eritema/Escaras	Edema	Eritema/Escaras	Edema
1	Grau 3	Grau 1	Grau 0	Grau 0
<b>Teste de Confirmação</b>				
1	Grau 3	Grau 1	Grau 0	Grau 0
2	Grau 2	Grau 0	Grau 0	Grau 0
3	Grau 3	Grau 1	Grau 0	Grau 0

Fonte: Autora (2020).

As diferenças encontradas entre os estudos realizados com a oleorresina *in natura*, ou em outra forma, como pomada, podem ser consequência do perfil oleoso que a substância possui, podendo impedir sua absorção e distribuição por camadas mais internas do tecido, em junção com o fato de ao ser utilizada pura está mais concentrada. E ainda, a oleorresina é formada por duas frações, uma volátil e uma resinosa, sendo esta última dita como irritante tanto para mucosas quanto para a pele. Uma elevada taxa de diterpenos, metabólitos da fração resinosa, podem provocar em algumas espécies uma resposta irritativa maior, explicando o fato de algumas apresentarem reações à aplicação *in natura* (GIESBRECHT, 2011; RIO, 2001).

**Tabela 4** – Resultado da média da toxicidade dérmica com doses repetidas.

Grupos	Eritema/ escaras	Edema
	Média	
<b>Oleorresina <i>in natura</i></b>	1,8	
<b>Pomada a 10%</b>	0	
















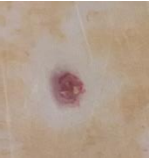
Fonte: Autora (2020).

Ao se realizar a média geral dos dados obtidos (Tabela 4) e considerando a metodologia adotada e os resultados obtidos, a oleorresina na forma *in natura* foi classificada como irritante moderada, mas não corrosiva, já que as feridas ocasionadas em decorrência do seu uso contínuo foram reversíveis após a interrupção da aplicação da mesma.

### 5.3 Análise Macroscópica

A análise macroscópica foi realizada através da avaliação das áreas da lesão cutânea em diferentes períodos. A figura 11 demonstra a evolução da área da ferida em cada um dos grupos, em que é possível observar que todos eles obtiveram uma redução da lesão no processo cicatricial, sem sinais de irritação ou escaras. Da mesma forma em que ocorreu no estudo de Biondo-Simões et al. (2019), que não se verificou presença de secreção purulenta ou hemorragia em nenhum de seus grupos tratamento, que avaliou produtos naturais, dentre eles a oleorresina de copaíba.

**Figura 11** – Evolução da área da lesão por dias de avaliação em cada grupo.

Grupos	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14
Grupo Controle				
Grupo Fotobiomodulação				
Grupo Pomada				
Grupo Fotobiomodulação e Pomada				

Fonte: Autora (2020).

Na tabela 5, pode-se verificar que, na análise de homogeneidade da área inicial da lesão induzida, a média dessas áreas não demonstrou significância entre os grupos do estudo, apresentando parâmetros de normalidade.

**Tabela 5** – Resultados da estatística descritiva e normalidade das áreas da lesão (cm<sup>2</sup>).

Grupo	Dia	Mín.	Máx.	Mediana	Média	Desvio Padrão	p-valor*
GC	Dia 0	0,80	0,90	0,87	0,86	0,03	0,0985
	Dia 3	0,42	0,72	0,56	0,56	0,09	0,5928
	Dia 7	0,17	0,30	0,21	0,23	0,04	0,4354
	Dia 14	0,05	0,09	0,07	0,07	0,02	0,5598
GP	Dia 0	0,80	0,89	0,85	0,84	0,03	0,0823
	Dia 3	0,47	0,83	0,59	0,59	0,09	0,1860
	Dia 7	0,16	0,29	0,24	0,23	0,05	0,2200
	Dia 14	0,05	0,13	0,09	0,09	0,03	0,9096
GF	Dia 0	0,80	0,89	0,85	0,84	0,02	0,5306
	Dia 3	0,43	0,78	0,60	0,60	0,08	0,4563
	Dia 7	0,29	0,42	0,37	0,36	0,04	0,5924
	Dia 14	0,09	0,18	0,12	0,13	0,04	0,3595
GFP	Dia 0	0,80	0,89	0,83	0,84	0,03	0,0517
	Dia 3	0,44	0,69	0,59	0,60	0,06	0,4369
	Dia 7	0,26	0,50	0,43	0,42	0,07	0,1859
	Dia 14	0,07	0,21	0,21	0,17	0,06	0,0350

Legenda: Mín.=Mínimo; Máx.=Máximo; GC= Grupo Controle; GP= Grupo Pomada; GF=Grupo Fotobiomodulação; GFP= Grupo Fotobiomodulação e Pomada.

\*Resultados do teste de normalidade (Shapiro-Wilk).

Fonte: Autora (2020).

Observa-se então, que qualquer variável que pudesse interferir no processo de reparo tecidual, foram controladas. Sendo algumas descritas por Mestre, Rodrigues e Cardoso (2012) como a idade do animal, tamanho da ferida, estado nutricional e estresse. Tais fatores foram controlados já que o animal possuía uma idade padrão para a realização da pesquisa, assim como a área da lesão, além disso, todos os grupos tinham a mesma alimentação e durante a aplicação do tratamento, a carga de estresse foi reduzida já que o aparelho utilizado não emitia ruídos.

Na figura 12, pode-se verificar que logo após a lesão não houve muita variação de tamanho das mesmas, demonstrando uma média semelhante entre os grupos, não havendo diferença significativa, o que também não ocorreu na fase aguda da lesão (dia 3).

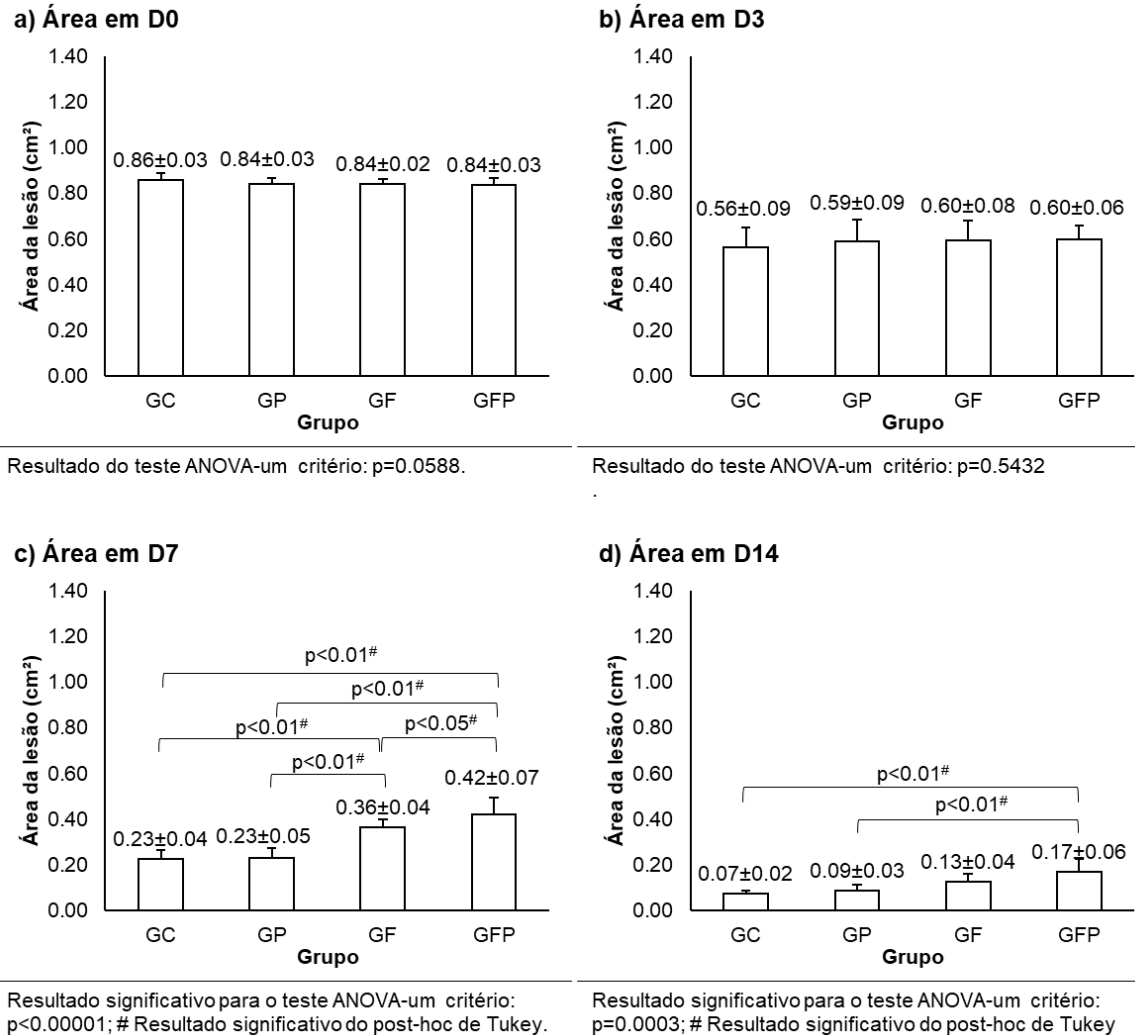
Durante a fase proliferativa (dia 7), todos os grupos apresentaram redução significativa da área da lesão quando comparadas ao grupo da junção de fotobiomodulação e pomada, com GC e GP demonstrando uma significância maior ( $p < 0.01$ ). O grupo controle ainda apresenta significativa diminuição quando comparado ao grupo fotobiomodulação, assim como o grupo pomada na mesma

comparação, ambos apresentando diminuição aproximada da área da ferida. Tal fato diverge do encontrado por Maciel et al. (2020), ao analisar a influência da laserterapia de baixa intensidade (LTBI) utilizada de forma isolada ou combinada com produtos naturais (mel e solução hidroalcoólica de própolis à 5%) durante os dias 7, 14 e 21, verificando que no sétimo dia, a área da lesão do grupo controle negativo se igualou ao grupo em que houve a junção das terapias (LTBI com os produtos naturais), mas havendo redução maior no grupo em que se utilizou apenas a mistura dos produtos naturais ao final.

Em fases mais avançadas do processo cicatricial (dia 14), apenas os GC e GP manifestaram um resultado significativo, com menor área da lesão em comparação ao grupo de associação das terapias. O que também ocorreu no estudo de Barquete (2017), que utilizou oleorresina de *C. langsdorffii*, LTBI e sua associação na cicatrização de feridas em ratos, durante o mesmo período. Apesar de não terem sido significativos, os dados mostraram que o grupo controle obteve uma área de contração da ferida maior e em menor tempo.

Resultados superiores também foram encontrados por Masson-Meyers et al. (2013b), ao tratarem feridas com creme de copaíba (*C. langsdorffii*) a 10%. Já Barquete (2017) verificou que o grupo em que se utilizou as terapias associadas e apenas o óleo apresentaram as menores taxas de cicatrização, que de acordo com a autora, pode ser explicado devido ao uso *in natura* da oleorresina, que provocou a criação exacerbada de crostas, restringindo o fechamento das mesmas.

**Figura 12** – Resultado comparativo intergrupos da área da lesão (cm<sup>2</sup>) de acordo com dias de avaliação.



**Fonte:** Autora (2020).

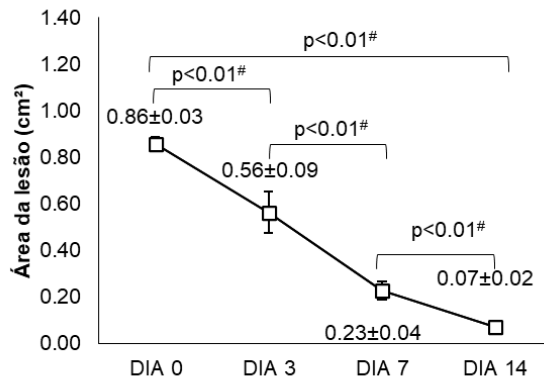
Em relação à área de lesão em cada grupo (Figura 13), é possível verificar reduções significativas entre cada um deles. Resultados similares foram obtidos com Maciel et al. (2020), que também obteve uma redução significativa em todos os grupos, apesar de não terem sido em todos os momentos. Em seu estudo, as feridas tratadas com laser e própolis, e as tratadas com a mistura de mel e solução hidroalcolica de própolis a 5% obtiveram uma redução significativa nos dias 14 e 21, quando comparados ao dia 7, e do vigésimo primeiro dia em relação ao décimo quarto. Já o grupo tratado com laser e mel e o grupo em que foram utilizados todos os



tratamentos, apresentou significância apenas na comparação dos dias 14 e 21, em relação ao sétimo dia, e o grupo laser somente na verificação da análise final com a inicial.

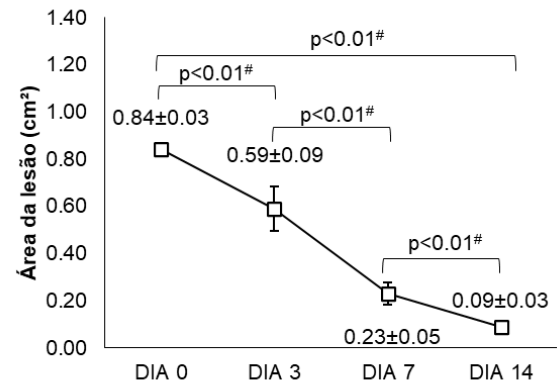
**Figura 13** – Resultado comparativo intragrupo da evolução da área da lesão (cm<sup>2</sup>) durante os dias de avaliação.

**a) Área no GC**



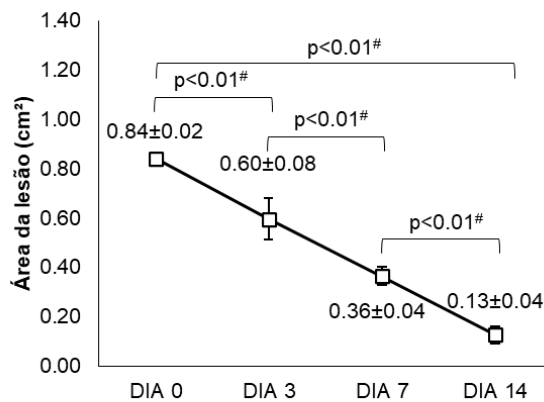
Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p < 0.00001$ ; # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

**b) Área no GP**



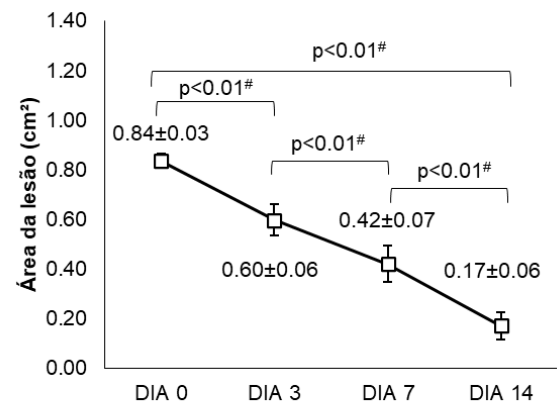
Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p < 0.00001$ ; # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

**c) Área no GF**



Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p < 0.00001$ ; # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

**d) Área no GFP**



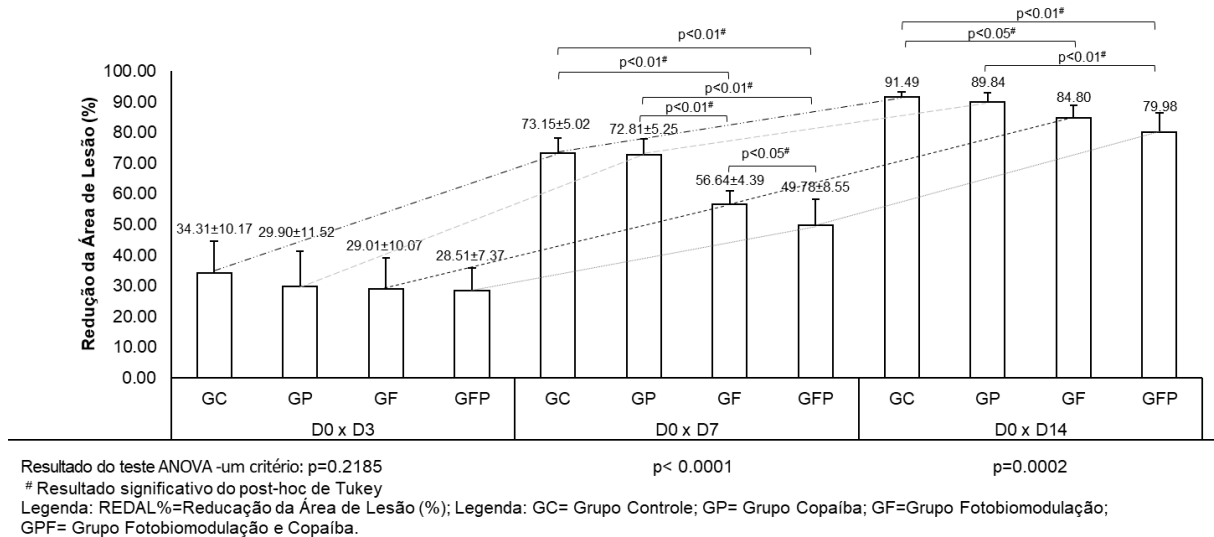
Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p < 0.00001$ ; # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

**Fonte:** Autora (2020).

No que concerne à contração da ferida, em porcentagem, na comparação intergrupos entre os dias, verifica-se um aumento significativo da contração no grupo controle e grupo copaíba quando comparado ao grupo fotobiomodulação e o grupo com associação das terapias, no dia inicial em relação ao dia 7, bem como o GF também demonstrou  $p < 0,05$  em relação ao GFP. E, no dia 0 ao dia 14, todos os grupos

apresentaram uma taxa significativa de oclusão da área da lesão, quando comparados ao GFP (Figura 14).

**Figura 14** – Resultado comparativo intergrupo da taxa de redução da área da lesão (%) entre o D0 e D3, D0 e D7 e D0 e D14.



**Fonte:** Autora (2020).

Pode-se observar ainda que o grupo controle e pomada foram os que obtiveram uma maior contração das feridas, seguidos do grupo laser e a associação das terapias. Concordando com Maciel et al. (2020), que demonstrou que o grupo em que houve mistura de produtos naturais apresentou a menor área de lesão ao ser observada macroscopicamente.

Assim como, Biondo-Simões et al. (2019), que apesar de a área da ferida não ter demonstrado diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos dias avaliados (3, 7 e 14), a comparação entre o uso do óleo de copaíba, mel, um produto comercial, e solução fisiológica na cicatrização de feridas em ratos, verificou, ao analisar a contração das lesões, que as lesões tratadas com o óleo tinham um tamanho menor em relação ao controle, entre o dia zero e o dia sete, e na comparação do dia zero ao dia 14, e o grupo mel obteve resultados mais expressivos.

Carneiro et al. (2010), relatam que ao comparar a utilização do LTBI e o extrato de uma planta (*Pfaffia glomerata*) em feridas produzidas no dorso dos ratos, avaliadas durante três semanas, o grupo tratado com a planta obteve melhores resultados em relação ao controle, na análise morfométrica, assim como o grupo de LBTI que obteve resposta positiva, apesar dos mesmos não terem sido significativos.

Já discordando dos dados expostos, Soleimani et al. (2018), verificaram que apenas a fotobiomodulação apresentou uma aceleração significativa na cicatrização de feridas, de acordo com as propriedades tensiométricas, quando comparadas à associação da fotobiomodulação com curcumina em lesão excisional em ratos induzidos à diabetes tipo I.

Hippólito et al. (2019), também afirmam que o tratamento com laser acelera o processo de cicatrização, porém, não foi considerado o melhor, em seu estudo, no qual verificou cicatrização de feridas excisionais no tórax de papagaios analisando o uso de cinco terapias – LTBI, dois medicamentos tópicos (pomada com óleo de *Ricinus communis* e pomada de dexpanthenol 5%) e duas soluções de lavagem (solução de digluconato de clorexidina 1% e solução salina estéril). A pesquisa mostrou que as feridas tratadas com as soluções de lavagem promoveram uma cicatrização mais rápida quando comparadas aos demais grupos; seguidas do grupo tratado com laser e por último, as pomadas.

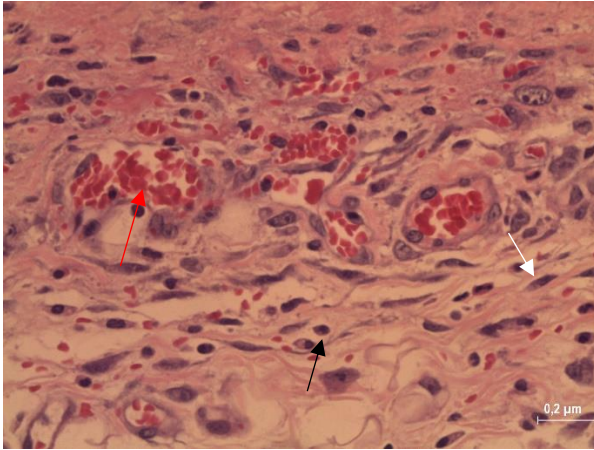
Apesar de no estudo presente, a fotobiomodulação a laser não ter apresentado o melhor resultado, Giuliani (2009), ao avaliar o uso da laserterapia em cultura de células neurais relata que essa terapia é capaz de promover a aceleração do processo de reparo por meio da absorção pelas mitocôndrias, da energia gerada pelo laser, que promovem uma produção de ATP maior e ácido nucleico, resultando na aceleração das etapas de reparo, e conseqüentemente, na oclusão da ferida.

## **5.4 Análise Microscópica**

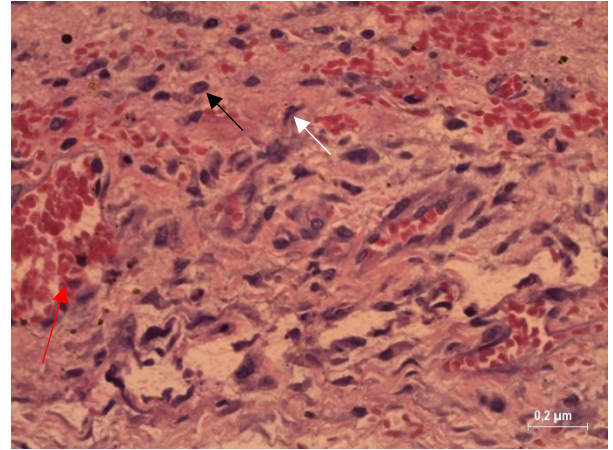
### **5.4.1 Análise da contagem de neutrófilos em HE**

A figura 15 apresenta a proliferação das células de neutrófilos, vasos sanguíneos e fibroblastos, de acordo com os grupos do estudo.

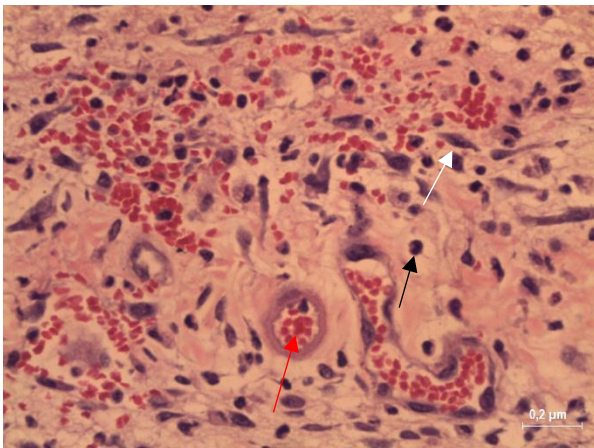
**Figura 15** - Fotomicrografias com aumento de 500x corados em HE demonstrando a proliferação de neutrófilos (seta preta), vasos sanguíneos (seta vermelha) e fibroblastos (seta branca).



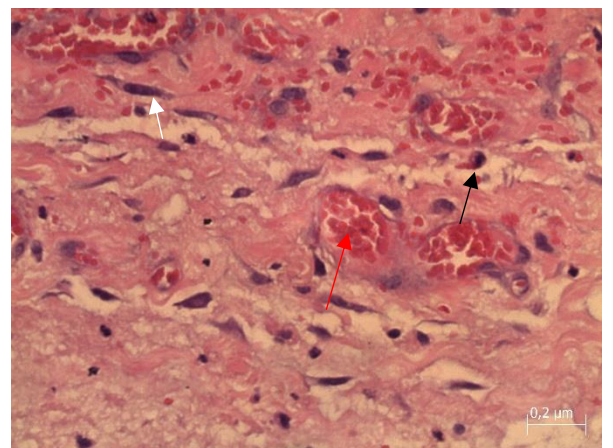
A. Grupo Controle no dia 03



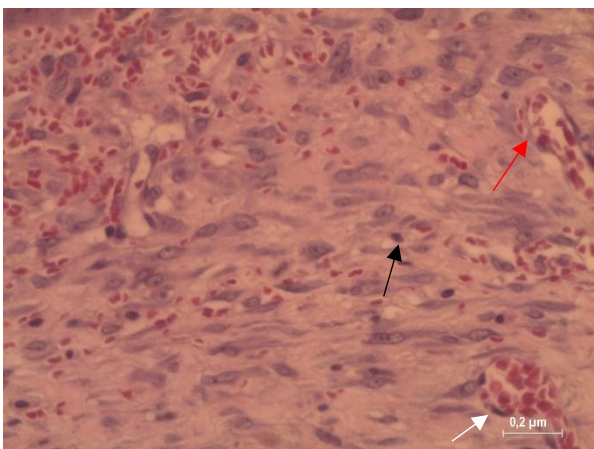
B. Grupo Fotobiomodulação no dia 03



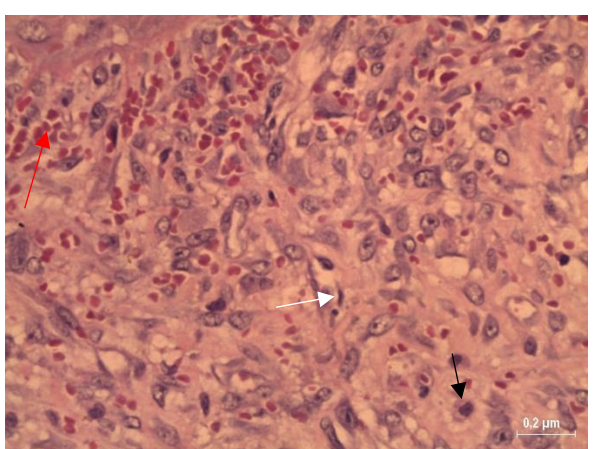
C. Grupo Pomada no dia 03



D. Grupo Fotobiomodulação e Pomada no dia 03

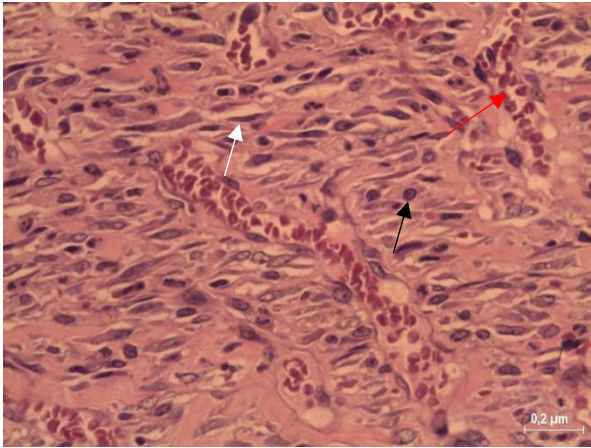


E. Grupo Controle no dia 07

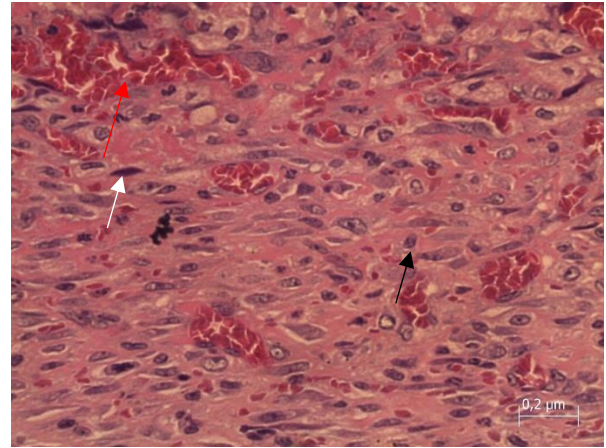


F. Grupo Fotobiomodulação no dia 07

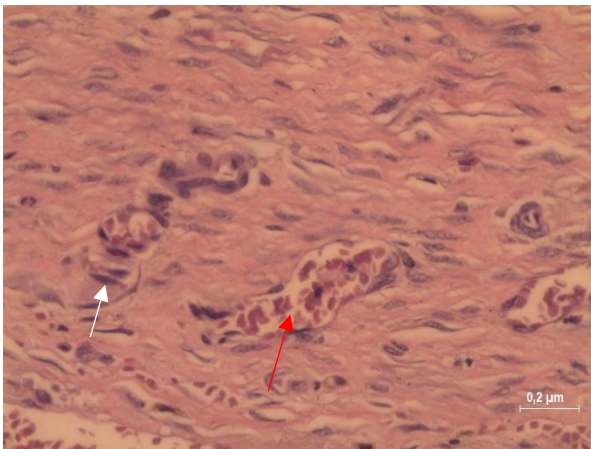




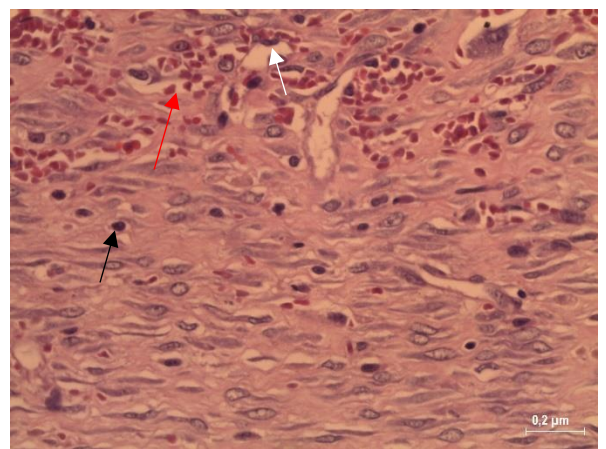
G. Grupo Pomada no dia 07



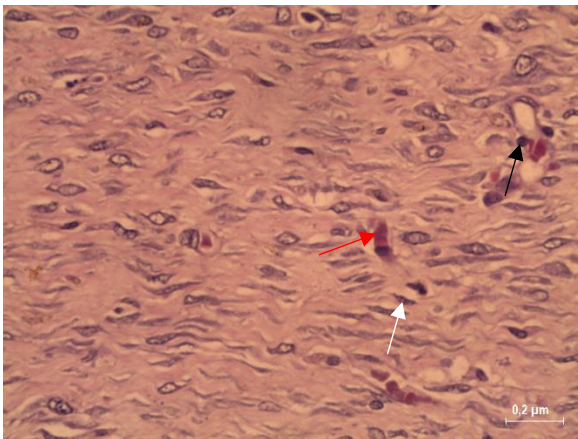
H. Grupo Fotobiomodulação e Pomada no dia 07



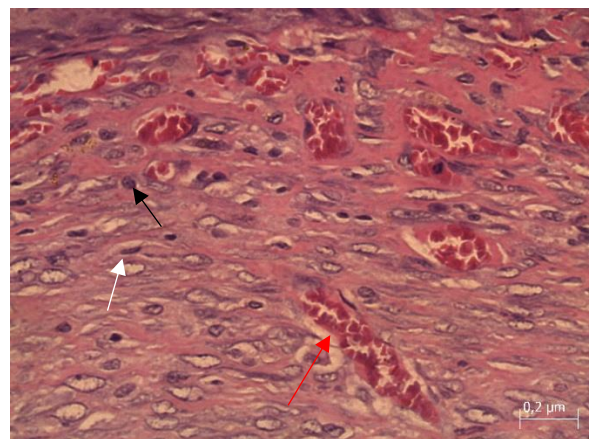
I. Grupo Controle no dia 14



J. Grupo Fotobiomodulação no dia 14



K. Grupo Pomada no dia 14



L. Grupo Fotobiomodulação e Pomada no dia 14

**Fonte:** Autora (2020).

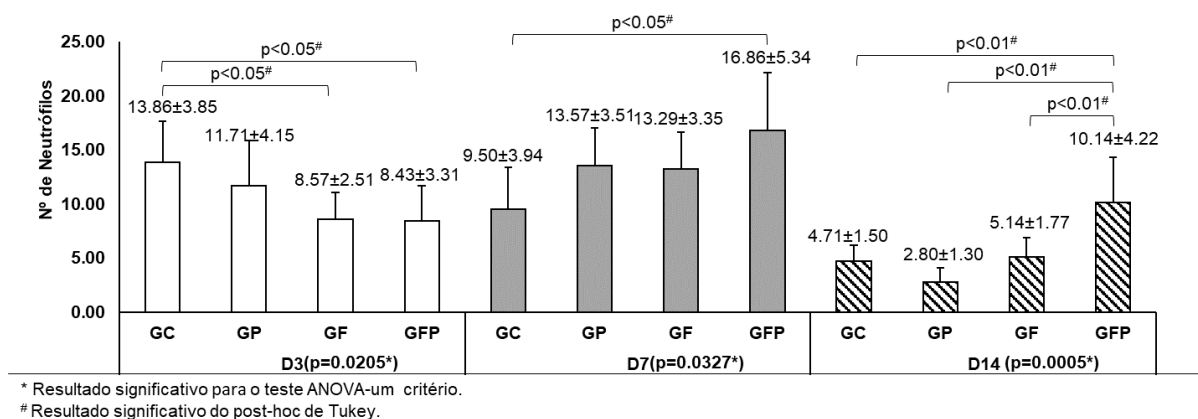
Em relação ao número de neutrófilos encontrados na lesão, observa-se que no primeiro momento de avaliação (dia 3), o grupo controle demonstra uma quantidade significativamente maior, quando comparado ao GF e GFP, já no segundo momento

(dia 7), o GFP se sobressai em relação ao GC e mantém essa significância no terceiro momento (dia 14), em comparação aos demais grupos (Figura 16).

Os neutrófilos são as células primárias a chegarem na região da lesão, com uma maior taxa um dia após a ferida. Essas células, que fazem parte da fase inflamatória, são atraídos por elementos quimiotáticos que são liberados pelas plaquetas, e se ligam à parede endotelial após a junção com receptores de membrana, ajudando na eliminação de bactérias através da produção de radicais livres e são paulatinamente substituídos por macrófagos, que contribuem para a angiogênese e antecedem a migração de fibroblastos. (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

De acordo com Smith (2005), apesar da importância dessas células ao promover proteção contra infecção, a permanência das mesmas no local da ferida pode prolongar o processo de oclusão da lesão. Fator tal, observado no presente estudo, no tratamento com a associação das terapias, o que pode justificar a lentidão na cicatrização desse grupo.

**Figura 16** – Resultado comparativo intergrupos do número de neutrófilos de acordo com dias de avaliação.



**Fonte:** Autora (2020).

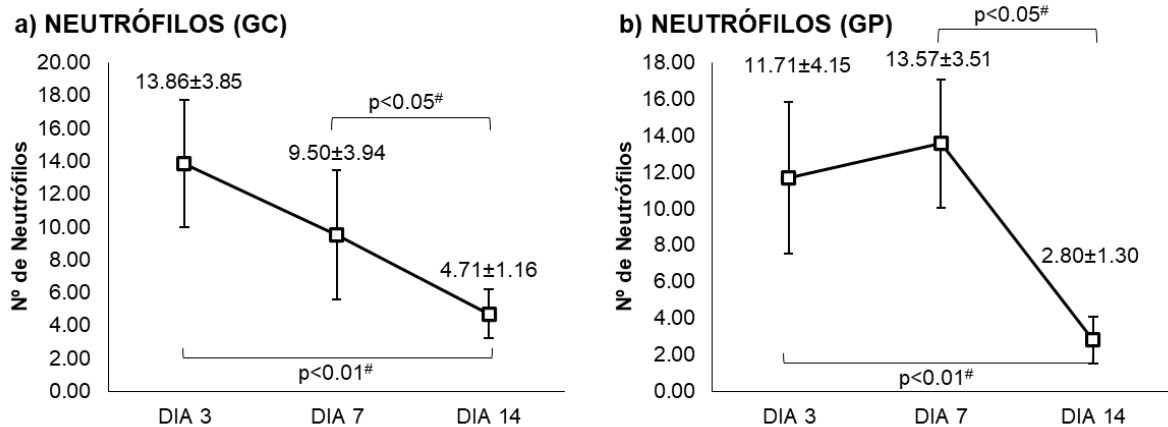
Ao observar os grupos entre si na figura 17, é possível verificar que nos GF e GFP, houve um aumento na contagem de neutrófilos, com  $p < 0.01$ , no dia 7 em comparação ao dia 3. Já na comparação do dia 14 ao dia 7, houve uma redução significativa em todos eles, demonstrada também no GC, em que apresentou ainda, uma queda expressiva no dia 14 em relação ao dia 3, observado também no GP.

Em consonância com o encontrado, Masson-Meyers et al. (2013b) ao tratar feridas no dorso dos animais, com creme de copaíba 10% (*C. langsdorffii*) verificaram que no dia 7 desse tratamento, a lesão ainda apresentava sinais de inflamação. Biondo-Simões et al. (2019) afirma que no tratamento com óleo houve um predomínio de lesões em fase inflamatória crônica. Já no tratamento com laser, Carvalho et al. (2010) afirmou ter encontrado um número de células inflamatórias significativamente menor em relação ao grupo placebo, no terceiro e sétimo dia.

Hawkins e Abrahamse (2007), observaram em seu estudo uma queda abrupta de células inflamatórias nos grupos tratamento, evidenciando um declínio da fase inflamatória. O que ocorreu no presente estudo apenas no grupo controle, no qual, os neutrófilos, que fazem parte das células inflamatórias, apresentaram uma queda progressiva desde o primeiro momento de avaliação. Já os grupos tratamento obtiveram uma redução significativa, apenas a partir do dia 7 em diante, o que pode explicar o processo de cicatrização mais lento dos mesmos.

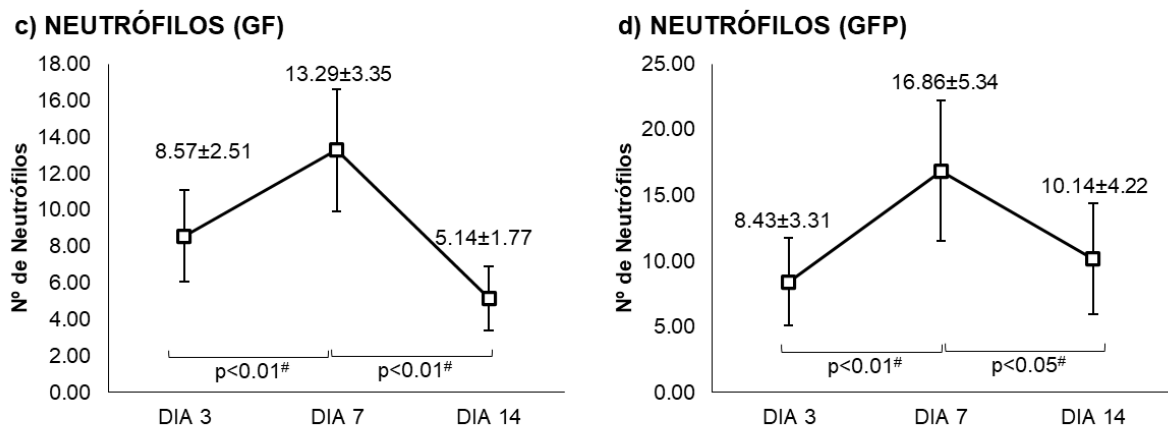
Porém, é necessário ressaltar, que para ser considerada como eficiente, a terapia não deve diminuir apenas a inflamação, mas promover também, em um período de tempo menor, o reparo tecidual. Por isso, este estudo avaliou também a quantidade de vasos sanguíneos, proliferação de fibroblastos e porcentagem de colágeno presente no local da lesão, fatores primordiais para um processo de cicatrização adequado.

**Figura 17** – Resultado comparativo intragrupo da evolução do número de neutrófilos durante os dias de avaliação.



Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p=0.0005$ . # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p=0.0003$ . # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.



Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p=0.0002$ . # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p=0.0051$ . # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

Fonte: Autora (2020).

#### 5.4.2 Análise da contagem de vasos sanguíneos em HE

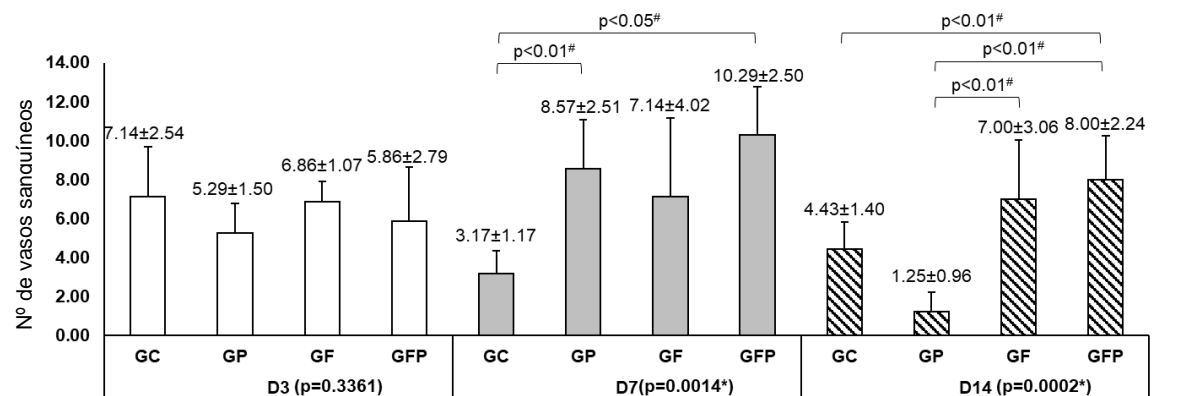
Em relação ao número de vasos sanguíneos encontrados, pode-se verificar que no dia 3 não houve diferença significativa entre os grupos, apenas no dia 7 e 14, este primeiro, com significância quando comparado o GFP, que apresenta maior quantidade de vasos, em relação ao controle, além do GP na mesma comparação. E no dia 14, o GFP continuou demonstrando um número significativamente maior em relação aos GC e GP, assim como o GF comparado ao GP (Figura 18).



Gonçalves et al. (2010), obteve respostas diferentes em seu estudo, relatando que no primeiro momento de avaliação, correspondente ao mesmo do estudo presente, a quantidade de vasos sanguíneos maior foi encontrada em seus grupos tratados com laser em dois parâmetros diferentes (30J/cm<sup>2</sup> e 60J/cm<sup>2</sup>) e no grupo tratado com o um óleo de cura formado por óleos curativos composto por triglicerídeos de cadeia média e ácidos graxos essenciais, mas não demonstraram significância entre os grupos. No segundo momento (dia 7), os dados foram significativos nos grupos de terapia a laser em relação ao grupo óleo e controle. E no décimo sexto dia o grupo laser de 60J/cm<sup>2</sup> apresentou uma quantidade significativamente maior em comparação aos demais grupos.

Carneiro et al. (2010), observaram que o grupo em que se utilizou planta apresentou melhor resultado em uma semana, o que também foi possível verificar nos dados aqui encontrados, em que ambos os grupos nos quais se utilizaram a pomada (GP e GFP) obteve uma melhor resposta em relação à quantidade de vasos encontrados no mesmo período.

**Figura 18** – Resultado comparativo intergrupos do número de vasos sanguíneos de acordo com dias de avaliação.



\* Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério.

# Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

**Fonte:** Autora (2020).

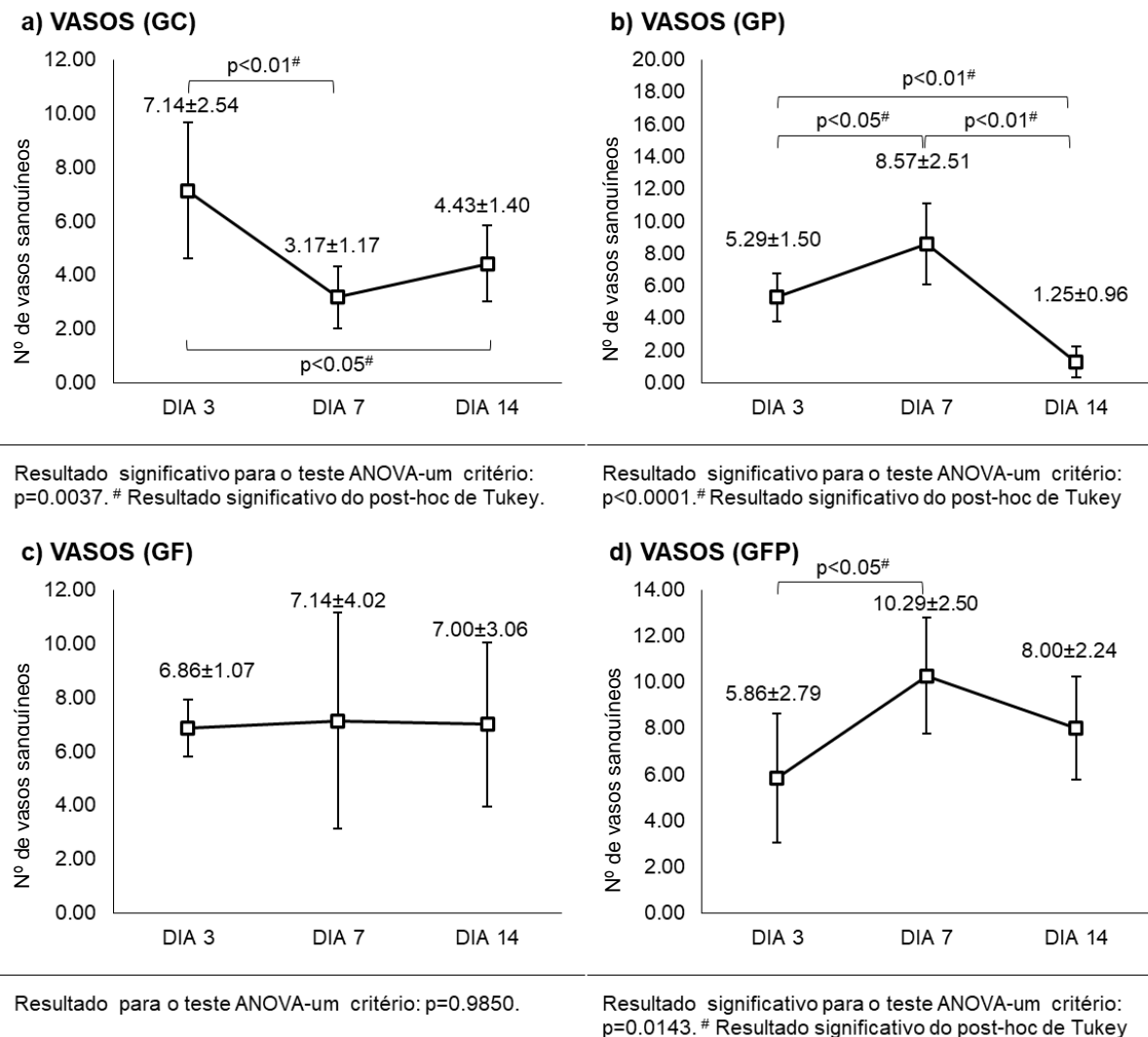
Na figura 19, observando a comparação intragrupo, verifica-se que todos os grupos, com exceção ao GF, apresentaram dados significativos, com aumento no número de vasos, no GC demonstrando um índice maior logo no primeiro momento de avaliação, e os GP e GFP no segundo momento (dia 7). O que diverge de Carvalho

et al. (2010), que afirma ter sido significativamente maior o número de vasos encontrados no terceiro dia em que receberam LTBI em relação ao grupo placebo.

O uso da copaíba no estudo de Corrêa (2015), além do grupo controle, apresentou diferenças significativas entre si, estimulando a angiogênese, o que também ocorreu nos estudos de Estevão et al. (2009) que com a aplicação da oleorresina em pomada a 10% verificou uma maior angiogênese no retalho cutâneo, nas regiões média e caudal, promovendo a reparação do tecido, corroborando com os resultados encontrados nos grupos em que houve a utilização do fitoterápico.

A formação de novos vasos acontece principalmente nas etapas iniciais da cicatrização de feridas, fazendo parte da fase proliferativa. Uma maior angiogênese em tecido de granulação favorece um processo de reparo em menor tempo e melhor em decorrência do aumento da entrada de nutrientes e saída de metabólitos do local da lesão, contribuindo também para um aumento do aporte de células, dentre elas os fibroblastos, para a região (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

**Figura 19** – Resultado comparativo intragrupo da evolução do número de vasos sanguíneos durante os dias de avaliação.



**Fonte:** Autora (2020).

### 5.4.3 Análise da contagem de fibroblastos em HE

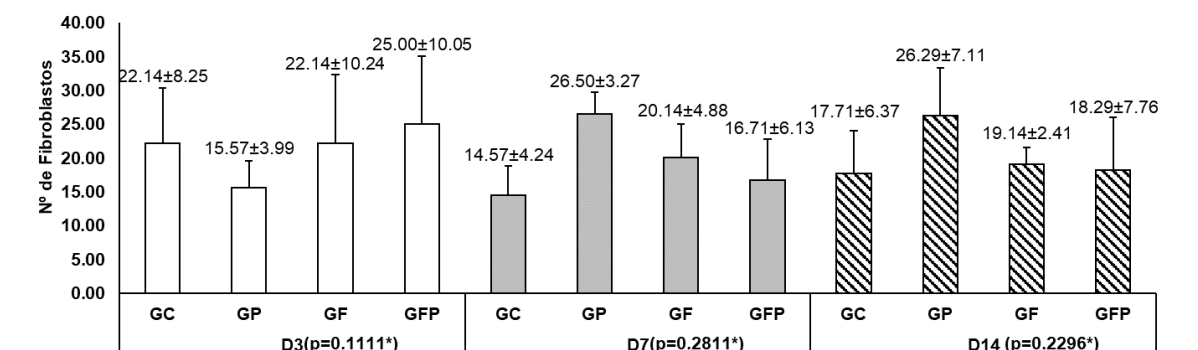
Ao analisar os resultados sobre o número de fibroblastos intergrupos nos três diferentes momentos de avaliação, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, apesar disso, os grupos tratamento foram os que demonstraram maiores valores em relação ao controle, este, com um índice elevado apenas no dia 3 (Figura 20).

Assim como no encontrado, o estudo realizado por Gonçalves et al. (2010), apresentou, à verificação do número de fibroblastos, que no primeiro momento de avaliação de seu trabalho, correspondente ao mesmo aqui estudado, atestou um número significativamente maior dessas células nas lesões que receberam como forma de tratamento o óleo curativo e diferentes parâmetros de laser, quando comparados com o grupo controle.

Já no segundo momento de avaliação, uma quantidade maior de fibroblastos foi encontrada no GP em relação aos demais. Gonçalves et al. (2010), também no mesmo momento, relatam que o grupo tratado com o óleo curativo apresentou um número de fibroblastos significativamente maior em comparação aos grupos tratados com laser. Ao contrário do observado por Al-Zamily e Al-Temimi (2019), em seu estudo com o uso de laser em comparação ao óleo de *Nigella sativa* em feridas incisionais nos ratos, durante sete dias, no qual verificaram que a quantidade de macrófagos foram reduzidas com o uso do laser e que o número de fibroblastos aumentou influenciando positivamente a fase de proliferação, assim como estimulou a síntese de colágeno.

E no terceiro momento, mesmo sem significância, o número maior de fibroblastos no GP se perdurou em relação aos outros grupos. Gonçalves et al. (2010) em seu estudo demonstra que já nos momentos seguintes de avaliação (dia 12, 14 e 20), o grupo de óleo curativo tem uma redução na quantidade de células e se pareceu com os demais grupos até o último dia de avaliação.

**Figura 20** – Resultado comparativo intergrupos do número de fibroblastos de acordo com dias de avaliação.



\* Resultado para o teste ANOVA-um critério.

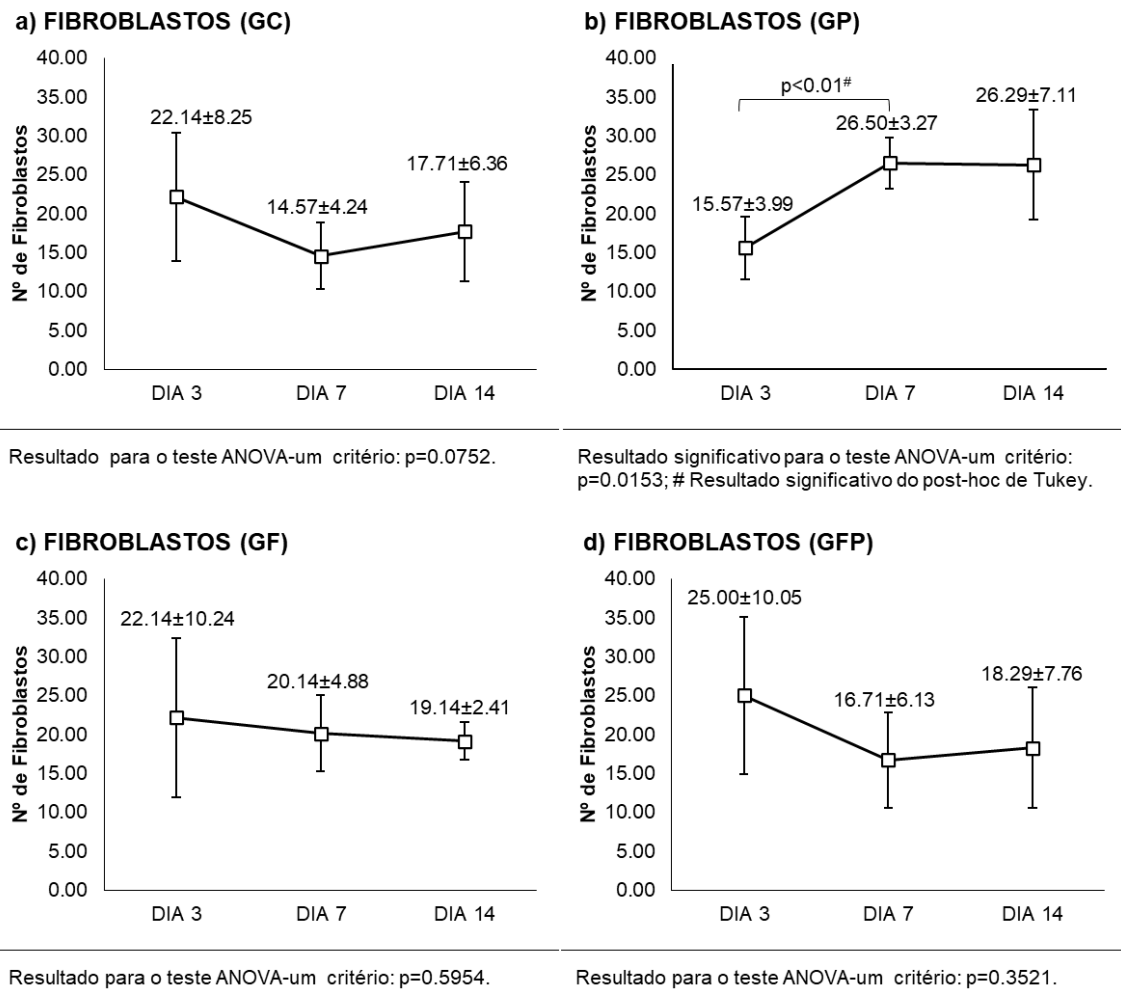
**Fonte:** Autora (2020).

Quando analisada a comparação intragrupo da quantidade de fibroblastos, de acordo com os dados apresentados na figura 21, é possível verificar que apenas o GP teve um aumento significativo quando comparado o dia 7 em relação ao dia 3.

Carvalho et al. (2010), comparando apenas o uso do laser com placebo, verificou que o número de fibroblastos apresentou uma maior significância no terceiro dia. E, Masson-Meyers et al. (2013b) ao tratar feridas no dorso dos animais, com creme de copaíba 10%, observaram que no dia 7 desse tratamento ainda apresentava sinais de inflamação, apesar de no dia 14 já apresentarem um número menor de fibroblastos.

Os fibroblastos são células que auxiliam na formação da matriz extracelular por meio da síntese de colágeno e conseqüentemente favorecem a cicatrização de feridas (MENDONÇA; COUTINHO NETO, 2009). Resultados distintos encontrados podem ser explicados devido à aplicação de diferente metodologia ao uso da fotobiomodulação e ainda, de diferentes espécies de copaíba, já que a composição da sua oleorresina varia de acordo com o ambiente em que estão expostas.

**Figura 21** – Resultado comparativo intragrupo da evolução do número de fibroblasto durante os dias de avaliação.

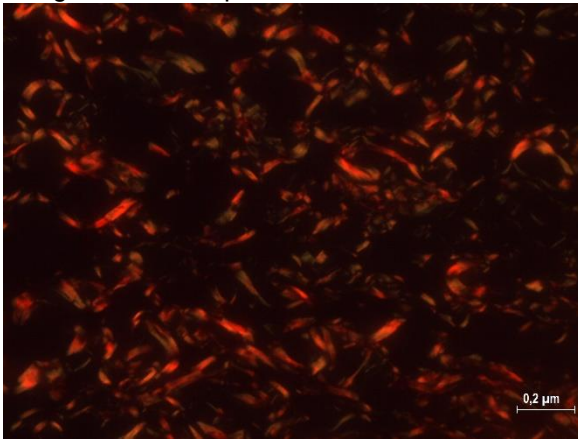


**Fonte:** Autora (2020).

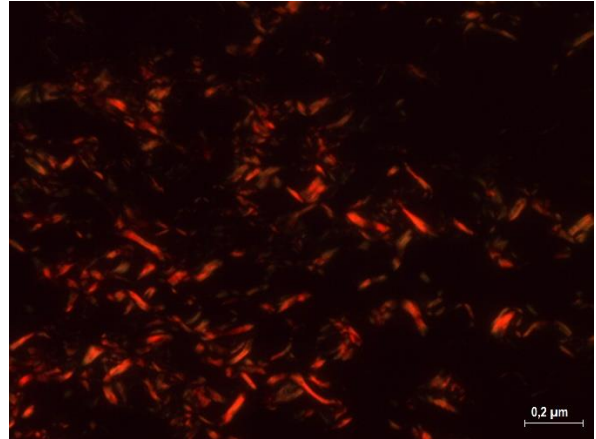
#### 5.4.4 Análise do colágeno total em PSR

A figura 22 apresenta a proliferação das células de neutrófilos, vasos sanguíneos e fibroblastos, de acordo com os grupos do estudo.

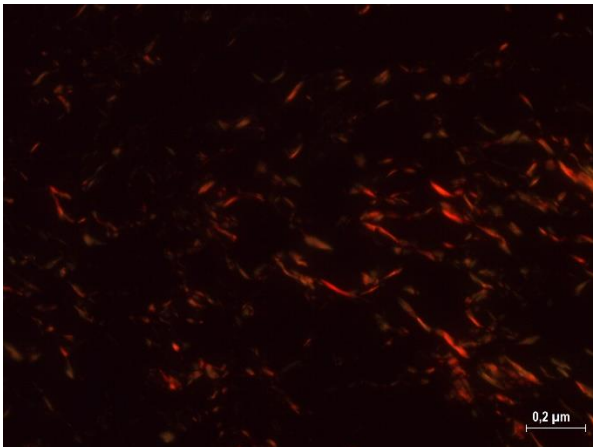
**Figura 22** - Fotomicrografias com aumento de 500x coradas em PSR demonstrando as fibras colágenas sob luz polarizada.



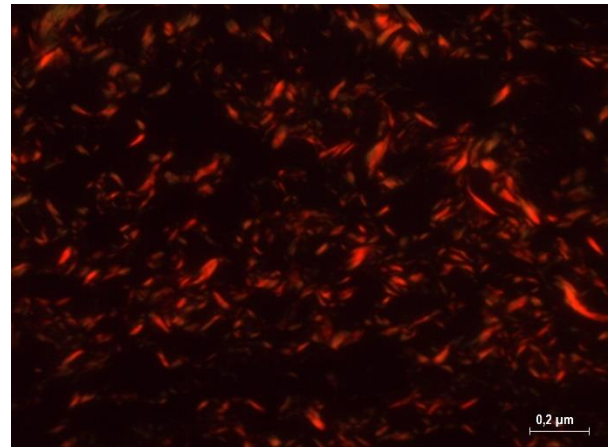
A. Grupo Controle no dia 03



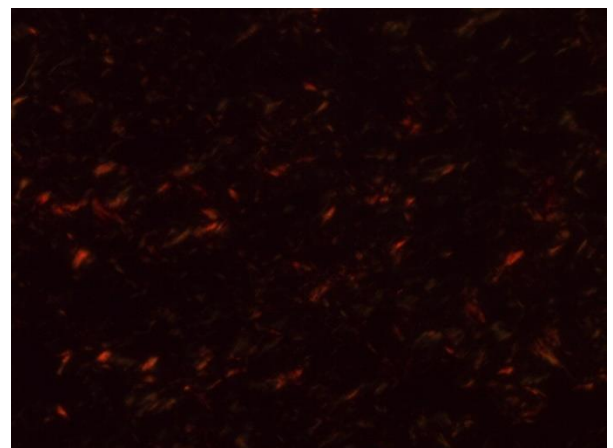
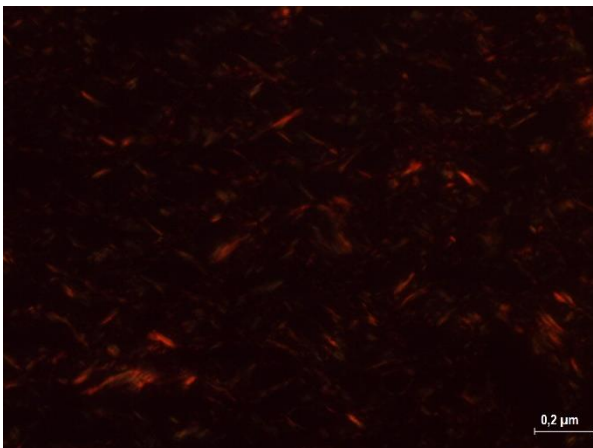
B. Grupo Fotobiomodulação no dia 03



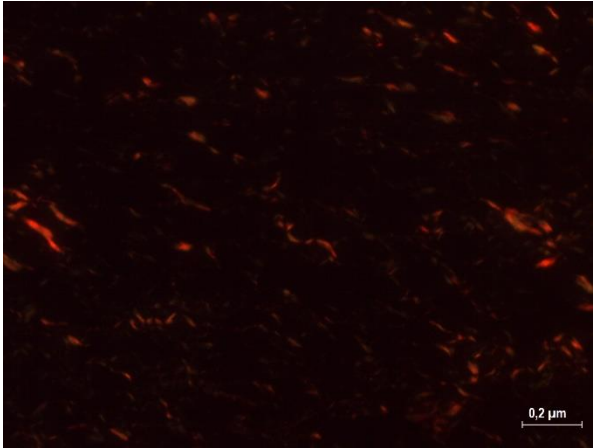
C. Grupo Pomada no dia 03



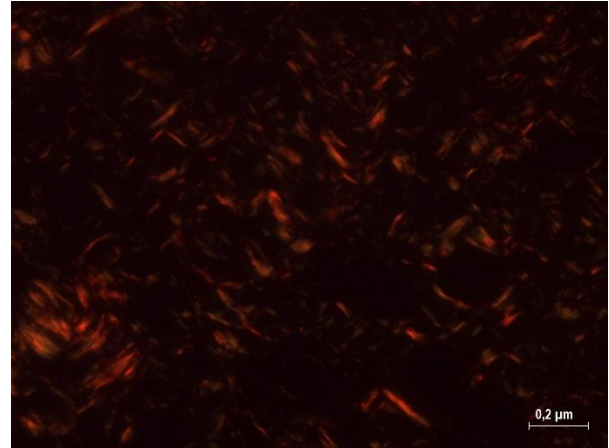
D. Grupo Fotobiomodulação e Pomada no dia 03



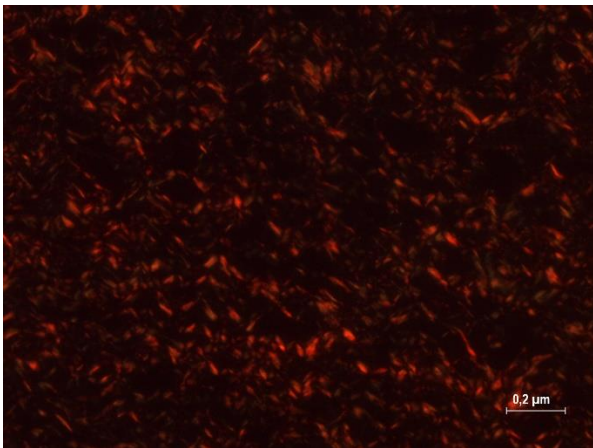
E. Grupo Controle no dia 07



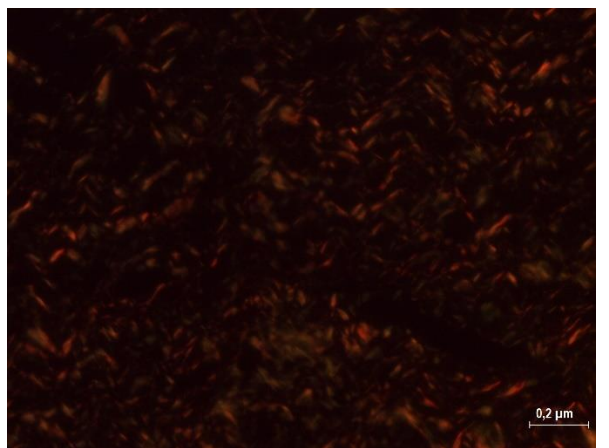
F. Grupo Fotobiomodulação no dia 07



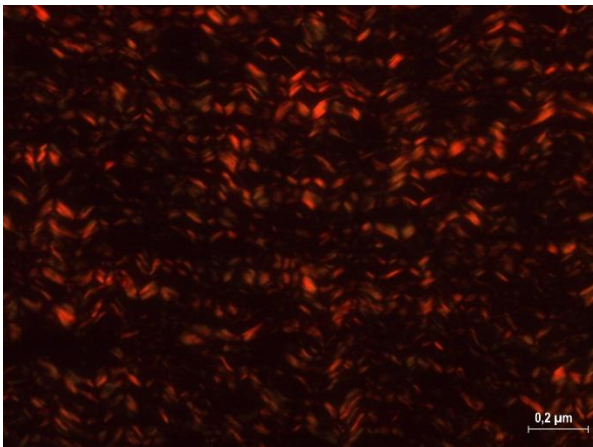
G. Grupo Pomada no dia 07



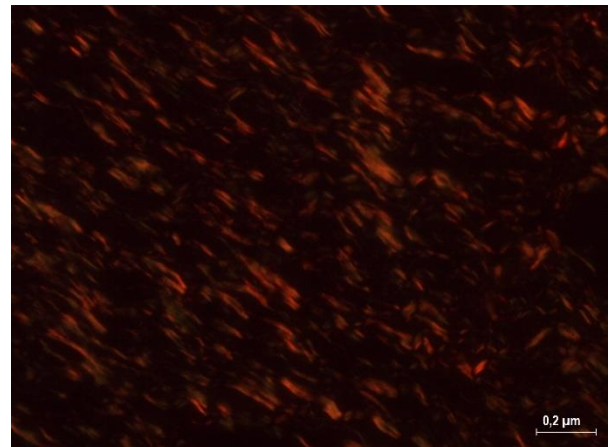
H. Grupo Fotobiomodulação e Pomada no dia 07



I. Grupo Controle no dia 14



J. Grupo Fotobiomodulação no dia 14



K. Grupo Pomada no dia 14

Fonte: Autora (2020).

L. Grupo Fotobiomodulação e Pomada no dia 14

Em relação à análise de colágeno total em cada grupo, nos dias 3 e 7, apresentaram dados significativos nas comparações entre si, com índice maior de

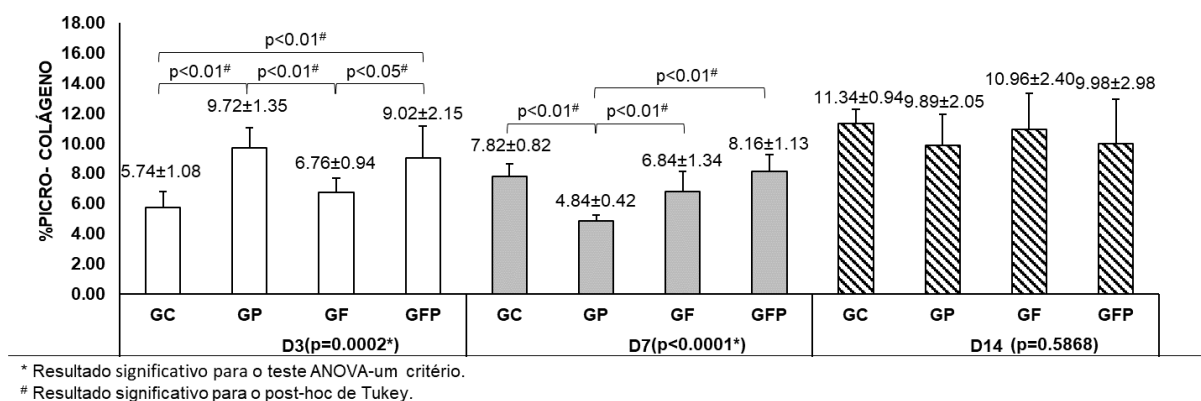


colágeno nos grupos GP e GFP em relação aos demais, no primeiro momento, e no segundo momento, havendo uma redução significativa no GP à comparação com os outros grupos. Já no último momento de avaliação, todos permaneceram com médias aproximadas (Figura 23).

Diferentemente de Al-Zamily e Al-Temimi (2019), que afirmam em seu estudo que no grupo controle, a densidade do colágeno e o arranjo apresentavam uma significância melhor que os grupos de tratamento, mas quando estes comparados, o grupo terapia a laser era mais eficaz. Da mesma forma ocorreu com Biondo-Simões et al. (2019) em que demonstram que embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos, o grupo controle apresentou uma média maior na avaliação quantitativa de colágeno, sendo o grupo copaíba o menor.

Já Carvalho et al. (2010) verifica em seu estudo que no terceiro e sétimo dia, a área de colágeno no tratamento com laser, foi significativamente maior quando comparado ao grupo placebo, o que também foi observado no primeiro momento do estudo presente. E pelos resultados encontrados, Carvalho et al. (2010), afirmam que uso da LTBI é proporcionadora de uma deposição maior de colágeno.

**Figura 23** – Resultado comparativo intergrupos da porcentagem de colágeno total de acordo com dias de avaliação.

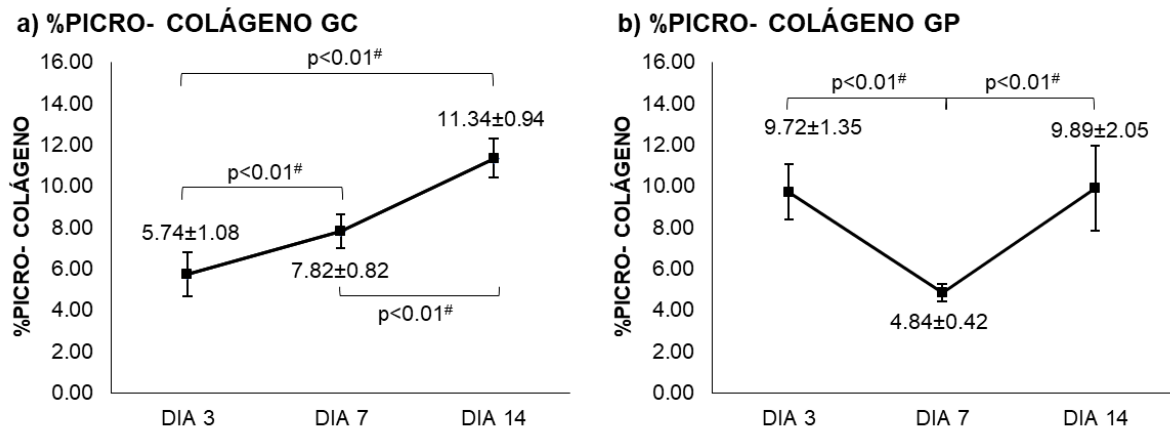


**Fonte:** Autora (2020).

Com exceção ao GFP, os demais grupos obtiveram uma porcentagem significativa de colágeno entre eles. Pode-se perceber que os grupos em que houve tratamento apresentaram uma média de colágeno maior no dia 3 em comparação ao grupo controle (Figura 24). O que corrobora com Barquete (2017), em que afirma que

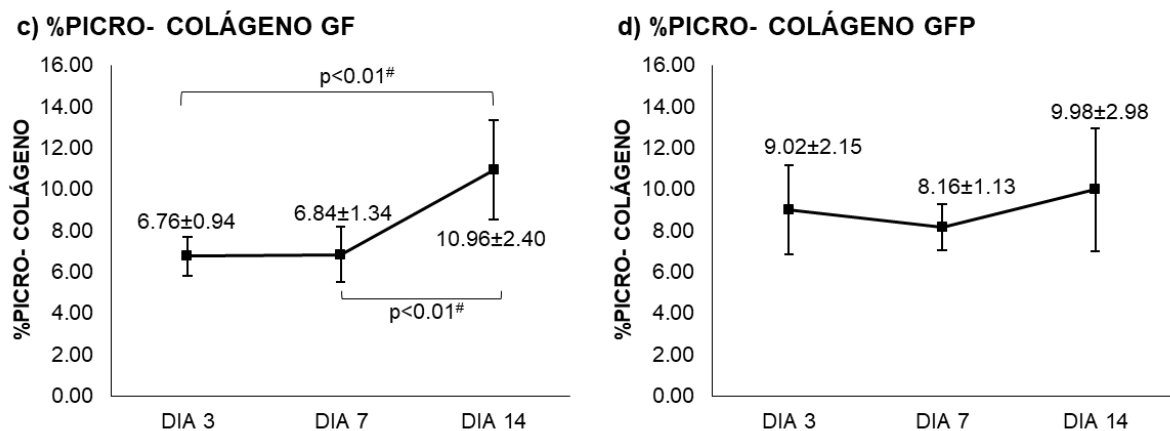
a preeminência macroscópica do grupo tratado com solução fisiológica pode não condizer com uma cicatrização melhor a um prazo mais extenso, em decorrência da demora na expressão do colágeno relativo à fase primária do processo cicatricial.

**Figura 24** – Resultado comparativo intragrupo da evolução da porcentagem de colágeno total durante os dias de avaliação.



Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p < 0.00001$ ; # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p < 0.00001$ ; # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.



Resultado significativo para o teste ANOVA-um critério:  $p = 0.00003$ ; # Resultado significativo do post-hoc de Tukey.

Resultado para o teste ANOVA-um critério:  $p = 0.3296$ .

**Fonte:** Autora (2020).

Gonçalves et al. (2010), relata em seu estudo que a maturação do colágeno foi maior no tratamento com laser a  $60\text{J}/\text{cm}^2$ , mas apresentando significância ao se realizar com laser de  $30\text{J}/\text{cm}^2$ , no dia 4 e 20, em relação aos grupos controle e óleo, já no dia 16, tanto o laser com menor dosimetria, quanto o grupo óleo foram significativos em comparação ao grupo controle. O que também é confirmado por

Andrade et al. (2014), utilizando 4J/cm<sup>2</sup> de aplicação do TLBI em comparação ao cetoprofeno na cicatrização, que apresentou um colágeno mais organizado nos animais tratados com laser, apesar de não ter sido verificada diferença estatisticamente significativa.

Porém, contrários à isso, Silva et al. (2013) demonstram em seu experimento que o uso de copaíba como terapêutica proporcionou fibras colágenas mais espessas e melhor organizadas. Assim como no trabalho de Masson-Meyers et al. (2013b) em que observou melhores resultados na síntese de colágeno, nas lesões em que se utilizou copaíba, com uma tendência de uma maior ênfase dessas moléculas nas terapêuticas que envolviam fitoterapia, com maior significância estatística sobre a síntese de colágeno entre todos os dias de avaliação do estudo (2, 7 e 14) comparados entre si.

Martini et al. (2016), afirmam que no sétimo dia, a aplicação diária de óleo de copaíba demonstrou maior eficácia na quantificação de fibras colágenas do que nos grupos controle e aplicação de nitrofurazona para induzir a formação de colágeno, mas, em 14 dias, o grupo copaíba não apresentou aumento significativo no número de fibras colágenas. Isso pode estar relacionado ao fato de terem sido utilizadas diferentes espécies de *Copaifera*, em que ao invés da *C. reticulata*, foi empregada a *C. multijuga*. Já Vieira et al. (2008) que utilizou a *C. langsdorffii*, corroborou com os resultados, em que o grupo de animais com aplicação do óleo de copaíba demonstraram uma quantidade menor de fibras colágenas em relação aos que foram tratados com soro fisiológico.

Além disso, pode-se sugerir, que não se ter observado os melhores resultados no grupo em que houve a associação das terapias, fotobiomodulação e copaíba a 10% em pomada, podem ter ocorrido em virtude das mesmas atuarem em fases diferentes do processo de cicatrização, o que poderia gerar melhores resultados ao se utilizar as mesmas de forma alternada, necessitando de maiores estudos em relação à isso.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que a utilização da oleorresina de *C. reticulata* Ducke em pomada a 10% é segura e não irritativa/corrosiva à aplicação dérmica, mas o seu uso *in natura* pode provocar tais efeitos.

À análise da aplicação das terapias na cicatrização das feridas, é possível verificar que o uso da pomada a 10 % da oleorresina de forma isolada influenciou tanto na regulação de parâmetros inflamatórios quanto na elevação de deposição de colágeno total no tecido da lesão, fatores primordiais no decorrer do processo de cicatrização. E o uso associado da fotobiomodulação com a pomada não foi capaz de modular de forma mais eficiente o processo de cicatrização em aspectos macroscópicos e microscópicos. Observando que a aplicação alternada das mesmas poderia promover resultados mais satisfatórios, com o uso apenas da oleorresina em pomada na fase inflamatória inicial, por suas propriedades anti-inflamatórias, e o uso da fotobiomodulação em fase proliferativa, por promover uma proliferação de fibroblastos, e em fase de remodelação, ambas as terapias, para maior deposição e melhor rearranjo de colágeno e oclusão da lesão

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. C.; SOUSA, A. L.; ALVES, C. L. G. F.; NUNES, J. T. Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais sob ação do laser de baixa potência. **Sci. Med.**, v. 21, p. 96-100, 2011.
- AGNE, Jones E. **Eletroterapia: teoria e prática**. 1 ed. Santa Maria: Orium, 2005.
- AHMED, S. A., GOGAL-JÚNIOR, R. M., WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 3 ed. p. 221, Salvador: EDUFBA, 2011.
- AL-ZAMILY, R. H.; AL-TEMIMI, S. M. A. Comparison of the effects of *nigella sativa* oil and laser on treatments on experimental wound healing in rats. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v, 12, n. 7, 2019.
- AMIN, N.; DOUPIS, J. Diabetic foot disease: from the evaluation of the “foot at risk” to the novel diabetic ulcer treatment modalities. **World J Diabetes**. v. 7, n. 7., p. 153-64, 2016.
- ANDRADE, F. S. S. D.; CLARK, R. M. O.; FERREIRA, M. L.; SILVA, F. L.; WENCESLAU, A.; SOUSA, F. J. D.; RANGEL, A. L.; NETA, O. D. O. Tratamento comparativo entre laserterapia de baixa potência e cetoprofeno em feridas cutâneas de ratos. **Fisioterapia Brasil**. v. 15, n. 2, 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Critérios diagnósticos de infecção relacionada à assistência à saúde**. Brasília: ANVISA, 2013.
- AYYILDIZ, S.; EMIR, F.; SAHIN, C. **Case Reports in Dentistry. Evaluation of Low-Level Laser Therapy in TMD Patients**. p. 1-6, 2015.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogheny. **Taxon**. v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- BAGNATO, Vanderlei Salvador; PAOLILLO, Fernanda Rossi. **Novos Enfoques da Fototerapia para Condicionamento Físico e Reabilitação**. São Carlos: Editora Compacta, 2014.
- BARBOSA, P. C. S; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Influence of abiotic factors on the

chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Jornal Sociedade Brasileira de Química** 23 (10): 1823 – 1833, 2012.

BARQUETE, C. C. **Copaíba (*Copaifera langsdorffii* desf.; Caesalpiniaceae) em associação ao laser terapêutico no tratamento de feridas cutâneas em ratos wistar**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Rio Branco, 2017.

BATES, David O.; HARPER, Steven J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascul Pharmacol.** v. 39, p. 225-37, 2002.

BEHEREGARAY, Wanessa Krüger et al. Uso do Laser ALGalnP na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos. **Acta Scientiae Veterinarie.** v. 38, n. 3, p. 237-243, 2010.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; HENNING JÚNIOR, L.; BOENO, B. R. O.; PRADO, J. L.; COSTA, L. R.; ROBES, R. R.; IOSHI, S. O. Análise comparativa dos efeitos do mel, do óleo-serina de copaíba e de um produto comercial (fibrinolisa, desoxirribonuclease e cloranfenicol) na cicatrização por segunda intenção, em ratos. **Rev Col Bras Cir.** v. 46, n. 5, 2019.

BOURGUIGNON-FILHO, Aguimar de Matos et al. Utilização do laser no processo de cicatrização tecidual: revisão de literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilo-facial,** v.46, n.1, p.37-43, 2005.

BORGES, Fábio dos Santos. **Modalidades Terapêuticas nas Disfunções Estéticas**. São Paulo: Editora Phorte, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria MS/GM nº3916, de 30 de outubro de 1998**. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº971 de 3 de maio de 2006**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Condutas para tratamento de úlceras em hanseníase e diabetes**. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz Brasileira para o cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos** – DBCA 2006. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em: 10 mai.2018.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo Patologia Geral**. 5 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2013.

BRITO, M. V. H. et al. Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos. **Revista Paraense de Medicina**. v. 20, n. 2, 2006.

BRIZENO, L. A. C. et al. Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and FGF-2. **Life Sciences**, v. 155, p. 36-47, 2016.

BROUGHTON, George II.; JANIS, Jeffrey E. ATTINGER, Christopher E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**. v. 117, n. 7, p. 12-34, 2006.

CAETANO, G. F. **Biomembrana de quitosana- alginato na cicatrização de úlceras cutâneas de ratos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

CARNEIRO, M. I. S.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; RIBAS, C. A. P. M.; SANTOS, C. A. M.; CAVALCANTI, T. C. S.; CZECZKO, L. E. A. Estudo comparativo do uso de extrato de *Pfaffia glomerata* e do laser de baixa potência (hélio-neônio) na cicatrização de feridas em ratos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, n. 23, v. 3, p. 163-167, 2010.

CARVALHO, K. C.; NICOLAU, R. A.; MAIA, A. L. M.; BARJA, P. R.; SÁ, H. P.; SANTO, L. A. E.; ROCHA, G. M. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. **ConScientiae Saúde**, v. 9, n. 2, p. 179-186, 2010.

CARVALHO, D.V.; BORGES, E.L. Tratamento ambulatorial de pacientes com ferida cirúrgica abdominal e pélvica. **Revista Mineira de Enfermagem**, v.15, n.1, p.25-33, 2011.

CARVALHO, J. C. T. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* dwyer. **Phytother. Rev**. v. 19, p. 946 – 950, 2005.

CAVALCANTI, T.M. et al. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.86, n.5, p. 955-960, 2011.

CLARK, Richard A. F. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1996.

COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: [http://ses.sp.bvs.br/lis/resource/35979#.Ww651Sin\\_IU](http://ses.sp.bvs.br/lis/resource/35979#.Ww651Sin_IU). Acesso em: 28 de Ago de 2018.

COFFITO. Conselho Federal de Fisioterapia e Terapia Ocupacional. **Resolução COFFITO nº380 de 3 de novembro de 2010**. 2010.

CORRÊA, J. M. X. Avaliação macro e microscópica do uso tópico de óleo de copaíba na reparação de feridas cutâneas em ratos. Ilhéus, BA: Universidade Estadual de Santa Cruz. **Dissertação (Mestrado)**, 2015, 42f.

DAI, Mei et al. Chitosan-alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. **J Biomed Biotechnol.**, 2009.

DAMY, Sueli Blanes et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Rev Assoc Med Bras** v. 56, n. 1, p: 103-111, 2010.

DETMAR, Michael et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. **J Invest Dermatol.** v. 108, p. 263-8, 1997.

DVORAK, Harold F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol.** v. 20, n. 4, p. 368-80, 2002.

EMING, Sabine A.; KRIEG, Thomas; DAVIDSON, Jeffrey M. Gene therapy and wound healing. **Clin Dermatol.** v. 25, p. 79-92, 2007.

ESTEVIÃO, L. R. M, et al. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 44, n. 4, p. 406-412, abr. 2009.

FERREIRA, A. D. et al. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. **Rev. Bras. Farm.** v. 94, n. 2, p. 94-101, 2013.

FONG, Joy; WOOD, Fiona. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **Int J Nanomedicine.** v. 1, n. 4, p. 441-9, 2006.

FRADE, Marco Andrey Cipriani. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. 2003. 185 f. Tese (Doutorado). Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP; 2003.

FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-8, 2008.

FREITAS, Rodrigo Pegado de Abreu et al. Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos. Terapias associadas ou isoladas? **Fisioter Pesq.** v. 20, n. 1, p. 24-30, 2013.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M.S.; NUNEZ, S.C. **Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2012.



- GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI, M. H. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146, jan./abr. 2012.
- GIESBRECHT, P. C. P. **Efeito da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro Universitário Vila Velha, 2011.
- GIULIANI, A.; LORENZINI, L.; GALLAMINI, M.; MASSELLA, A.; GIARDINO, L.; CALZA, L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability. **BMC Complement Altern Med**. v. 9, p.8, 2009.
- GOMES, L. P. **Avaliação dos fatores de crescimento endotelial vascular VEGF e de seus principais receptores VEGFR-1 e -2 no processo de cicatrização com influência da radioterapia em ratos da linhagem Wistar**. 2013. 160 p. Tese (Dissertação). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- GONÇALVES, E. S.; SILVA, J. R.; GOMES, C. L.; NERY, M. B. L. Effects of the oral treatment with *Copaifera multijuga* oil on reproductive performance of male Wistar rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 355-362, 2014.
- GONÇALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; MATTA, S. L. P.; BENEVIDES, G. P.; FARIA, F. R.; PINTO, M. V. M. Comparative study of the effects of gallium-aluminum-arsenide laser photobiomodulation and healing oil on skin wounds in wistar rats: a histomorphometric study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 28, n. 5, 2010.
- GUIRRO, Elaine; GUIRRO, Rinaldo, **Fisioterapia Dermato-funcional: Fundamentos, Recursos e Patologias**. São Paulo, SP: Manole, 2004.
- HARDING, K. G.; MORRIS, H.L.; PATEL, G.K. Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. **BMJ**. v. 324, p. 160-163, 2002.
- HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Phototherapy – a treatment modality for wound healing and pain relief. **Afr J Biomed Res**. v. 10, p. 99-109, 2007.
- HENRIQUES, Águida Cristina Gomes; CAZAL, Claudia; CASTRO, Jurema Freire Lisboa de. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. Revisão da literatura. **Rev. Col. Bras. Cir**. v. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.
- HESS, C.T.; SANTOS, M.A.B.; SOUZA, S.R. **Tratamento de Feridas e Ulceras**. Rio de Janeiro: Reichmann & Afonso editoras, 2002. 226p.
- HIPPÓLITO, A. G.; STANSKI, G.; FERNANDES, L. L.; SAMPAIO, A. B. A.; RAHAL, S. C.; TEIXEIRA, C. R. Evaluation of topical medications, lavage solutions, and laser therapy for treating open wounds induced in blue-fronted amazona parrots, Amazona aestiva. **Journal of Exotic Pet Medicine**. v. 29, p. 1-9, 2019.

JANIS, Jeffrey E.; KWON, Robert K.; LALONDE, Donald H. A practical guide to wound healing. **Plast Reconstr Surg**. v. 125, n. 6, p. 230-44, 2010.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. **Photochem Photobiol Sci**. v. 3, p. 211-216, 2004.

KARUKONDA, Sree R. K. et al. The effects of drugs on wound healing--part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds. **International journal of dermatology**. v. 39, p. 321-33, 2000.

KASHYAP, A. et al. Effect of povidine iodine dermatologic ointment on wound healing. **American surgeon**. v. 61, Suppl 6, p. 486-491, 1995.

KOKANE, D. D.; MORE, R. Y.; KALE, M. B.; NEHETE, M. N.; MEHENDALE, P. C.; GADGOLI, C. H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **J Ethnopharmacol**. v. 124, p. 311-315, 2009.

KOLLURU, G.K.; BIR, S.C.; KEVIL, C.G. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. **International journal of vascular medicine**, v. 2, 2012.

KORELO, Raciele Ivandra Guarda et al. Aplicação da microcorrente como recurso para tratamento de úlceras venosas: um estudo piloto. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**. v. 20, n. 4, 2012.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins: Patologia Básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEAL, C.T.; BEZERRA, A.L.; LEMOS, A. A efetividade do *laser* de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. **Revista Fisioterapia e Pesquisa**, v.19, n.3, p.290-296, 2012.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S., BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA, JUNIOR; V. F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from *Copaiba* (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, 17: 3886-3889, 2012.

LIU, Xia; LI, P.; CHEN, X. Y.; ZHOU, Y. G. c-Ski promotes skin fibroblast proliferation but decreases type I collagen: implications for wound healing and scar formation. **Clin Exp Dermatol**. v. 35, n. 4, p. 417-24, 2010.

- LIMA, C. S. **Estudo da toxicidade não clínico em ratos submetidos ao tratamento com óleos resina de *Copaifera duckei* dwyer (subcrônico e reprodutivo)**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, 2014.
- LIMA, C. S. et al. Pré-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**. 18, 1013–1023, 2011.
- LIMA, H. S. **Potencial anti-inflamatório da oleorresina de *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer – Leguminosae**. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Federal do Oeste do Pará, 2015.
- LUCCA, L. G. **Avaliação da permeação cutânea de nanoemulsão contendo óleo de copaíba incorporada a hidrogéis**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- LUCAS, R. Semiologia da pele. In: FEITOSA, Francisco Leydson F. **Semiologia Veterinária – a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. cap.12, p. 641-676.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MACIEL, D. M. A. D.; RAHAL, S. C.; SANTOS, I. F. C.; ALVES, C. E. F.; SAMPAIO, A. B. A.; NAGAI, L. R.; CAMARGO, B. W. D. F.; SALEWSKI, G. C. Healing of skin wounds in rats: influence of low-level laser therapy, alone or combined with natural products. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, p. 1729, 2020.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **An Bras Dermatol**, v. 78, n.4, p.393-410, 2003.
- MARCONI, Marina de Andrade; LAKATOS, Eva Maria. **Fundamentos de Metodologia Científica**. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2003.
- MARINHO, D. F. **Avaliação da utilização terapêutica da formulação em gel do óleos resina de *Copaifera duckei* Dwyer em uso tópico por fonoforese**. Dissertação (Mestrado em Biociências). Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2015.
- MARTINI, C. A. N.; SCAPINI, J. G. S.; COLLAÇO, L. M.; MATSUBARA, A.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Análise comparativa dos efeitos do óleo-resina de *Copaifera multijuga* e da nitrofurazona na cicatrização de ferida cutânea. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 43, n. 6, p. 445-451, 2016.
- MARTINS-DA-SILVA, R. C. V., PEREIRA, J. F., LIMA, H. C. **O gênero. *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira**. *Rodriguésia*, 59, p. 455-476, 2008.

MASSAHUD JUNIOR, Marcelo Renato; SALOMÉ, Geraldo Magela; FERREIRA, Lydia Masako. Laser de baixa intensidade com microcorrente na cicatrização em feridas cutâneas em ratos. **Rev enferm UFPE on line**. v. 11, Supl. 9, p. 3567-73, 2017.

MASSON, D. S.; SALVADOR, S. L.; POLIZELLO, A. C. M.; FRADE, M. A. C. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaiba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Rev. Bras. Plantas Med.** v. 15, n. 4, 2013

MASSON-MEYERS, D. S.; ANDRADE, T. A. M.; LEITE, S. N.; FRADE, M. A. C. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin. **Int J Nat Prod Sci**. v. 3, p. 10-20, 2013a.

MASSON-MEYERS, D. S.; ENWEMEKA, C. S.; BUMAH, V. V.; ANDRADE, T. A. M.; CASHIN, S.; FRADE, M. A. C. Antimicrobial effects of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in infected rat wounds. **Int J Appl Microbiol Sci**. v.2, p. 9-20, 2013b.

MENDONÇA, Ricardo José de; COUTINHO NETO, Joaquim. Aspectos Celulares da Cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MESTRE, T.; RODRIGUES, A.; CARDOSO, J. Cicatrização de feridas crônicas – algumas opções terapêuticas. **Revista SPDV**, v. 79, n.4, 2012.

MINATEL, D. G. et al. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers Surg Med**. v.4, n.1, p.433-41, 2009.

MORAES, B. C. et al. Variação espacial e temporal da precipitação no Estado do Pará. **Acta Amaz.** v. 35, n. 2, p. 207-214, 2005.

NOGUEIRA NETO, J.; LINDOSE, M. J. S.; COELHO, L. F.; CARVALHO, R. A. F.; RODRIGUES, T. G. P. M.; ARAÚJO, A. G. P.; GIRÃO, M. J. B. C.; SCHOR, E. Changes in the volume and histology of endometriosis foci in rats treated with copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*). **Acta Cir Bras**. v. 26, suplemento 2, p. 20-24, 2011.

NOGUEIRA, P.C.; CALIRI, M.H.L.; SANTOS, C.B. Fatores de risco e medidas preventivas para úlcera de pressão no lesado medular: Experiência da equipe de enfermagem do HCFMRP-USP. **Revista Medicina (Ribeirão Preto)**, n.35, p.14-23, Jan/Mar 2002.

OECD (Organization for economic co-operation and development). **Guideline for testing of chemicals: 404 - acute dermal irritation/corrosion**, 2015.

OLIVEIRA, E. C. P., LAMEIRA, A. O.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Rev Bras PlantMedic**, n.8, p.14-23, 2006.

PAIVA, L. A. et al. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**. v. 16, n. 8, p.737-9, 2002.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg**. v. 187, suplemento 1, p. 1-6, 2004.

PIERI, J. S. **A utilização do laser de baixa potência ALGalnp na cicatrização do pós-operatório da cirurgia de abdominoplastia em pacientes de uma clínica de cirurgia plástica na cidade de Criciúma-sc**. 2009. 83 p. (Dissertação). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Santa Catarina, 2009.

PIERI, F. A., MUSSI, M. C., MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 11, n. 4, 2009.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S.; WADT, L.H.O. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa-MG, v. 30, n. 4, p. 583-591, 2006.

RIO, R.G.W. **Atividade anti-inflamatória, toxicidade e aspectos químicos do óleo-resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies, e de suas respectivas frações**. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 2001.

ROCHA, J. C. T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. **Rev Bras Prom Saúde**. v. 17, p. 44-48, 2004.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de histologia veterinária**. 1 ed. São Paulo: Elsevier, 2007, 544p.

SANTOS, J.B. et al. Avaliação e tratamento de feridas: orientação aos profissionais de saúde. **Hospital das Clínicas**, Porto Alegre. 2011.

SANTOS, M. G.; DIAS, A. G. P.; MARTINS, M. M. Conhecimento e uso da medicina integrativa entre alunos e professores de primeiro grau. **Revista Saúde Pública**, v. 29, n. 3, p. 221-7, 1995.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. **Evid Based Complement Alternat Med**. v.2012, p. 1-7, 2011.

- SANTOS, A. O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B. P., VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. e NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 103: 277-281, 2008.
- SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Exp Cell Res**. v. 304, p. 274-86, 2005.
- SCANLON, V.C.; SANDERS, T. **Essentials of Anatomy and Physiology**. 5 ed, Philadelphia: F.A. Davies Company, 2007.
- SCHREML, S.; SZEIMIES, R. M.; PRANTL, L.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. Wound healing in the 21st century. **J Am Acad Dermatol**. v. 63, n. 5, p. 866-81, 2010.
- SILVA, E.C.; HAIDAR, A.F.; MUSSKOPF, D.E. Radiação Laser. In: RODRIGUES, E.; GUIMARÃES, C. **Manual de recursos fisioterapêuticos**. Rio de Janeiro: Revinter, 1998. p.17-37.
- SILVA, C.G.; CROSSETTI, M.G.O. Curativos para tratamento de feridas operatórias abdominais: uma revisão sistemática. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v.33, n.3, p.182-189, 2012.
- SILVA, M. A. D.; PEREIRA, A. C.; MARIN, M. C. C.; SALGADO, M. A. C. The influence of topic and systemic administration of copaíba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 5, n. 4, p. 169-73, 2013
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.** v. 18 n. 4: Out./Dez. 2008.
- SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**. v. 341, p. 738-46, 1999.
- SOLEIMANI, H.; AMINI, A.; TAHERI, S. ; SAJADI, E.; SHAFIKHANI, S. ; SCHUGER, L. A. ; REDDY, V. B. ; GHOREISHI, S. K.; POURIRAN, R.; CHIEN, S. ; BAYAT, M. The effect of combined photobiomodulation and curcumin on skin wound healing in type I diabetes in rats. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B : Biology**, n. 181, p. 23-30, 2018.
- SHEN, X.; NAGAI, N.; MURATA, M.; NISHIMURA, D.; SUGI, M.; MUNEKATA, M. Development of salmon milt DNA/salmon collagen composite for wound dressing. **J Mater Sci Mater Med**. v. 19, n. 12, p. 3473-9, 2008.
- SMITH, K. C. Laser (and LED) therapy is phototherapy. **Photomed. Laser Surg**. v. 23, n. 1, p. 78-80, 2005.

SUNG, J. H.; HWANG, M. R.; KIM, J. O.; LEE, J. H.; KIM, Y. I.; KIM, J. H.; CHANG, S. W.; JIN, S. G.; KIM, J. A.; LYOO, W. S.; HAN, S. S.; KU, S. K.; YONG, C. S.; CHOI, H. G. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. **Int J Pharm.** v. 392, n. 1-2, p. 232-40, Jun, 2010.

SUVARNA, K.; MUNIRA, M. Wound healing process and wound care dressing: a detailed review. **Journal of Pharma Research**, v.2, n.11, p.6-12, 2013.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v.25, n.2, p.273-86, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, Junho 2005.

VIEIRA, R. C.; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J. J.; LINO JÚNIOR, R. S.; BRITO, L. A. B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesq Vet Bras.** v. 28, n. 8, p. 358-66, 2008.

WATSON, T. Regulation of tissue repair and regeneration fields. **Chinese Journal of Traumatology.** v. 13, n. 1, p. 55-61, 2010.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev.** v. 83, p. 835-70, 2003.

WYSOCKI, A. B. Skin Anatomy, Physiology and Pathophysiology. **The Nursing Clinics of North America.** v. 34, n. 4, p. 777-97, 1999.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-52, 2001.

ZIECH, R. E. et al. Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães. **Pesq. Vet. Bras.**, 33 (7): 909-913, 2013.

ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; TRIGO, J. T. Volatiles of Oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). **Journal of Essential Oil Research.** v. 21, 2009.